Aus der Klinik mit dem Schwerpunkt für Gastroenterologie,
Hepatologie und Endokrinologie
der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

DISSERTATION

Intestinal-mucosale Ammoniogenese bei Patienten mit Leberzirrhose : Eine Studie mit stabilen Isotopen

Zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Esmatollah Kasim

aus Kabul-Afghanistan

Dekan: Prof. Dr. Joachim W. Dudenhausen

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. M. Plauth
2. Prof. Dr. med. J. Mössner
3. PD Dr. med. H. Schmidt

Datum der Promotion: 30.04.2004

Abkürzungsverzeichnis

A	Arterie radialis
AIH	autoimmune Hepatitis
Ala	Alanin
ALZ	Alkohol induzierte Leberzirrhose
Amm	Ammonium
AP	alkalische Phosphatase
DIFE	Deutsches Institut für Ernährungsforschung
EI-GC-MS	Elektronenstoßionisation-Gaschromatograph-Massenspektrometrie
γGT	γ-Glutamyl-Transferase
GI-Trakt	gastrointestinaler Trakt
Gln	Glutamin
Glu	Glutamat
Gly	Glycin
GOT	Glutamat-Oxalacetat-Transaminase
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase
HPLC	high performance liquid chromatography
IU	international Unit
i.v.	intravenös
MCV	mittleres corpuskuläre Volumen
MPE	mole per excess
NaCl	Natriumchlorid
NPP	N-pivaloyl-i-propyl
Pro	Prolin
pTT	partiell Thromboplastin time
P_{VCI}	systemischer Druck
P_{VP}	portaler Druck
RES	retikuloendotheliales System
SDD	selektive Darmdekontamination
Ser	Serin
TIPS	transjugulärer intrahepatischer portosystemischer Shunt
VMS	Vena mesenterica superior
VH	Vena Hepatica

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung
2. Fragestellung
3. Patienten, Material und Methoden
   - 3.1. Patienten
   - 3.2. Material
     - 3.2.1. Selektive Darmdekontamination (SDD)
     - 3.2.2. Kathetertechnik
     - 3.2.3. Enterale Nährlösung
   - 3.3. Durchführung
     - 3.3.1. Zeitlicher Ablauf der Untersuchung
     - 3.3.2. Blutprobengewinnung
     - 3.3.3. Blutprobenaufarbeitung
   - 3.4. Analytik
     - 3.4.1. Aminosäurenkonzentrationen
     - 3.4.2. Ammoniakkonzentration
     - 3.4.3. [^{15}N]-Metabolite
   - 3.5. Datenauswertung
   - 3.6. Statistik
4. Ergebnisse
5. Diskussion
   - 5.1. Methodologie
   - 5.2. Stoffwechselmetabolite
6. Zusammenfassung

   Literaturverzeichnis

1. Einleitung

In den verschiedenen Konzepten zur Pathogenese der hepatischen Enzephalopathie nimmt die systemische Hyperammoniämie eine zentrale Stellung ein [1-3]. Entgegen früheren Ansichten wird jedoch das über die Pfortader der Leber zugeführte Ammonium nicht ausschließlich von Bakterien im Kolon produziert, sondern entstammt in relevanter Menge, beim Versuchstier zu etwa 50%, dem Glutaminstoffwechsel der Dünndarmmukosa [4-6].
Am perfundierten Rattendarm konnte gezeigt werden, daß der Dünndarm nicht nur arteriell, sondern auch luminal zugeführtes Glutamin zu Ammonium metabolisiert [7,8]. Unter physiologischen Bedingungen unterstützt diese intestinal-mukosale Ammoniogenese die hepatische Harnstoffsynthese. Unter pathologischen Verhältnissen wie bei einer Leberzirrhose und dem Vorliegen portosystemischer Umgehungskreisläufe führt sie zur systemischen Hyperammoniämie und hepatischen Enzephalopathie [9]. Diese Ammoniogenese ist weder durch Lactulose noch durch Neomycin zu beeinflussen [10].

Aus den wenigen am Menschen, während einer Laparotomie erhobenen Daten war bisher lediglich bekannt, daß der Darm, insbesondere das Jejunum, Glutamin aus dem arteriellen Blut aufnimmt und Ammonium und Alanin als quantitativ bedeutendste Metabolite abgibt [11-15]. Plauth und Mitarbeiter haben erstmals an Patienten mit Leber zirrhose diese tierexperimentellen Befunde, die für den Stoffwechsel der Dünndarmmukosa als eine relevante Quelle der postprandialen Hyperammoniämie sprechen, bestätigt [16]. In ihrer Untersuchung fanden sie bereits 15 Minuten nach der Applikation der enteralen Glutamin-haltigen Nährlösung einen signifikanten Anstieg der Ammoniakkonzentration im mesenterialvenösen Blut als Hinweis dafür, daß der Dünndarm eine wesentliche Quelle der portalen Ammoniumlast auch beim Menschen ist.
In Kenntnis dieser Befunde werden Phänomene wie das "germ free paradox" - das Auftreten einer hepatischen Enzephalopathie bei keimfrei aufgezogenen Tieren nach portocavaler Anastomose - durch die systemische Hyperammoniämie als Folge der Stoffwechselaktivität der Dünndarmmukosa und einer portosystemischen Kollateralzirkulation erklärbar [17].

Die Bedeutung des Glutamins im Darmstoffwechsel wird kontrovers diskutiert. Entgegen der früheren Meinung, dass Glutamin die zentrale Rolle im Energiestoff-

wechsel des Darmes spielt, mehren sich Hinweise auf eine vorrangige Bedeutung des Glutamats in diesem Stoffwechselprozess. So beschrieben Matthews et al, dass 50 % des Glutamins, jedoch 88 % des Glutamats nach der enteralen Applikation während der ersten Passage vom Splanchnikusgebiet metabolisiert wird [18]. Der größte Teil dieses Glutamats wird als Energieträger im Darm oxidiert [19-22].

Glutamin wird von den meisten Säugetieren im Darm über die Glutaminase-Reaktion unter Bildung von Ammonium aus dem Amidstickstoff metabolisiert. Die Aktivitätsverteilung dieses Enzyms im gastrointestinalen Trakt spricht für eine Metabolisierung vorwiegend durch Dünndarmepithelien, in denen 80% der Enzymaktivität des gesamten GI-Trakts lokalisiert sind. [23-25]. In der Niere, dem zweitwichtigsten Ammonium produzierenden Organ, kommt es bei Azidose nicht nur zu einer Steigerung der Fluxrate des Ammoniums durch die Glutaminase-Reaktion, sondern auch zu einer zusätzlichen Ammoniogenese über die Glutamat-Deaminierung [26-30].
Yang und Mitarbeiter [31] konnten mittels [^{15}N] Tracerstudie zeigen, dass beim Hund 33 % des vaskulär angebotenen Glutamins von den portal-drainierten Viszera deamidiert wurde.

In Kenntnis dieser Befunde sollte daher die Frage nach dem Stoffwechselweg des Amid- bzw. Aminostickstoffs von Glutamin im Dünndarm des Menschen unter Einsatz von stabilen Isotopen Technik untersucht werden.
Bei Patienten mit einem transjugulären intrahepatischen portosystemischen stent-shunt (TIPS) [32] bestand die seltene Gelegenheit, durch selektive Entnahme von Blut aus Mesenterial- und Hepatalvene den organspezifischen Stoffwechsel von Glutamin für Darm und Leber zu untersuchen.
Zweite integrale Voraussetzung für die Untersuchung war die Analytik der Aminosäuren und Intermediate des Stickstoffmetabolismus, die mittels HPLC und Massenspektroskopie in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Dr. C.C Metges [33-35] realisiert werden konnte. Durch eine neuartige hochempfindliche massenspektrometrische Methode, die seit einigen Jahren in dauernder Anwendung ist, bestand die Möglichkeit, den Stickstoffmetabolismus von Aminosäuren mit geringsten Dosierungen nicht-radioaktiver [^{15}N] Tracer zu untersuchen. Weiterhin wurden vor kurzem massenspektrometrische Methoden etabliert, die eine Bestimmung der [^{15}N] Anreicherung im Plasma-

Ammonium sowie im Amino- und Amidstickstoff des Glutamins sowie parallel im Aminostickstoff der Glutaminsäure erlaubt [36].

2. Fragestellung

Aus den in der Einleitung genannten Voraussetzungen ergaben sich folgende Fragestellung an die vorliegende Untersuchung:

1. Läßt sich auch beim Menschen zeigen, dass die Ammoniumbildung der Dünndarmmukosa überwiegend über die Deamidierung des Glutamins erfolgt ?

2. Liegt eine intakte Translokation des Glutamins aus dem Darmlumen in die Mesenterialvene vor ?

3. In welchem Maße wird der [^{15}N] aus der Amid- oder Aminogruppe des Glutamins in andere Metabolite wie Aminosäuren und Ammonium überführt ?

4. In welchem Umfang werden [^{15}N] angereicherte Metabolite wie Ammonium, Glutamin, Glutamat und Alanin vom Darm und der Leber extrahiert oder abgegeben ?

3. Patienten, Material und Methoden

3.1. Patienten

Bei den Patienten handelte es sich um zwei Gruppen zu je 4 Personen mit einer gesicherten Leberzirrhose unterschiedlicher Genese, bei denen zuvor ein TIPS wegen rezidivierender Ösophagusvarizenblutungen oder therapierefraktärem Aszites angelegt worden war.

Zum Zeitpunkt der Stoffwechselstudie befanden sich die Patienten in einer stabilen Krankheitsphase, d.h. sie wiesen innerhalb der letzten 14 Tage keine gastrointestinale Blutungen auf, und die Körpergewichtsschwankung innerhalb der letzten 7 Tage betrug weniger als 1.5 kg bei normaler Krankenhausbasiskost. Die Körpergewichtsschwankung beinhaltete nicht die Gewichtsabnahme infolge Aszitespunktion. Der Schweregrad der Zirrhose wurde nach der Child-Pugh Klassifikation als A, B oder C eingestuft [37]. Die Transaminasenaktivitäten überschritten die Referenzwerte zum Zeitpunkt der Untersuchung nicht um mehr als das Dreifache (Tabelle 3.1).

Bei allen Patienten wurden vor der Untersuchung Hämatokrit, Hämoglobin, MCV, Thrombozyten, Leukozyten, Quick, partielle Thromboplastinzeit, Gesamteiweiß, Albumin, Elektrophorese, Cholinesterase, GOT, GPT, γGT, AP, Gesamtbilirubin, Triglyceride, Cholesterin, Harnstoff, Kreatinin, Natrium, Kalium, Calcium, Phosphat und Chlorid bestimmt.

Alle Patienten wurden über die Ziele und die Risiken der Eingriffe, die für die Durchführung der Studie notwendig waren, vom Studienbetreuer informiert. Eine Einwilligung wurde von den Patienten in schriftlicher Form eingeholt. Das Studienprotokoll entsprach den Vorschriften der Deklaration von 1975 in Helsinki und wurde von der Ethikkommission des Universitätsklinikums der Charité genehmigt.

Table 3.1: Patientencharakteristika

	5-[^{15}N]-Gln Gruppe (n=4)	2-[^{15}N]-Gln Gruppe (n=4)
Alter (Jahre) Median (Range)	53.5 (41-67)	62.0 (32-64)
Gewicht (kg) (MW ± SEM)	80.3 ± 6.03	90.8 ± 5.63
Größe (cm) (MW ± SEM)	173.3 ± 3.4	173.5 ± 4.5
Ätiologie der Zirrhose (ALZ/Hep C/AIH)	2 / 1 / 1	3 / 1 / 0
Indikation für TIPS		
Rezidivierende Varizenblutung	3	2
therapierefraktärer Aszites	1	2
Child-Pugh score Median (Range)	6 (5-10)	8 (6-10)
Classifikation (A / B / C)	3 / 0 / 1	1 / 2 / 1
GOT in Plasma (U / l) (MW ± SEM)	24.3 ± 5.7	18.3 ± 3.0
GPT in Plasma (U / l) (MW ± SEM)	27.3 ± 7.5	12.8 ± 3.5

ALZ: alkoholische Leberzirrhose, Hep C: Hepatitis C induzierte Zirrhose, AIH: Autoimmun-Hepatitis induzierte Zirrhose

3.2. Material

3.2.1. Selektive Darmdekontamination (SDD)

Die selektive Darmdekontamination (SDD) wurde zur Reduktion der Keimdichte im Darmlumen und somit zur Minimierung der bakteriellen (exogenen) Ammoniogenese eingesetzt. Damit konnte die endogene intestinale Ammoniogenese noch klarer nachweisbar werden.

Es wurde über jeweils mindestens 72h vor TIPS-Angiographie eine Vierfachkombination aus Tobramicin, Colistinsulfat, Amphotericin B und Metronidazol mit in der Tabelle 3.2 dargestellten Dosierungen verabreicht.

Tabelle 3.2: Selektive Darmdekontamination (SDD) (Dosierung pro Tag)

Tobramicin	(Gernebcin^R)	4 x 80 mg p.o.
Colistinsulfat	(Colistin^R)	4 x 100 mg p.o.
Amphotericin B	(Ampho Moronal^R Suspension)	4 x 500 mg p.o.
Metronidazol	(Clont^R)	2 x 400 mg p.o.

3.2.2. Kathetertechnik

Eine arterielle Kanüle (LeaderCath^R , Vygon, 115/09, 20G, 8cm, 0.6-0.9mm) wurde am Tag der Untersuchung vor der Angiographie unter den üblichen Kautelen in die linke Arteria radialis (A) plaziert.

Ernährungssonde. Am Untersuchungstag wurde vor der Angiographie eine 9F Ernährungssonde (Frekasoft^R 8F, Fresenius, Oberursel) duodenal plaziert und die korrekte Sondenlage radiologisch verifiziert.

Venenkatheter. Die TIPS-Angiographie erfolgte über einen transjugulären Gefäßzugang mittels Katheterschleuse. Darüber erfolgte die Katheterisierung der Vena cava inferior bzw. der V. portae zur Messung des Drucks in der Vena cava inferior (P_{VCI}) bzw. der V. portae (P_{VP}) für die Bestimmung des porto-cavalen Druckgradienten (P_{VP} - P_{VCI}) zur Überprüfung der hämodynamischen Effizienz des TIPS und zur TIPS-Portographie.

Nach TIPS-Angiographie wurde für die wissenschaftliche Untersuchung ein mit seiner Spitze in der Vena mesenterica superior (VMS) platzierter Katheter belassen, sowie ein

zweiter in eine nicht mit dem TIPS in anatomischer Verbindung stehenden Lebervene (VH)
gelegt (Abbildung 3.1).

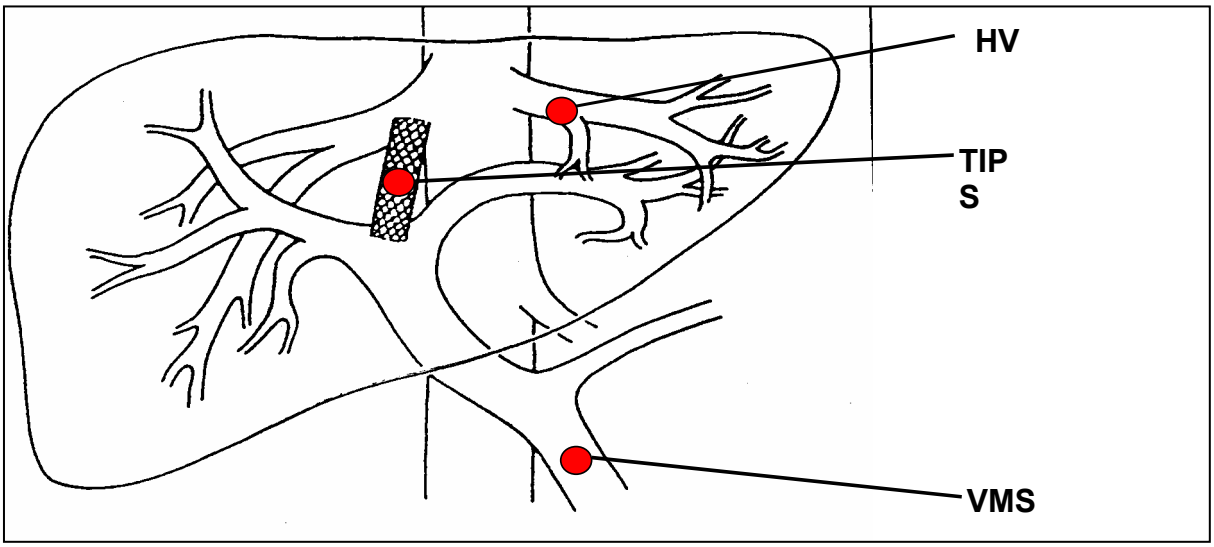

Abbildung 3.1: schematische Darstellung der TIPS-Anatomie und Platzierung der hepatal- und mesenterialvenösen Katheter

Unmittelbar nach der Katheterplatzierung wurde eine Antikoagulation (Heparin mit pTT-Verlängerung auf 50-70 s) zur Prophylaxe einer katheterbedingten Thrombose für die Dauer der Katheterisierung vorgenommen. Sie wurde noch im Angiographielabor durch Gabe eines Heparinbolus (5.000 - 7.500 IU i.v.) eingeleitet und auf der Station durch kontinuierliche intravenöse Gabe fortgeführt.
Nach Katheterplazierung und Verbringung des Patienten auf die Station erfolgte die Dokumentation des klinischen und hämodynamischen Zustandes des Patienten.

3.2.3. Enterale Nährlösung

Nach TIPS-Angiographie, Katheterplazierung und Dokumentation des Basalzustandes, in der Regel also 14-16 Stunden nach der letzten Nahrungsaufnahme (postabsorptiver Zustand), wurde über eine duodenal plazierte Ernährungssonde die Nährstofflösung verabreicht (Tabelle 3.3).
Vor der kontinuierlichen duodenalen Applikation der Nährlösung mit dem Tracer wurde ein Tracerbolus von 12 µmol x kg^{-1} Körpergewicht (0,001765 g x kg^{-1} Körpergewicht) duodenal appliziert („primed continuous infusion“).

Der Nährlösung wurde als Tracer entweder 5-[^{15}N] Glutamin (5.04 mM, 99 AP, Mass Trace, Inc. 3-G Gill St, Woburn MA 01801 USA) oder 2-[^{15}N] Glutamin (5.04 mM, 99 AP, Mass Trace, Inc. 3-G Gill St, Woburn MA 01801 USA) zugesetzt und mit einer Rate von 2 $ml \cdot kg^{-1} \cdot h^{-1}$ appliziert. Das entsprach einer Zufuhr des jeweiligen Tracers von 12 $\mu mol \cdot kg^{-1} \cdot h^{-1}$.
Die Gabe der Nährlösung erfolgte über einen Zeitraum von 240 min mittels einer Applikationspumpe.

Tabelle 3.3: Zusammensetzung der Nährlösung

2-[^{15}N] L-Glutamin oder 5-[^{15}N] L-Glutamin		0.742 g
Kohlenhydrate und Fette (Super Soluble Duocal™)		200.0 g
Kohlenhydrate		145.4 g
	Höhere Saccharide	117.6 g
	Trisacchaaride	14.6 g
	Maltose	10.2 g
	Glucose	3 g
Fette		44.6 g
	Gesättigt	29 g
	Einfach ungesättigt	5.4 g
	Mehrfach ungesättigt	10.2 g
NaCl		8.0 g
Aqua pro infusione ad 840 ml		

3.3. Durchführung

3.3.1. Zeitlicher Ablauf der Untersuchung

Die Untersuchung wurde mit der Abnahme von Blutproben aus dem arteriellen, mesenterial- und hepatalvenösen Katheter zur Dokumentation des basalen Zustandes (A, VMS, VH jeweils zum Zeitpunkt -10, -5 und 0 min) gestartet. Anschließend begann nach der Gabe des Tracerbolus die duodenale Infusion der Nährlösung und die Entnahme von Blutproben (aus A, VMS, VH) zu den Zeitpunkten 150, 195 und 240 min nach dem Beginn der Applikation der Nährlösung. Nach Abschluss der Infusion wurden der arterielle sowie der Mesenterial- und Lebervenenkatheter, die Vena jugularis Schleuse und die duodenale Sonde entfernt.

3.3.2. Blutprobengewinnung

Die Blutentnahme erfolgte offen, d.h. vor der Probengewinnung wurden zunächst etwa 3 ml Flüssigkeit aus dem Katheter entnommen. Anschließend erfolgte die Entnahme der Untersuchungsproben, zuerst 1 ml EDTA Blut (1.2 ml Monovette KE, Sarstedt, 51588 Nümbrecht) für die Bestimmung der Ammoniumkonzentration und 10 ml heparinisiertes Blut (10 ml Monovette LH, Sarstedt, 51588 Nümbrecht) für die Bestimmung der [^{15}N] Anreicherung in den Metaboliten und die Aminosäurenkonzentration. Anschließend wurde die initial entnommene 3 ml Flüssigkeit reinjiziert, um den Blutverlust zu minimieren.

Die Blutproben wurden unmittelbar nach der Abnahme auf Eis gelagert. Die EDTA-Monovette wurde unverzüglich auf Eis ins Zentrallabor der Charite zur Bestimmung der Ammoniumkonzentration transportiert. Die weitere Verarbeitung der Li-Heparinat Monovetten erfolgte im Stoffwechsellabor.

3.3.3. Blutprobenaufarbeitung

Im Stoffwechsellabor erfolgte die umgehende Zentrifugation der 10 ml Li-Heparinat Monovetten (3000 g, 5 min, 4°C). Der Plasmaüberstand wurde in Kryo-Röhrchen für die spätere Analytik als Duplikate wie folgt aufgeteilt:

P_1: Für die Bestimmung der Gln- und Glu-Konzentration mittels Isotopenverdünnungsmethode wurden 200µl Plasma auf zuvor vorgelegte 20µl d5-Glutamin (deuteriertes Glutamin) und 10µl d3-Glutamat (deuteriertes Glutamat) gegeben.

P_2: Für die Bestimmung der [^{15}N] Anreicherung in Ammonium wurde 1ml Plasma nativ aliquotiert.

P_3: Für die Bestimmung der [^{15}N] Anreicherung in den Aminosäuren wie Alanin, Prolin, Glycin, Serin wurde 750µl Plasma nativ aliquotiert.

P_4: Für die Bestimmung der freien physiologischen Aminosäurekonzentrationen wurde 250µl Plasma nativ aliquotiert.

Die Plasmaaliquots wurden sofort bei –80 °C eingefroren und so bis zur späteren Analytik aufbewahrt.

3.4. Analytik

Die Messungen der Isotopenanreicherung und Metabolitkonzentrationen erfolgte mit der Ausnahme der Ammoniumkonzentration in Kooperation mit der Arbeitsgruppe Proteinstoffwechsel (Leiterin: Dr. Cornnelia C. Metges) am Deutschen Institut für Ernährungsforschung (DIFE), Potsdam-Rehbrücke.

3.4.1. Aminosäurenkonzentrationen

Die Analytik der freien physiologischen Aminosäuren im Plasma erfolgte mittels Kationenaustausch-Chromatographie und Ninhydrin-Nachsäulenderivatisierung (TRIONE® ninhydrin reagent, Pickering Laboratories Inc., Mountain view, CA, USA) [38]. 250 µl Plasma wurde mit 25 µl 5-Sulfosalicylsäure (2 mol x l^{-1}) deproteinisiert und zentrifugiert (4°C, 10 min, 10000 x g, Biofuge fresco, Heraeus Instruments, Osterode). Die Aufbewahrung des Überstandes erfolgte bei –80°C. 20 µl deproteinisiertes Plasma wurde zur Analyse unter Verwendung einer HPLC-Anlage (System Gold, Beckman Instruments GmbH, München) auf eine Hochleistungssäule (3 x 150 mm, Pickering Laboratories Inc.) injiziert. Die Elution der Aminosäuren erfolgte mittels Stufenelution unter Verwendung verschiedener Lithiumcitrat Puffer (Laborservice Onken, Gruendau) und einem definierten Temperaturstufenprogramm (Flußrate von 0.2 ml x min^{-1}). Das Eluat wurde mit Ninhydrin-Reagenz (Flußrate von 0.2 ml * min^{-1}) gemischt und in einem mit einer PEEK Kapillare (10 m, 0.25 mm i.d.) ausgestattetem Nachsäulenreaktor auf 130 °C erhitzt. Die Absorption wurde bei 570 nm gemessen. Eine Rekalibrierung der Methode erfolgte nach der Messung von jeweils 4-5 Proben unter Verwendung eines kompletten Aminosäurenstandard- gemisches zur Identifizierung und Bestimmung der Response-Faktoren für jede fragliche Aminosäure (Konzentration jeder Aminosäure - 0.3 µmol x l^{-1}, ausgenommen Prolin - 0.6 µmol x l^{-1}, Harnstoff - 3 µmol x l^{-1}).

3.4.2. Ammoniumkonzentration

Die Bestimmung der Ammoniumkonzentration erfolgte enzymatisch aus EDTA-Plasma am Roche / Hitachi 717 bei 37°C [39, 40]. 1 ml EDTA-Blut wurde unmittelbar nach der Entnahme auf 4°C Eis ins Labor transportiert und zentrifugiert. Dem gewonnenen Plasma wurde gepuffertes Substart (Triethanolaminpuffer 151 mmol x l^{-1} (pH 8,6), α- Ketoglutarat 16.6 mmol x l^{-1}, ADP $\geq$ 1.2 mmol x l^{-1}) und NADPH $\geq$ 458 µmol x l^{-1}, GLDH $\geq$ 24.3 U x ml^{-1}

und gepuffertes Substrat (wie oben beschrieben) hinzugefügt. Die Reaktion findet nach der folgenden Gleichung statt:

$$\propto\text{- Ketoglutarat} + NH_4^+ + NADPH \rightarrow \text{L-Glutamat} + NADP + H_2O$$

Die Menge des während der Reaktion oxidierten NADPH entspricht der Ammoniumkonzentration der Probe und kann durch die resultierende Absorptionsabnahme photometrisch gemessen werden.

3.4.3. [^{15}N] Metabolite

Die Messung der ***[^{15}N] Anreicherung in den freien Plasmaaminosäuren*** erfolgte als *N*-pivaloyl-*i*-propyl (NPP) Aminosäuren Derivate mittels GC-C-IRMS (Gaschromatographie-Verbrennung-Isotopenverhältnis-Massenspektrometrie) entsprechend der Beschreibung von Metges und Petzke [33-35].

Das Isotopenverhältnis-Massenspektrometer (Delta S , Finnigan MAT, Bremen) ist über eine Verbrennungsschnittstelle (combustion interface, Finnigan MAT) an einem HP 5890 Gas-Chromatograph (Hewlett-Packard, Waldbronn) online angeschlossen (GC-C-IRMS). Die Schnittstelle besteht im wesentlichen aus einem Verbrennungsreaktor zur Oxidation organischer Moleküle, der mit Kupfer, Nickeloxid und Platin gefüllt ist (980°C), sowie aus einem Reduktionsofen, gefüllt mit elementarem Kupfer (600°C) zur Reduktion von Stickstoffoxiden zu molekularem N_2. Das System ist schematisch in Abbildung 3.2 dargestellt.

Zur Derivatisierung wurden 500 µl Plasma mit 1 ml 0.1 mol x l^{-1} HCl angesäuert und 200-500 nmol α-Aminoadipinsäure als interner Standard hinzugefügt. Nach Auftragung der Aminosäuren auf mit Dowex AG 50W-X8 Harz (Na+ Form, 200 mesh) gefüllte individuelle Säulen erfolgte die Elution mit 2 ml 4 mol x l^{-1} NH_4OH und 1 ml doppelt destilliertem Wasser. Ein Aliquot der Aminosäuren (3-8 µmol Gesamtaminosäuregehalt) wurde mit 1 ml Veresterungsreagenz, bestehend aus frisch vorbereitetem 1 mol x l^{-1} Thionylchlorid Lösung, in 2-Propanol gelöst und in mit Teflon abgedichteten Kappen verschlossenen Reaktionsgefäßen (16 x 100 mm) 60 min bei 100°C erhitzt. Das Produkt wurde unter Stickstoff bei 60°C getrocknet und in 100 µl wasserfreiem Pyridin gelöst. Die Acylierung erfolgte nach Zusatz von 100µl Pivaloylchlorid und 30 minütigem Erhitzen bei 60°C. Nach Abkühlung wurden 2 ml Dichlormethan zugesetzt. Anschließend erfolgte eine Reinigung

von überschüssigem Acylierungsreagenz und sonstigen die GC-Trennung beeinflussenden Verunreinigungen durch tropfenweise Passage durch eine Silicagel-Säule (60, 200-400 mesh, 4 cm x 4 mm). Das Filtrat wurde mit einem sanften Stickstofffluß bei Raumtemperatur eingeengt und zur Probeninjektion in Ethylacetat aufgelöst.

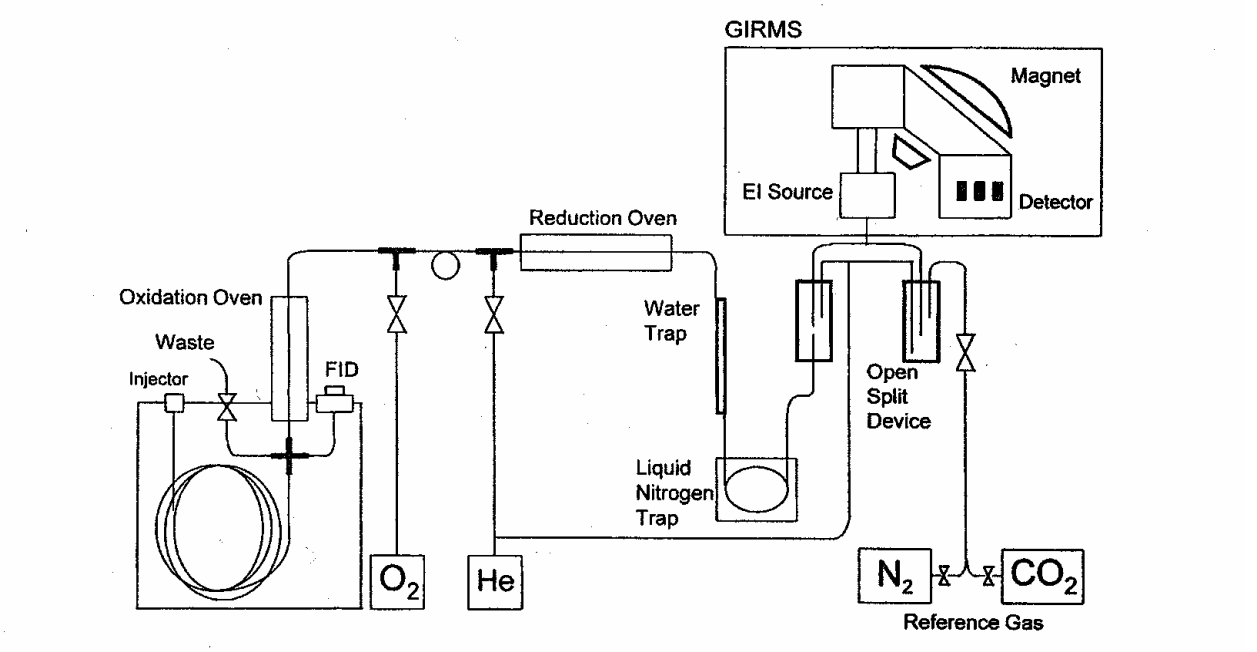

Abbildung 3.2: schematische Darstellung des GC-C-IRMS

Für die GC-Trennung der NPP-Derivate wurden eine Kapillarsäule (Ultra 2,50 m x 0.32 mm i.d.) und Helium als Trägergas (1 ml x min^{-1}) benutzt. 0.5 µl der Lösung wurden splitless injiziert (Injektortemperatur 280°C), und die Temperatur des Säulenofens wurde zunächst 1 min bei 70°C gehalten, dann mit 3°C x min^{-1} auf 220°C angehoben; der weitere Anstieg der Temperatur auf 300°C erfolgte mit 10°C x min^{-1} . Die Endtemperatur von 300°C wurde 8 min beibehalten. Eine Kalibrierung der Methode wurde während des Analysenlaufes zu definierten Zeitpunkten mittels Referenz-Stickstoffgas-Impulsen bekannter Isotopen- zusammensetzung durchgeführt.
Die Datenverarbeitung erfolgte mit ISODAT vendor ausgestatteter Software (Finnigan MAT). Die Sensitivität der Neigung für Peakanfang und Peakende wurde mit 0.2 und 0.4 mV x s^{-1} definiert.

Die ***[^{15}N] Anreicherung in Ammonium, Glutamin und Glutamat*** erfolgte mittels EI-GC-MS (Elektronenstoßionisation-Gaschromatograph-Massenspektrometrie, electron

ionization 70 eV) im SIM-Modus (selective ion monitoring (GC-MS, SSQ 710, Finnigan MAT, Bremen, gekoppelt mit einem Gaschromatographen Varian 3400, Varian Chromatography Systems, Walnut creek).

Die Messung der [^{15}N] Anreicherung im Ammonium wurde als Pentaflourobenzamid-derivat durchgeführt [41]. Zur Derivatisierung wurde gekühltes Plasma zu 1 ml 50 % igem, suspendiertem Ionenaustauscherharz (Dowex AG-50-X8-Na^+,K^+) bei neutralem pH hinzugefügt. Die Vorbereitung des Dowex erfolgte nach Yang et al. [36]. Nach dem Absetzen des Harzes wurde der Überstand verworfen und das Dowex drei mal mit destilliertem Wasser gewaschen. Das resuspendierte Harz wurde anschließend in individuelle Säulen gefüllt (0.5 x 2.5 cm) und mit 3 ml 4 mol x l^{-1} NaCl in Reaktionsgefäße (16 x 100 mm) eluiert, die 2 ml 5 %iges Natriumhydrogenkarbonat zur Freisetzung des Ammoniums sowie 15 µl Pentafluorobenzoylchlorid für die Derivatisierung enthielt. Das Gemisch wurde 5 min bei Raumtemperatur gevortext und anschließend das entstandene Pentafluorobenzamin (PFBA) durch 10 minütiges Extrahieren in 5 ml Ethylacetat in die organischen Phase überführt. Nach dem Verwerfen der wässrigen Phase wurde das Ethylacetat mit 2 ml 6 %iger Phosphorsäure gemischt und 30 s gevortext sowie über Natriumsulfat getrocknet und so für die GC-MS-Analytik verwendet.

Für die GC-Trennung der Pentaflourobenzamidderivats benutzten wir eine Kapillarsäule (DBWAX, 30m, 0.318 mm i.d., 0.25 µm Filmdicke; J&W Scientific, Folsom, CA) und Helium als Trägergas (1 ml x min^{-1} bei 250°C). 1 µl der Lösung wurde ohne Strömungsteilung (splitless) injiziert (Injektortemperatur 280°C), und die Temperatur des Säulenofens wurde zunächst innerhalb von 2 min von 50 auf 100°C erhöht, dann innerhalb von 6 min auf 250°C angehoben. Die Endtemperatur von 250°C wurde 10 min beibehalten. Die Quellen- und Transferlinetemperatur betrug 150 bzw. 300°C. Die Retentionszeit des Ammoniumderivats betrug unter diesen Bedingungen etwa 6.4 min. Im SIM-Modus (single ion monitoring) wurde die Intensität der vorrangigen protonisierten Ionen bei m/e = 211 (unmarkiertes Ammonium) und bei m/e = 212 ([^{15}N] Ammonium) gemessen. Die Berechnung der Anreicherung basierte auf dem tracer/tracee-Peakflächenverhältnis (212/211) unter Verwendung von Standard-lösungen mit steigendem Molverhältnis an [^{15}N] Ammonium im Verhältnis zu unmarkiertem Ammonium im Bereich 0-10 MFE (mole fraction excess) zur Kalibrierung.

Die Messung der [^{15}N] Anreicherung in Glutamin und Glutamat erfolgte nach Umwandlung in die tert-Butyldimethylsilyl (tBDMS) Derivate [42,43]. Die Proteine von 200 µl Plasma wurden mittels 2 ml eiskaltem Methanol ausgefällt. Nach Zentrifugation (1000 x g, 4°C, 10 min) wurde der Überstand unter N_2 bei 50°C eingeengt. Die Proben wurden in 2 ml 0.1 mol x l^{-1} HCl gelöst und auf individuelle Kationenaustauschersäulen geladen (1 ml Dowex 50W-X8, 200-400 mesh, vorgewaschen in der folgenden Reihenfolge: mit 2 mol x l^{-1} HCl, Wasser, 2 mol x l^{-1} NaOH, Wasser und in 0.1 mol x l^{-1} HCl aufbewahrt). Die Elution der Aminosäuren erfolgte nach dem Waschen jeder Säule (1 ml 0.01 mol x l^{-1} HCl) mit 3 ml 4 mol x l^{-1} NH_4OH in Reaktionsgefäße (16 x 100 mm) und anschließender Trocknung unter N_2 bei 60°C. Nach Zusatz von 70 µl Dimethylformamid und 30 µl *N-tert*-Butyldimethylsilyl-N-methyl-trifluoroacetamid (MTBSTFA) wurden die Proben in den mit PTFE-abgedichteten Kappen verschlossenen Reaktionsgefäßen für 30 min bei 105°C erhitzt und nach dem Abkühlen mittels GC-MS analysiert.

Für die GC-Trennung der tBDMS-Derivate wurde eine Kapillarsäule (DB-5MS, 30m, 0.25 mm i.d., 0.25 µm Filmdicke; J&W Scientific, Folsom, CA) und Helium als Trägergas (1 ml x min^{-1} bei 250°C) benutzt. 1 µl der Lösung wurde ohne Strömungsteilung (splitless) injiziert (Injektortemperatur 280°C). Die Temperatur des Säulenofens wurde zunächst innerhalb von 3 min von 155 auf 1190°C erhöht, dann innerhalb von 5 min auf 220°C und schließlich innerhalb von 10 min auf 290°C angehoben. Die Endtemperatur von 290°C wurde 10 min beibehalten. Die Quellen- und Transferlinetemperatur betrug 150 bzw. 300°C. Die Retentionszeiten der Glutamat- und Glutamin-tBDMS-Derivate betrugen unter diesen Bedingungen etwa 10.7 und 16.6 min. Im SIM-Modus wurde die Intensität der vorrangigen protonisierten Ionen ([M+H^+]-57) bei m/e = 432 (unmarkiertes Glutamat) und bei m/e = 433 (2-[^{15}N] Glutamat) gemessen. Bei m/e = 258 und 259 erfolgte die Messung entsprechend für unmarkiertes Glutamin welches nur Aminostickstoff enthielt und analog dazu für 2-[^{15}N] Glutamin. Bei m/e = 545 und 546 wurde unmarkiertes Glutamin mit Amino- und Amid-Stickstoff sowie 2-[^{15}N] Glutamin zusammen mit 5-[^{15}N] Glutamin gemessen. Aus der Differenz der Anreicherungen (m/e = 546 und m/e = 259) wurde die Anreicherung im Amid Stickstoff des Glutamins errechnet. Die Berechnung der Anreicherungen basierte auf den entsprechenden tracer/tracee-Peakflächenverhältnissen unter Verwendung von Standardlösungen mit steigendem Molverhältnis an 2-[^{15}N]-, 5-[^{15}N] Glutamin sowie 2-[^{15}N]-Glutamat im Verhältnis zu den unmarkierten Aminosäuren im Bereich 0-10 MFE (mole fraction excess) zur Kalibrierung.

3.5. Datenauswertung

Die [^{15}N] Anreicherung in Ammonium, Glutamin, Glutamat, Alanin, Glycin, Serin und Prolin wurde sowohl in den Basalproben als auch in den Proben 150 min, 195 min und 240 min nach der Infusion gemessen. Für jede Probe ergaben sich jeweils ein Wert ohne Anreicherung (count m+0) und ein Wert mit Anreicherung (count m+1). Die Verhältnisse der Werte m+1 / m+0 ergaben die area ratio-Werte (AR-Werte). Die gemittelten AR-Werte während der Infusion wurden von den gemittelten AR-Werte vor der Infusion abgezogen, woraus die area ratio excess-Werte (ARE-Werte) resultierten. Auf deren Basis wurden die area fraction excess-Werte (AFE-Werte) in % wie folgt berechnet:

$$AFE = ARE / (ARE + 1) * 100$$

Die AFE-Werte wurden mit dem Slope-Wert der Eichgerade AFE (gemessene Werte) gegen mole fraction (MF) (berechnete Werte) unter Verwendnung von Eichlösungen des jeweiligen [^{15}N] Metabolits im zu erwartenden Anreicherungsbereich multipliziert. Daraus ergaben sich mole fraction excess (MFE) oder mole % excess (MPE). Die Messung der Eichgerade erfolgte messtäglich zusammen mit den Plasmaproben zur weitgehenden Eliminierung von gerätespezifischen Fehlern.

Aus den gemessenen [^{15}N] Anreicherungen (MPE) in Ammonium, Glutamin, Glutamat, Alanin, Glycin, Serin und Prolin wurden arterio-venöse Differenzen ermittelt. Die Differenz A – VH ergibt den Substratumsatz im Splanchnikusgebiet, A – VMS ergibt den Substratumsatz im Darm, und die Differenz VMS – VH ergibt den Substartumsatz in der Leber. Die positiven Werte verweisen auf eine Abgabe und die negativen auf eine Aufnahme der jeweiligen Substrate.
Die arterio-venösen Differenzen wurden als organspezifische Umsätze definiert und im folgenden (Abbildung 3.3) sowohl rechnerisch als auch schematisch dargestellt.

A – VMS = Darmumsatz

A – VH = Umsatz im Splanchnikusgebiet

VMS – VH = Leberumsatz

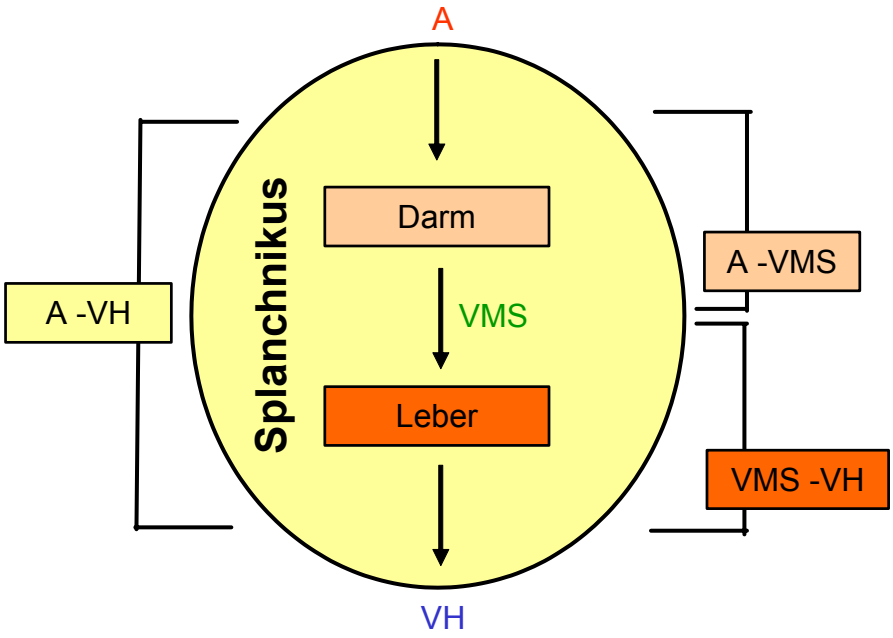

Abbildung 3.3: Schematische Darstellung der errechneten Stoffumsätze für den Darm (A – VMS), die Leber (VMS – VH) und des Splanchnikusgebiets (A – VH)

Die Abschätzung der Transferrate (%) des Amid- oder Amino-Stickstoffs aus dem infundierten 5-[^{15} N] Glutamin bzw. 2-[^{15} N] Glutamin in Ammonium und Aminosäuren des arteriellen Plasmas erfolgte aus dem Verhältnis zwischen der [^{15}N] Menge (n), die in Ammonium oder Aminosäure erscheint (µmol), und der applizierten [^{15}N] Menge (i) aus Glutamin (µmol x h^{-1}) der Nährstofflösung (Gleichung 1).

$$T = \frac{n \times 100}{i} \qquad \text{Gleichung 1}$$

Die [^{15}N]-Menge (n), die in Ammonium oder Aminosäure erscheint (µmol), wurde mit der Gleichung 2 errechnet:

$$n = E_P \times C_P \times V_{(pool)} \qquad \text{Gleichung 2}$$

E_p ist die [^{15}N] Anreicherung im Ammonium oder in den Aminosäuren (MPE). C_p ist die Konzentration von Ammonium oder Aminosäueren im Plasma (µmol x l^{-1}), und $V_{(pool)}$ ist die Plasmapoolgröße (L). Die Bestimmung der Plasmapoolgröße erfolgte mit Hilfe eines Nomogramms unter Berücksichtigung der Körpermasse, des Alters und Geschlechts [44].

3.6. Statistik

Für die statistische Auswertung der Daten wurde ein Modell der Varianzanalyse für kreuzklassifizierte Faktoren angewendet. Als feste Faktoren wurden die Art des Tracers (2-[^{15}N] oder 5-[^{15}N]) und der Entnahmeort (A, VH, VMS) sowie der postabsorptive und absorptive Zustand als wiederholter Zeitfaktor und entsprechende Wechselwirkungen in das Modell aufgenommen. Als zufälliger Effekt wurde der Patient innerhalb Tracer und Entnahmeort im Modell verwendet.
Die Berechnungen erfolgten mit der Prozedur MIXED des Programmpaketes SAS© (SAS Systems, Release 8.2, SAS Institute). Alle Tests wurden zu einem Risiko 1. Art p = 0.05 durchgeführt.
Falls signifikante Wechselwirkungen zu beobachten waren, wurde die post-hoc Test der Subklassen mit einer Tukey-Kramer Korrektur angewendet, um ein multiples Risiko 1. Art ≤ 0.05 sicherzustellen.

4. Ergebnisse

Die Tabelle 4.1 stellt die Ergebnisse der [^{15} N] Transferrate von 2-[^{15} N] bzw. 5-[^{15} N] Glutamin auf Ammonium und Aminosäuren ([^{15}N] Metabolite) dar. Die statistische Auswertung basiert auf eine einfaktorielle Varianzanalyse. Die P-Werte zeigen den Einfluss der duodenalen Gabe von 2-[^{15} N] vs. 5-[^{15} N] Glutamin auf die [^{15} N] Transferrate in verschiedenen [^{15} N] Metaboliten.

Die Tabelle 4.2 zeigt die arterio-venösen Differenzen als organspezifische Umsätze. Dabei beschreibt A – VH den Umsatz im gesamten Splanchnikusgebiet, A – VMS zeigt den Darmumsatz, und VMS – VH ergibt den Leberumsatz (siehe Abbildung 3.3). Die statistische Auswertung erfolgte in diesem Fall durch zweifaktorielle Varianzanalyse. Dabei sind die duodenale Gabe von 2-[^{15} N] bzw. 5-[^{15} N] Glutamin (Tracer) und die verschiedenen arterio-venösen Differenzen die beiden Einflussfaktoren, die unabhängig voneinander auf die verschiedenen [^{15} N] Metabolite wirken. Darüber hinaus wurde die Wechselwirkung der beiden genannten Einflussfaktoren auf die [^{15} N] Metabolite ausgewertet. In dieser Tabelle wurde der Wert, der einem signifikanten Effekt der Einflussfaktoren oder deren Wechselwirkung unterlag, je nach dem jeweiligen Signifikanzniveau mit einer Raute, einem § oder einem Sternchen gekennzeichnet.

In den Tabellen 4.3a und 4.3b sind die [^{15} N] Anreicherungen in den verschiedenen Metaboliten im Plasma aus der Arterie, Vena mesenterica superior und Vena hepatica nach der Applikation von 2-[^{15} N] oder 5-[^{15} N] Glutamin aufgeführt. Auch hier wurde der statistischen Analyse die zweifaktorielle Varianzanalyse zugrunde gelegt. Die verschiedenen applizierten Tracer (2-[^{15} N] bzw. 5-[^{15} N] Glutamin) und der Ort der Blutentnahme stellen die beiden unabhängig von einander wirkenden Einflussfaktoren auf die [^{15} N] Metabolite dar. Analog zur Tabelle 4.2 wurde auch hier die Wechselwirkung der beiden Faktoren auf [^{15} N] Metabolite statistisch ausgewertet.

In den Tabellen 4.4a und 4.4b sind die Substratkonzentrationen im Plasma der Arteria radialis (A), Vena mesenterica superior (VMS) und Vena hepatica (VH) der Patienten aus den beiden Tracergruppen (2-[^{15} N] und 5-[^{15} N] Glutamin) im postabsorptiven und absorptiven Zustand zusammengefasst. Mittels der dreifaktoriellen Varianzanalyse wurde der Effekt der verschiedenen Tracer (2-[^{15} N] bzw. 5-[^{15} N] Glutamin), der Effekt des

Orts der Blutentnahme und der Effekt der Zeit der Blutentnahme (postabsorptiv bzw. absorptiv) unabhängig von einander als drei Einflussfaktoren auf die Substratkonzentrationen ausgewertet. Im nächsten Schritt wurde die Wechselwirkung zwischen dem verschiedenen Tracer und der Zeit auf die Änderungen der Substratkonzentrationen beurteilt.

Tabelle 4.1

Least square Mittelwerte (± SE) der geschätzten [^{15}N]Transferrate (%) aus dem 2-[^{15}N] oder 5-[^{15}N] Glutamin auf Ammonium und Aminosäuren des arteriellen Plasmas nach der 240 minutigen duodenalen Applikation von 2-[^{15}N] oder 5-[^{15}N] Glutamin in einer Nährlösung.

Substrat	2-[^{15}N] Glutamin	5-[^{15}N] Glutamin	P-Wert
[^{15}N] Amm	0.05 ± 0.15	1.66 ± 0.15	0.000
2+5-[^{15}N] Gln	2.38 ± 0.47	5.53 ± 0.47	0.003
2-[^{15}N] Gln	2.53 ± 0.51	1.01 ± 0.51	n.s.
[^{15}N] Glu	1.06 ± 0.33	0.75 ± 0.33	n.s.
[^{15}N] Ala	2.05 ± 0.38	0.09 ± 0.38	0.011
[^{15}N] Gly	0.21 ± 0.03	0.04 ± 0.03	0.006
[^{15}N] Ser	0.10 ± 0.03	0.02 ± 0.03	n.s.
[^{15}N] Pro	0.50 ± 0.04	0.02 ± 0.04	0.000

n.s. = nicht signifikant.

Tabelle 4.2

Least square Mittelwerte (± SE) der arterio-venösen Differenzen (A-VMS, A-VH und VMS-HV) (MPE) aus den [^{15}N] Anreicherung in Ammonium und Aminosäuren nach der 240 minutigen duodenalen Applikation von 2-[^{15}N] oder 5-[^{15}N] Glutamin in Patienten mit Leberzirrhose und TIPS.

Substrat	2-[^{15}N] Glutamin			5-[^{15}N] Glutamin		
	A – VMS	A – VH	VMS – VH	A – VMS	A – VH	VMS – VH
[^{15}N] Amm	-0.02 ± 0.86	-0.14 ± 0.86	-0.13 ± 0.86	-0.77 ± 0.86	5.02 ± 0.86$^{(TxD)\#}$	5.78 ± 0.86$^{(TxD)\#}$
2+5-[^{15}N]Gln	0.15 ± 0.31	0.36 ± 0.31	0.2 ± 0.31	-0.07 ± 0.31	0.63 ± 0.31	0.7 ± 0.31$^{(TxD)*}$
2-[^{15}N] Gln	-0.65 ± 0.31$^{(TxD)*}$	0.26 ± 0. 31	0.91 ± 0.31$^{(TxD)*}$	-0.37 ± 0.31	-0.43 ± 0.31	-0.06 ± 0.31
[^{15}N] Glu	-0.48 ± 1.91	3.56 ± 1.91$^{(D)*}$	4.04 ± 1.91$^{(D)*}$	-1 ± 1.91	2.73 ± 1.91$^{(D)*}$	3.72 ± 1.91$^{(D)*}$
[^{15}N] Ala	0.19 ± 0.17	0.57 ± 0.17$^{(TxD)\S}$	0.29 ± 0.17	0.01 ± 0.17	-0.08 ± 0.17	-0.08 ± 0.17

T = 2-[^{15}N] oder 5-[^{15}N] Glutamin enthaltene Nährlösung

D = arterio-venösen Differenzen (A-VMS, A-VH und VMS-VH)

$^{\#}$ $p < 0.0001$

§ $p < 0.005$

* $p < 0.05$

Tabelle 4.3a

Mittelwerte (± SD) von [^{15}N] Anreicherungen (MPE) in Ammonium, Glutamin und Glutamat im arteriellen (A), mesenterialvenösen (VMS), und hepatalvenösen (VH) Blut nach der 240 minutigen duodenalen Applikation von 2-[^{15}N] oder 5-[^{15}N] Glutamin in einer Nährlösung

Substrat	Gefäß	2-[^{15}N] Glutamin	5-[^{15}N] Glutamin	P-Wert		
				T	E	T x E
[^{15}N] Amm						
	A	0.23 ± 0.27	7.36 ± 1.89	< 0.05	< 0.05	<0.05
	VMS	0.24 ± 0.20	8.13 ± 1.25			
	VH	0.37 ± 0.19	2.35 ± 0.44			
2+5-[^{15}N] Gln				< 0.05	n.s.	n.s.
	A	2.01 ± 0.46	3.19 ± 0.65			
	VMS	2.03 ± 0.95	3.27 ± 0.65			
	VH	1.53 ± 0.81	2.56 ± 0.72			
2-[^{15}N] Gln				< 0.05	n.s.	n.s.
	A	2.11 ± 0.48	0.67 ± 0.71			
	VMS	2.59 ± 0.81	1.05 ± 0.60			
	VH	1.67 ± 0.69	1.08 ± 0.92			
[^{15}N] Glu				n.s.	n.s.	n.s.
	A	9.36 ± 5.46	5.37 ± 5.04			
	VMS	6.79 ± 3.16	6.36 ± 5.07			
	VH	3.39 ± 1.38	2.64 ± 0.95			

T = 2-[^{15}N] oder 5-[^{15}N] Glutamin enthaltene Nährlösung

E = Blutentnahmeort (A, VMS oder VH)

n.s. = nicht signifikant.

Tabelle 4.3b

Mittelwerte (± SD) von [^{15}N] Anreicherungen (MPE) in ausgewählten Aminosäuren des arteriellen (A), mesenterialvenösen (VMS), und hepatalvenösen (VH) Bluts nach der 240 minutigen duodenalen Applikation von 2-[^{15}N] oder 5-[^{15}N] Glutamin in einer Nährlösung

Substrat	Gefäß	2-[^{15}N] Glutamin	5-[^{15}N] Glutamin	P-Wert		
				T	E	T x E
[^{15}N] Ala				< 0.05	n.s.	n.s.
	A	2.21 ± 0.35	0.10 ± 0.02			
	VMS	2.02 ± 0.42	0.08 ± 0.02			
	VH	1.70 ± 0.50	0.16 ± 0.06			
[^{15}N] Gly				< 0.05	n.s.	n.s.
	A	0.34 ± 0.07	0.06 ± 0.02			
	VMS	0.29 ± 0.04	0.05 ± 0.01			
	VH	0.30 ± 0.06	0.09 ± 0.04			
[^{15}N] Ser				< 0.05	n.s.	n.s.
	A	0.30 ± 0.14	0.06 ± 0.02			
	VMS	0.29 ± 0.13	0.04 ± 0.02			
	VH	0.35 ± 0.17	0.06 ± 0.04			
[^{15}N] Pro				< 0.05	n.s.	n.s.
	A	0.83 ± 0.11	0.04 ± 0.02			
	VMS	0.82 ± 0.09	0.03 ± 0.01			
	VH	0.76 ± 0.11	0.05 ± 0.04			

T = 2-[^{15}N] oder 5-[^{15}N] Glutamin enthaltene Nährlösung

E = Blutentnahmeort (A, VMS oder VH)

n.s. = nicht signifikant.

Tabelle 4.4a

Mittelwerte (± SD) der Ammonium-, Glutamin- und Glutamatkonzentrationen (µmol / L) im Plasma der Arterie (A), Vena mesenterica superior (VMS), und Vena hepatica (VH) vor und nach der 240 minutigen duodenalen Applikation von 2-[^{15}N] oder 5-[^{15}N] Glutamin in einer Nährlösung.

Substrat	Gefäß	2-[^{15}N] Glutamin		5-[^{15}N] Glutamin		P-Wert			
		Postabsorptiv	absorptiv	postabsorptiv	absorptiv	T	E	Z	TxZ
Amm						n.s.	<0.05	n.s.	n.s.
	A	43.17 ± 9.3	55.9 ± 11.4	48.0 ± 14.11	76.9 ± 37.8				
	VMS	91.5 ± 38.4	79.0 ± 25.2	122.0 ± 52.7	132.7 ± 46.4				
	VH	28.2 ± 8.4	35.6 ± 11.8	20.4 ± 18.7	39.0 ± 25.4				
Gln						<0.05	n.s.	<0.05	n.s.
	A	483.4 ± 48.1	353.7 ± 40.9	626.6 ± 125.0	527.8 ± 103.5				
	VMS	396.9 ± 89.6	346.8 ± 29.7	510.5 ± 86.4	458.7 ± 131.5				
	VH	247.7 ± 91.8	247.1 ± 84.2	571.8 ± 239.0	470.9 ± 185.3				
Glu						n.s.	< 0.05	n.s.	n.s.
	A	36.4 ± 11.0	35.9 ± 10.3	54.1 ± 8.9	48.6 ± 9.2				
	VMS	37.9 ± 18.6	36.5 ± 10.1	50.8 ± 9.0	45.0 ± 8.3				
	VH	212.8 ± 91.5	188.6 ± 67.5	133.9 ± 67.8	124.6 ± 49.4				

T = 2-[^{15}N] oder 5-[^{15}N] Glutamin enthaltene Nährlösung

E = Blutentnahmeort (A, VMS oder VH)

Z = vor (postabsorptiv) oder nach (absorptiv) der duodenalen Applikation von 2-[^{15}N] oder 5-[^{15}N] Glutamin

n.s. = nicht signifikant.

Tabelle 4.4b

Mittelwerte (± SD) der ausgewählten Aminosäurenkonzentrationen (µmol / L) im Plasma der Arterie (A), Vena mesenterica superior (VMS), und Vena hepatica (VH) vor und nach der 240 minutigen duodenalen Applikation von 2-[^{15}N] oder 5-[^{15}N] Glutamin in einer Nährlösung.

Substrat	Gefäß	2-[^{15}N] Glutamin		5-[^{15}N] Glutamin		P-Wert			
		postabsorptiv	absorptiv	postabsorptiv	absorptiv	T	E	Z	TxZ
Ala						n.s.	< 0.05	< 0.05	n.s.
	A	210.7 ± 33.5	269.7 ± 98.7	258.9 ± 42.9	289.7 ± 21.5				
	VMS	269.1 ± 71.0	315.1 ± 94.0	332.4 ± 26.8	364.4 ± 20.8				
	VH	171.5 ± 192.2	174.4 ± 122.9	115.2 ± 70.2	164.4 ± 79.3				
Gly						< 0.05	< 0.05	< 0.05	n.s.
	A	202.9 ± 21.0	179.0 ± 38.3	248.6 ± 55.7	203.3 ± 41.8				
	VMS	226.6 ± 38.2	195.9 ± 47.9	276.6 ± 61.1	226.7 ± 47.6				
	VH	118.0 ± 70.4	100.6 ± 53.1	192.7 ± 50.5	169.7 ± 49.5				
Ser						n.s.	n.s	< 0.05	n.s.
	A	108.3 ± 37.0	86.4 ± 21.6	134.4 ± 8.9	92.9 ± 16.8				
	VMS	123.7 ± 70.8	102.6 ± 20.8	136.4 ± 18.8	104.0 ± 17.8				
	VH	78.4 ± 22.9	64.7 ± 15.4	107.9 ± 33.5	72.4 ± 32.8				
Pro						n.s.	n.s.	< 0.05	n.s.
	A	229.7 ± 70.9	188.0 ± 67.4	200.1 ± 14.2	165.3 ± 9.5				
	VMS	265.7 ± 98.4	192.9 ± 89.9	211.2 ± 17.8	170.9 ± 9.9				
	VH	284.1 ± 151.8	221.4 ± 110.2	177.2 ± 27.7	139.4 ± 28.6				

T = 2-[^{15}N] oder 5-[^{15}N]-Glutamin enthaltene Nährlösung

E = Blutentnahmeort (A, VMS oder VH)

Z = vor (postabsorptiv) oder nach (absorptiv) der duodenalen Applikation von 2-[^{15}N] oder 5-[^{15}N]Glutamin

n.s. = nicht signifikant.

Ammonium

Die Ammoniumkonzentrationen im arteriellen, mesenterial- und hepatalvenösen Blut vor und nach der Applikation der verschiedenen Tracer enthaltenden Nährlösung sind in der Abbildung 4.1 graphisch dargestellt.

In der Multivarianzanalyse hatte der Blutentnahmeort als einziger der drei unabhängigen Faktoren einen signifikanten Effekt auf die Ammoniumkonzentration. Im einzelnen wies die V. mesenterica superior eine signifikant höhere Ammoniumkonzentration als die beiden anderen Blutgefäßen (A und VH) auf. Dies spricht für die intestinale Ammoniumproduktion. Entsprechend der hepatischen Ammoniumextraktion konnte die niedrigste Ammoniumkonzentration in der V. heptica gemessen werden. Die Art des Tracers (2-[^{15}N] vs. 5-[^{15}N] Glutamin), der Zeitfaktor (postabsorptiv vs. absorptiv) und deren Wechselwirkung hatten keinen signifikanten Einfluss auf die Ammoniumkonzentration (Tabelle 4.4a).

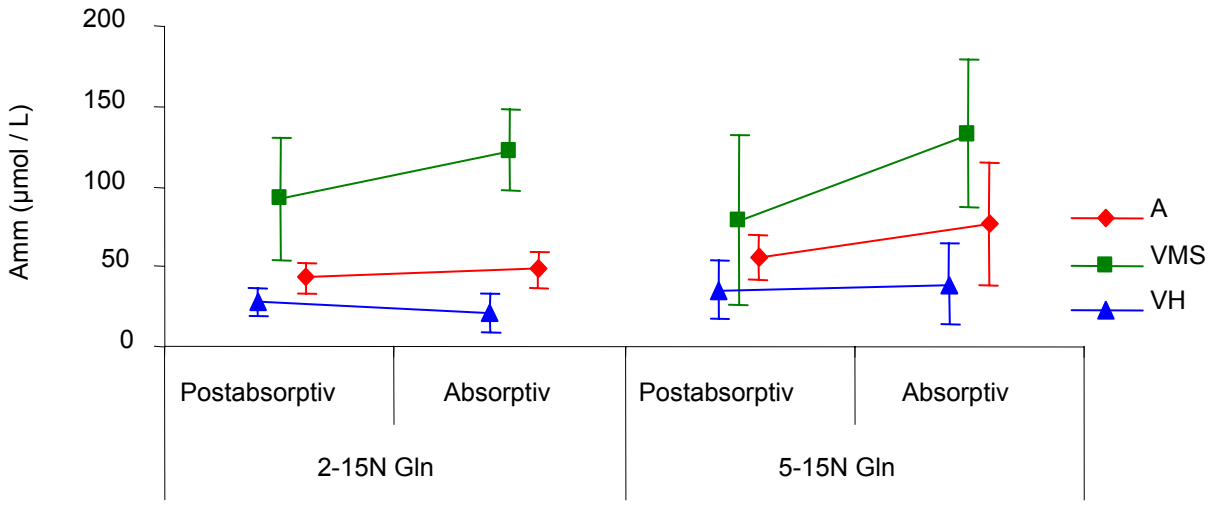

Abbildung 4.1: Ammoniumkonzentration arteriell (A), mesenterialvenös (VMS) und hepatalvenös (VH) postabsorptiv und absorptiv nach der Appliaktion von 2-[^{15}N] oder 5-[^{15}N] Glutamin

Die [^{15}N] Anreicherung in Ammonium (Abbildung 4.2) war nach der Gabe von 5-[^{15}N] Glutamin in allen drei Blutgefäßen signifikant höher als nach der Gabe von 2-[^{15}N] Glutamin (Tabelle 4.3a). Die gegenüber VMS und A signifikant niedrige [^{15}N] Ammonium in der VH weist auf die hepatische Extraktion des [^{15}N] Ammoniums hin.

Aus der signifikanten Wechselwirkung zwischen dem Tracer und dem Blutentnahmeort läßt sich ableiten, dass das [^{15}N] Ammonium in der V. mesenterica superior und A. radialis

gegenüber der V. hepatica nach der Gabe von 5-[^{15}N] Glutamin, verglichen mit der [^{15}N] Ammonium nach der Gabe von 2-[^{15}N] Glutamin, signifikant höher liegt (Tabelle 4.3a). Dies deutet auf eine intestinale Ammoniogenese aus dem Amid-Stickstoff hin.

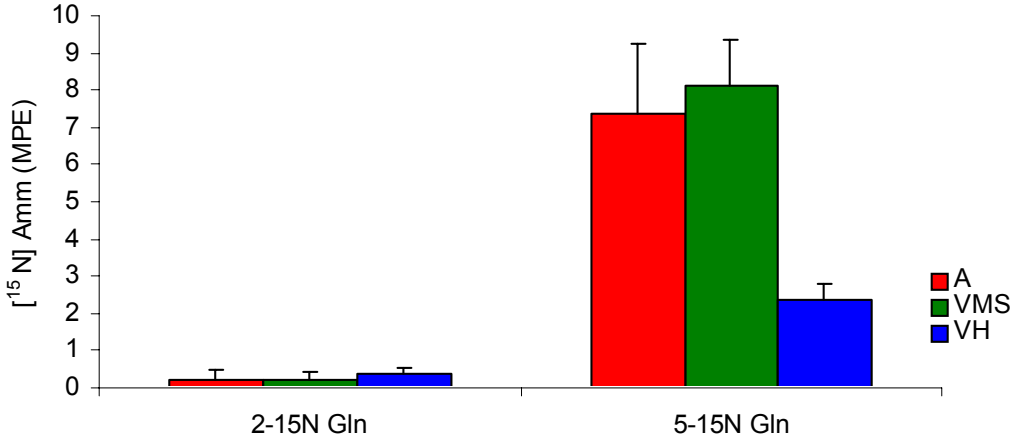

Abbildung 4. 2: [^{15}N] Anreicherung in Ammonium arteriell (A), mesenterialvenös (VMS) und hepatalvenös (VH) nach der Applikation von 2-[^{15}N] oder 5-[^{15}N] Glutamin

Die Transferrate des markierten Stickstoffs vom [^{15}N] Glutamin auf das [^{15}N] Plasmaammonium war nach der Infusion des amid-markierten Glutamins signifikant höher als nach der Infusion des amino-markierten Glutamins (Tabelle 4.1) (Abbildung 4.3).

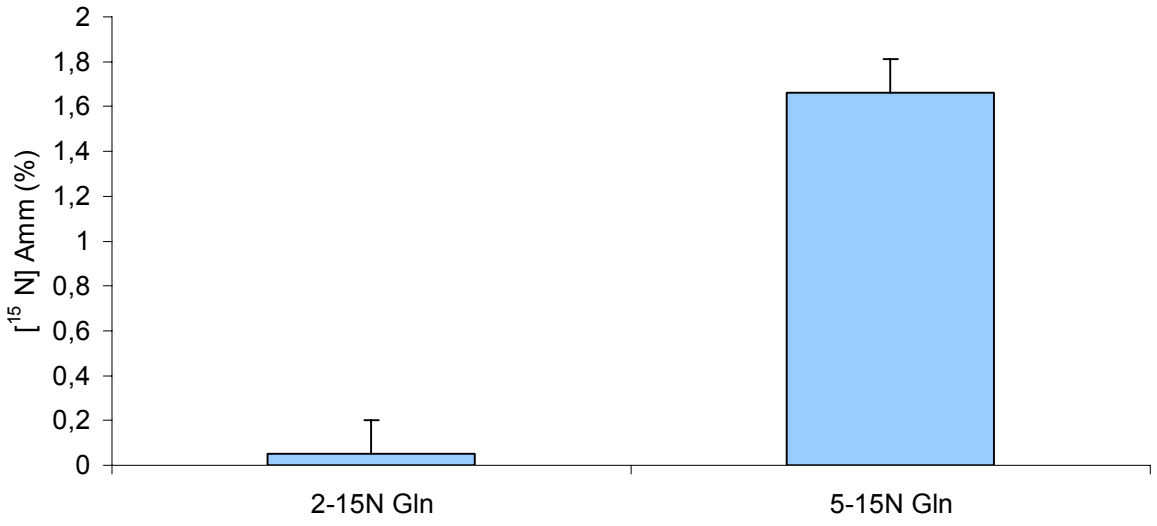

Abbildung 4. 3: [^{15}N] Transferrate auf Ammonium im arteriellen Plasma nach der Applikation von 2-[^{15}N] oder 5-[^{15}N] Glutamin

Die arterio-venösen Differenzen des [^{15}N] Ammoniums sind in der Abbildung 4.4 dargestellt. Durch die zweifaktorielle Multivarianzanalyse konnte sowohl ein signifikanter Effekt der Art des Tracers und der arterio-venösen Differenzen als auch deren Wechselwirkung auf den organspezifischen Umsatz des [^{15}N] Ammoniums festgestellt werden. Im einzelnen bedeutet dies, dass signifikante Organumsätze des Ammoniums nach der Gabe von Amid-markiertem Glutamin nachweisbar waren. Die signifikante Ammonium-Nettoextraktion im gesamten Splanchnikusgebiet nach der Applikation von 5-[^{15}N] Glutamin ist das Ergebnis einer intestinalen Abgabe und einer signifikanten hepatischen Extraktion (Tabelle 4.2).

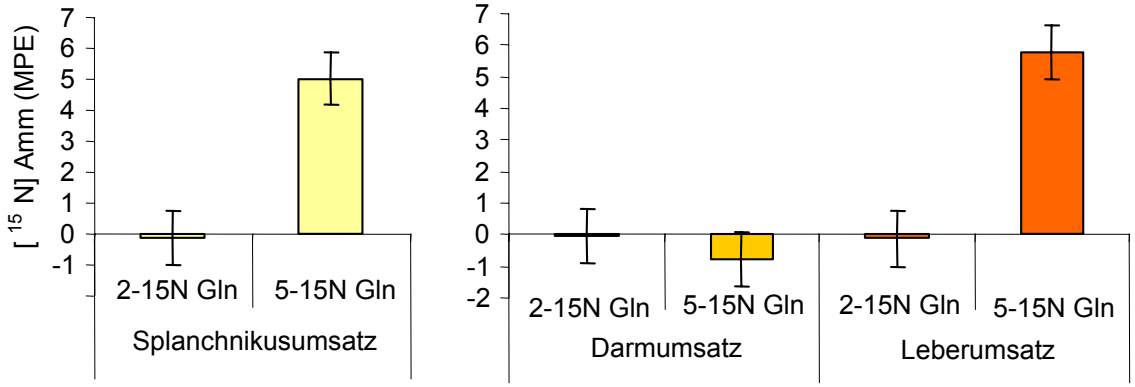

Abbildung 4. 4: Arterio-venöse Differenzen von [^{15}N] Ammonium als spezifischer Splanchnikus-, Darm- und Leberumsatz nach der Appliaktion von 2-[^{15}N] oder 5-[^{15}N] Glutamin

Glutamin

Die Glutaminkonzentrationen sind in der Abbildung 4.5 graphisch dargestellt.
In der dreifaktoriellen Varianzanalyse zeigten die Art des Tracers (2-[^{15}N] vs. 5-[^{15}N] Glutamin) und der Zeitfaktor (postabsorptiv vs. absorptiv) unabhängig von einander einen signifikanten Effekt auf die Glutaminkonzentration (Tabelle 4.4a).

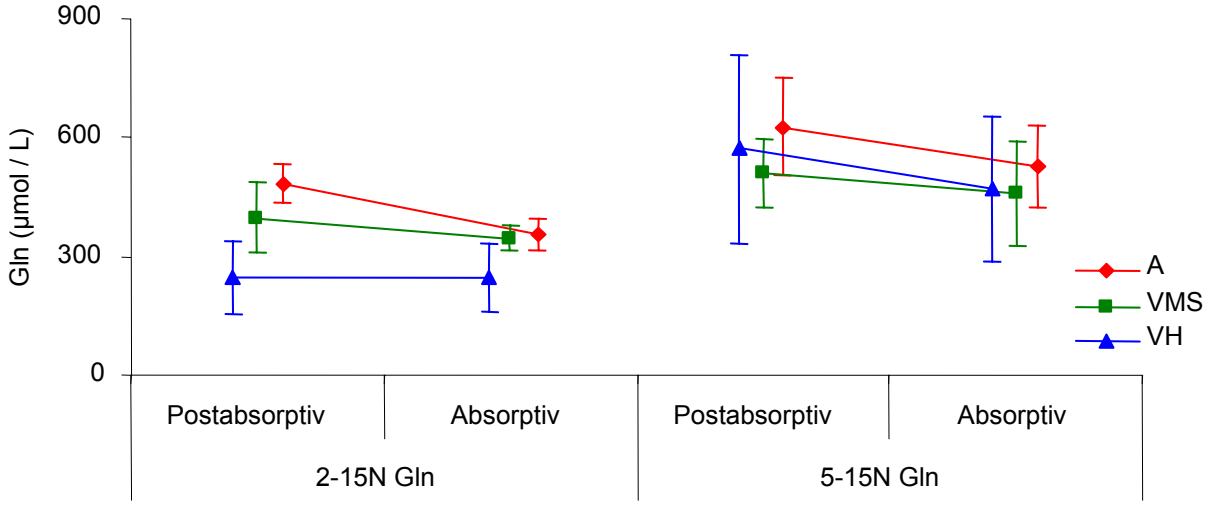

Abbildung 4.5: Glutaminkonzentration arteriell (A), mesenterialvenös (VMS) und hepatalvenös (VH) postabsorptiv und absorptiv nach der Applikation von 2-[^{15}N] oder 5-[^{15}N] Glutamin

Aus methodischen Gründen war es möglich, entweder die [^{15}N] Anreicherung in beiden Stickstoffgruppen oder nur in der Amino-Gruppe des Glutamins zu messen. Die separate Messung der [^{15}N] Anreicherung in der Amid-Gruppe des Glutamins war nicht möglich.
Die Art des Tracers, unabhängig vom Blutentnahmeort, hatte einen signifikanten Effekt auf die [^{15}N] Anreicherung sowohl in 2+5-[^{15}N] Glutamin (Abbildung 4.6) als auch in 2-[^{15}N] Glutamin (Abbildung 4.8) (Tabelle 4.3a). Das bedeutet, daß die [^{15}N] Anreicherung in 2+5-[^{15}N] Glutamin nach der Gabe von 5-[^{15}N] Glutamin signifikant höher als nach der Gabe von 2-[^{15}N] Glutamin lag. Ebenso interessant ist die [^{15}N] Transferrate auf das 2+5-[^{15}N] Glutamin (Abbildung 4.7), die nach der Gabe von 5-[^{15}N] Glutamin signifikant höher als nach der Gabe von 2-[^{15}N] Glutamin war. Diese beiden Befunde sprechen für eine Übertragung des Amid-Stickstoffes zum Amino-Stickstoff.

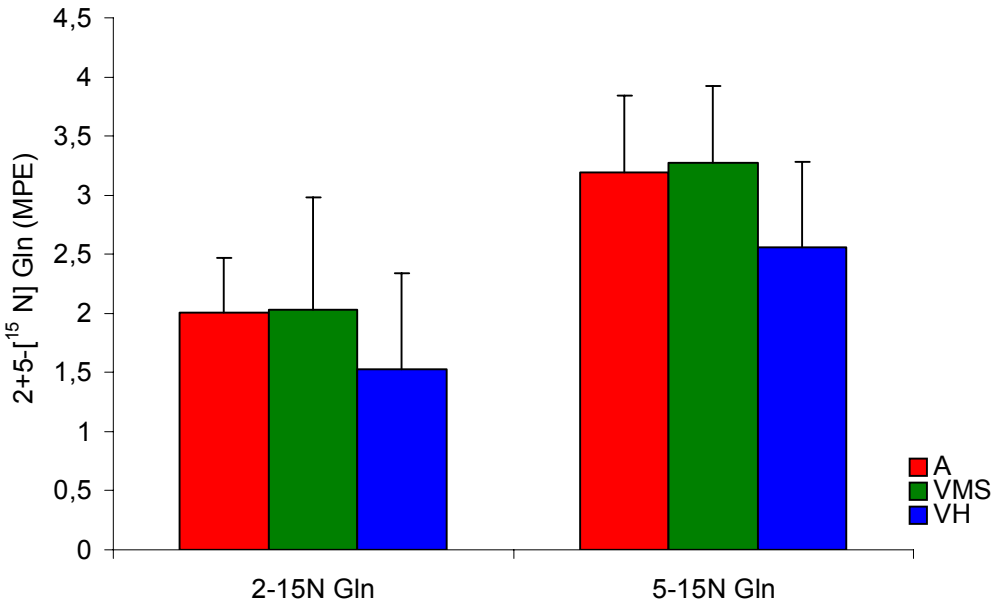

Abbildung 4. 6: [^{15}N] Anreicherung in 2+5[^{15}N] Glutamin arteriell (A), mesenterialvenös (VMS) und hepatalvenös (VH) nach der Applikation von 2-[^{15}N] oder 5-[^{15}N] Glutamin

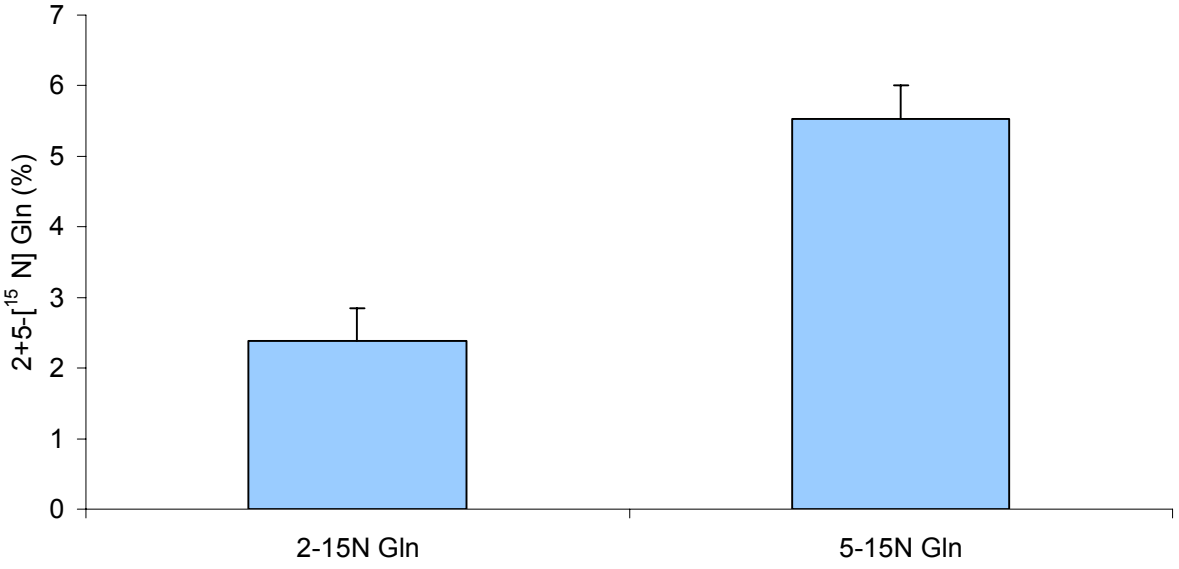

Abbildung 4. 7: [^{15}N] Transferrate auf 2+5[^{15}N] Glutamin im arteriellen Plasma nach der Applikation von 2-[^{15}N] oder 5-[^{15}N] Glutamin

Entsprechend der oben genannten Ergebnisse bezüglich des Transfers vom Amid- zum Amino-Stickstoff war die [^{15}N] Anreicherung in 2-[^{15}N] Glutamin zwar nach der Gabe von 2-[^{15}N] Glutamin signifikant höher als nach der Gabe von 5-[^{15}N] Glutamin (Tabelle

4.3a und Abbildung 6.8), aber die [^{15}N] Tranferrate auf 2-[^{15}N] Glutamin in beiden Tracergruppen unterschied sich nicht (Tabelle 4.1 und Abbildung 6.9).

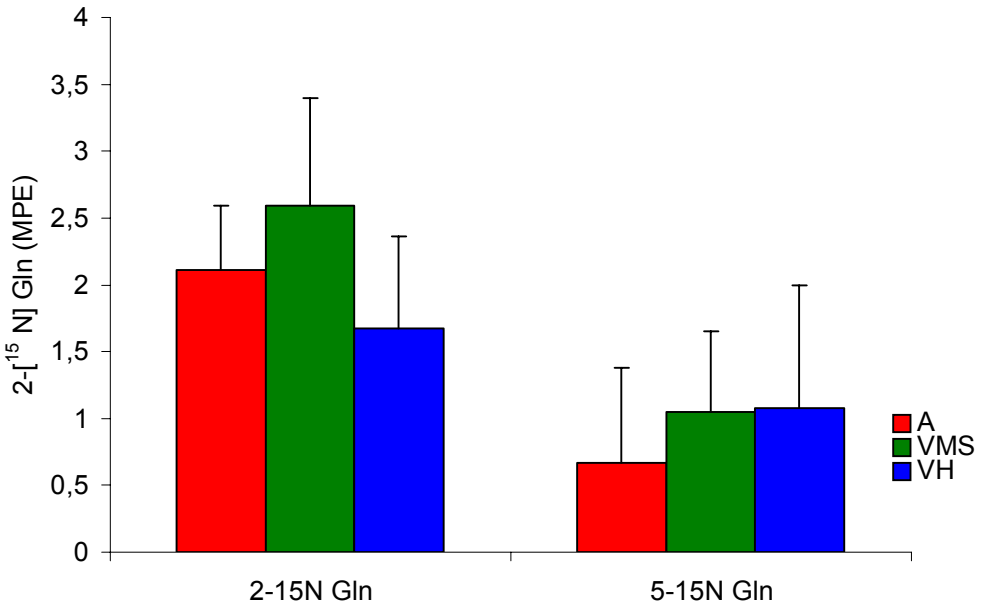

Abbildung 4. 8: [^{15}N] Anreicherung in 2-[^{15}N] Glutamin arteriell (A), mesenterialvenös (VMS) und hepatalvenös (VH) nach der Applikation von 2-[^{15}N] oder 5-[^{15}N] Glutamin

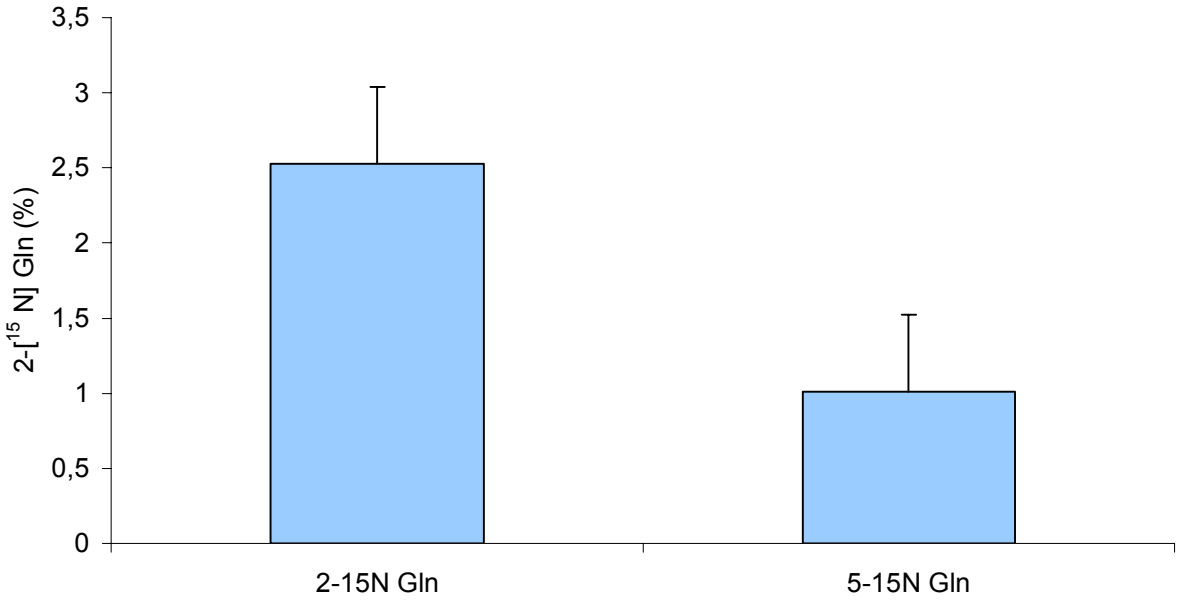

Abbildung 4. 9: [^{15}N] Transferrate auf 2-[^{15}N] Glutamin im arteriellen Plasma nach der Applikation von 2-[^{15}N] oder 5-[^{15}N] Glutamin

Aus den arterio-venösen Differenzen (Tabelle 4.4) lässt sich eine signifikante hepatische Extraktion des 2+5-[^{15}N] Glutamins nach der Applikation von 5-[^{15}N] Glutamin erkennen (Abbildung 4.10). Es liegt eine signifikante intestinale Abgabe und hepatische Extraktion des 2-[^{15}N] Glutamins nach der duodenalen Applikation von Amino-markiertem Glutamin, verglichen mit der Applikation von Amid-markiertem Glutamin, vor (Abbildung 4.11).

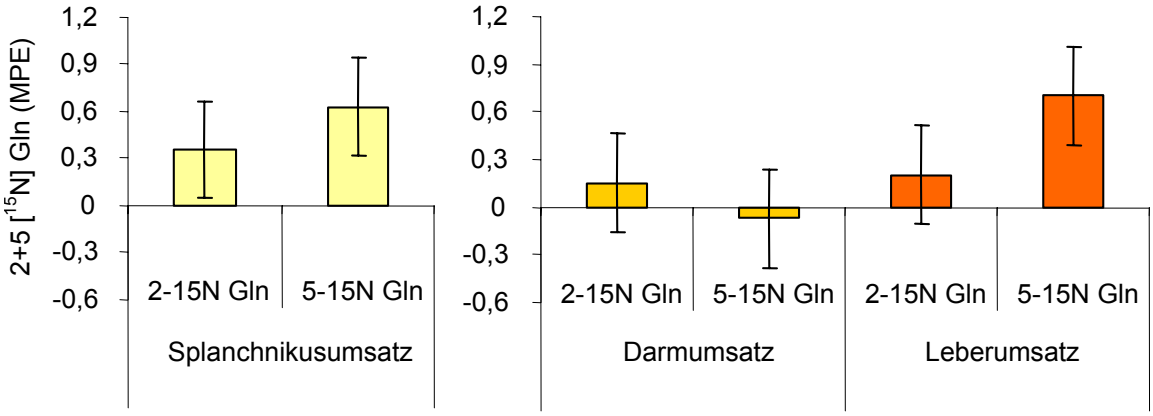

Abbildung 4. 10: Arterio-venöse Differenzen von 2+5-[^{15}N] Glutamin als spezifischer Splanchnikus-, Darm- und Leberumsatz nach der Applikation von 2-[^{15}N] oder 5-[^{15}N] Glutamin

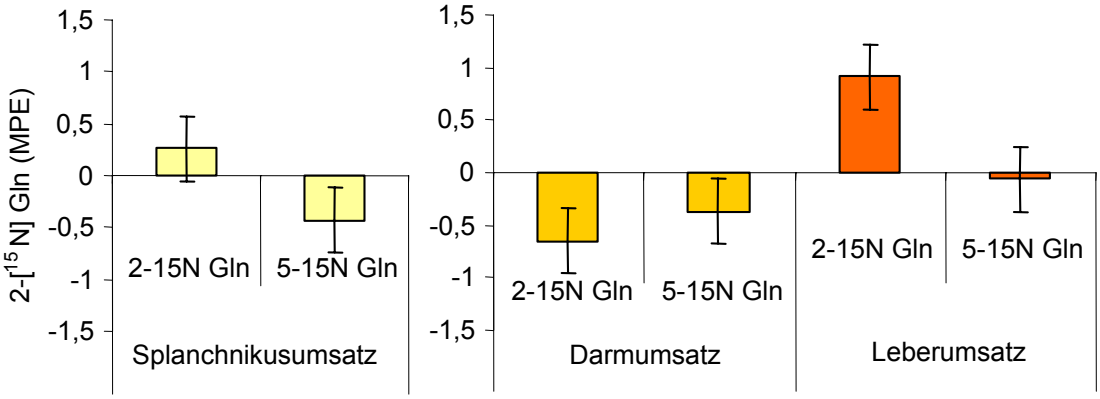

Abbildung 4. 11: Arterio-venöse Differenzen von 2-[^{15}N] Glutamin als spezifischer Splanchnikus-, Darm- und Leberumsatz nach der Applikation von 2-[^{15}N] oder 5-[^{15}N] Glutamin

Glutamat

Die Multivarianzanalyse zeigte lediglich einen signifikanten Einfluß des Blutentnahmeortes als unabhängiger Faktor auf die Glutamatkonzentrationen (Tabelle 4.4a). Daraus ist erkennbar, dass die Glutamatkonzentration in der V.hepatica signifikant höher lag als die Glutamatkonzentration in der V. mesenterica superior und A. radialis (Abbildung 4.12).

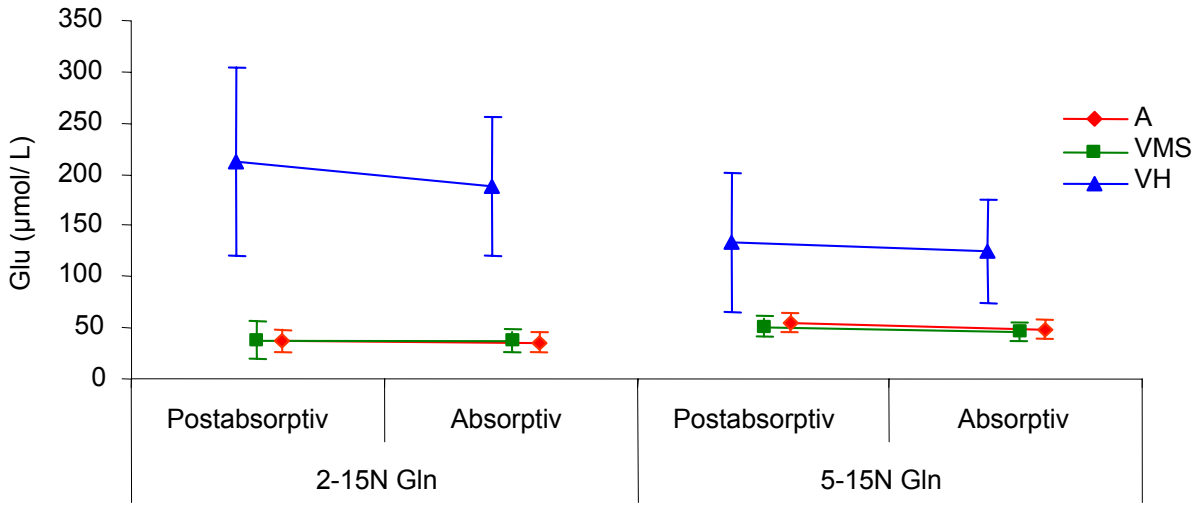

Abbildung 4.12: Glutamatkonzentration arteriell (A), mesenterialvenös (VMS) und hepatalvenös (VH) postabsorptiv und absorptiv nach der Applikation von 2-[^{15}N] oder 5-[^{15}N] Glutamin

Weder die Art des Tracers (2-[^{15}N] vs. 5-[^{15}N] Glutamin) noch der Ort der Blutentnahme (A vs. VMS vs. VH) hatten einen signifikanten Einfluß auf die [^{15}N] Anreicherung in [^{15}N] Glutamat (Tabelle 4.3a und Abbildung 4.13) .

Interessanterweise war auch die [^{15}N] Transfer (Tabelle 4.2) nach der Infusion der verschieden markierten Stickstoffgruppen auf das [^{15}N] Glutamat nicht signifikant unterschiedlich (Abbildung 4.14).

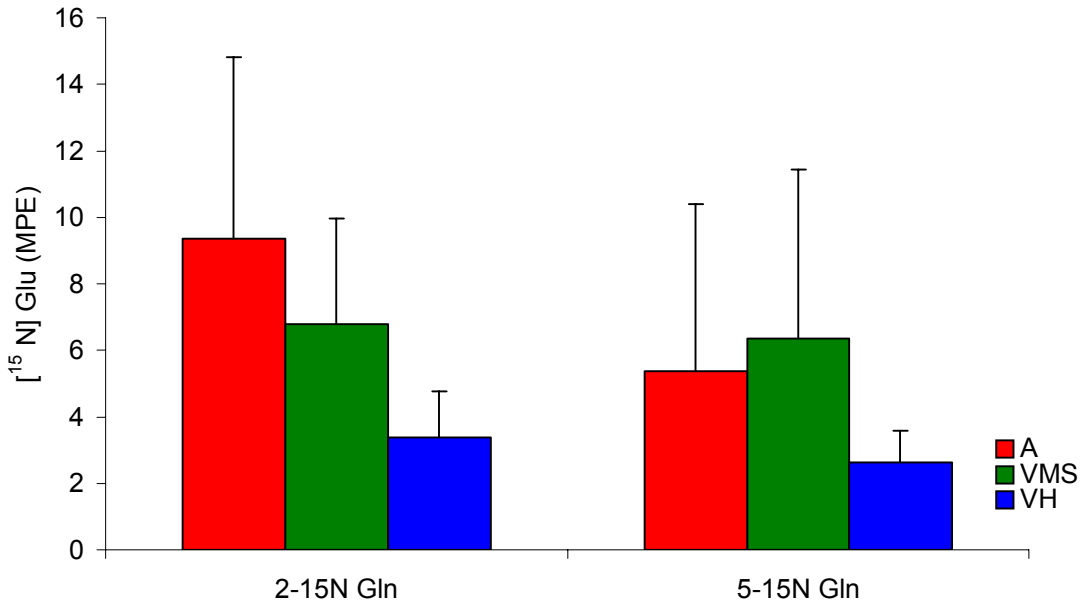

Abbildung 4. 13: [^{15}N] Anreicherung in Glutamat arteriell (A), mesenterialvenös (VMS) und hepatalvenös (VH) nach der Applikation von 2-[^{15}N] oder 5-[^{15}N] Glutamin

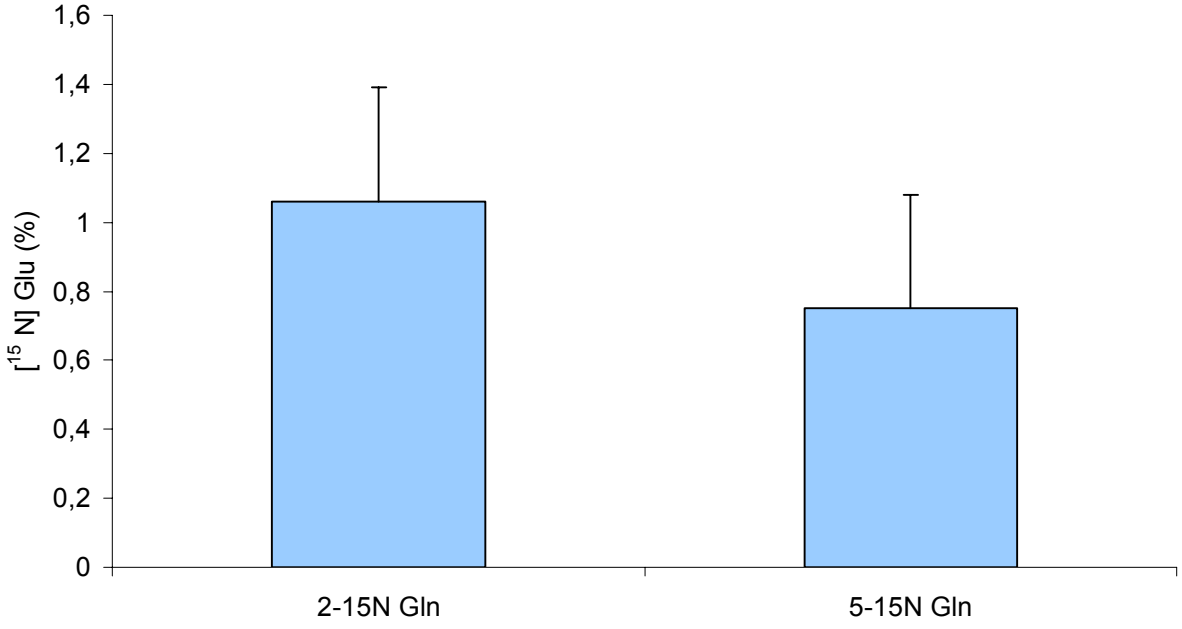

Abbildung 4. 14: [^{15}N] Transferrate auf Glutamat im arteriellen Plasma nach der Applikation von 2-[^{15}N] oder 5-[^{15}N] Glutamin

Im Falle des [^{15}N] Glutamats weisen die arterio-venösen Differenzen (Tabelle 4.4) darauf hin, dass die signifikante Extraktion des Amino-Stickstoffes des Glutamats im gesamten Splanchnikusgebiet hauptsächlich durch die signifikante Extraktion in der Leber zustande kommt (Abbildung 4.15).

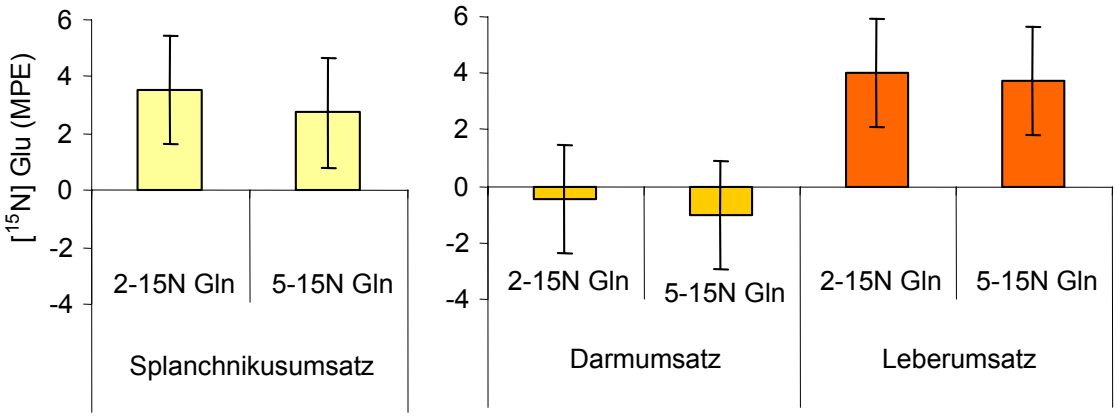

Abbildung 4.15: arterio-venöse Differenzen des [^{15}N] Glutamats als spezifische Splanchnikus-, Darm- und Leberumsatz nach der Applikation von 2-[^{15}N] oder 5-[^{15}N] Glutamin

Alanin

Die signifikante Wirkung des Zeitfaktors (postabsorptiv vs. absorptiv) auf die Alaninkonzentrationen zeigt den Anstieg der Alaninkonzentration nach der Gabe der Nährlösung (Tabelle 4.4b). Der signifikante Einfluß des Blutentnahmeortes auf die Alaninkonzenration zeigt die signifikant hohe Alaninkonzentration in der A. radialis und V. mesenterica superior gegenüber die in der V. hepatica (Abbildung 4.16).

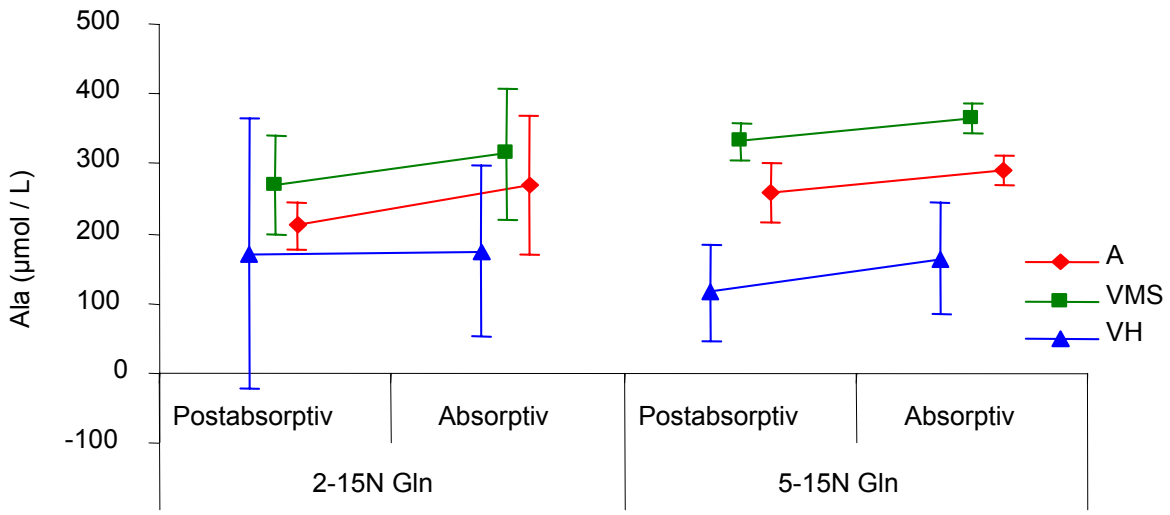

Abbildung 4.16: Alaninkonzentration arteriell (A), mesenterialvenös (VMS) und hepatalvenös (VH) postabsorptiv und absorptiv nach der Applikation von 2-[^{15}N] oder 5-[^{15}N] Glutamin

Die [^{15}N] Anreicherung in Alanin (Tabelle 4.3b) war nach der Applikation von 2-[^{15}N] Glutamin signifikant höher als nach der Applikation von 5-[^{15}N] Glutamin (Abbildung 4.17).

Die Übertragung des markierten Stickstoffes auf das Alanin (Tabelle 4.1) war nach der Applikation von Amino-markiertem Glutamin 22 mal höher als die Übertragung nach der Applikation von amid-markiertem Glutamin (Abbildung 4.18).

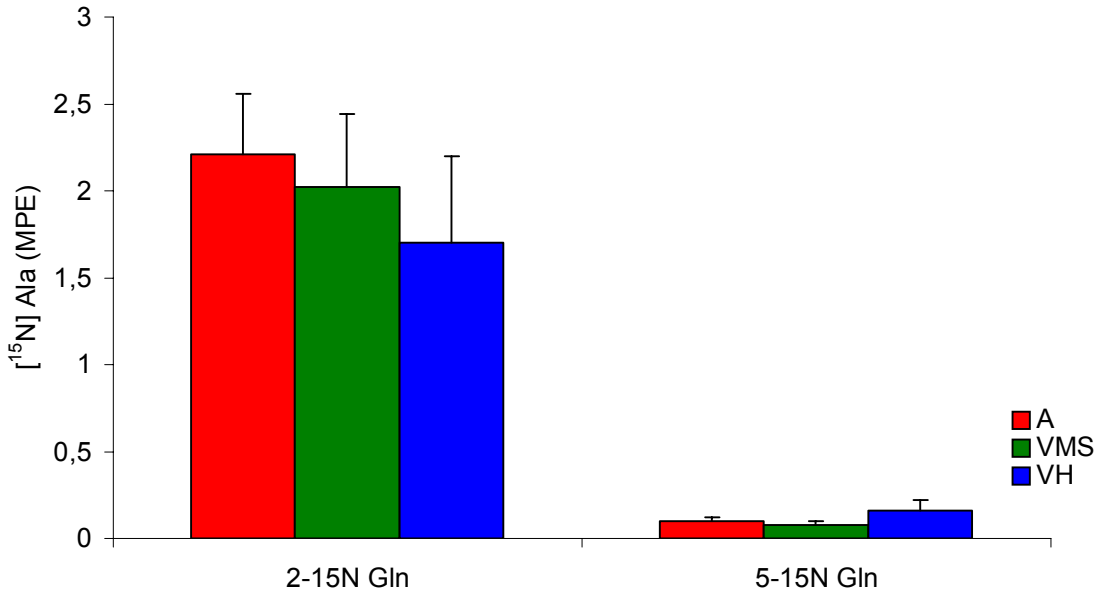

Abbildung 4. 17: [^{15}N] Anreicherung in Alanin arteriell (A), mesenterialvenös (VMS) und hepatalvenös (VH) nach der Applikation von 2-[^{15}N] oder 5-[^{15}N] Glutamin

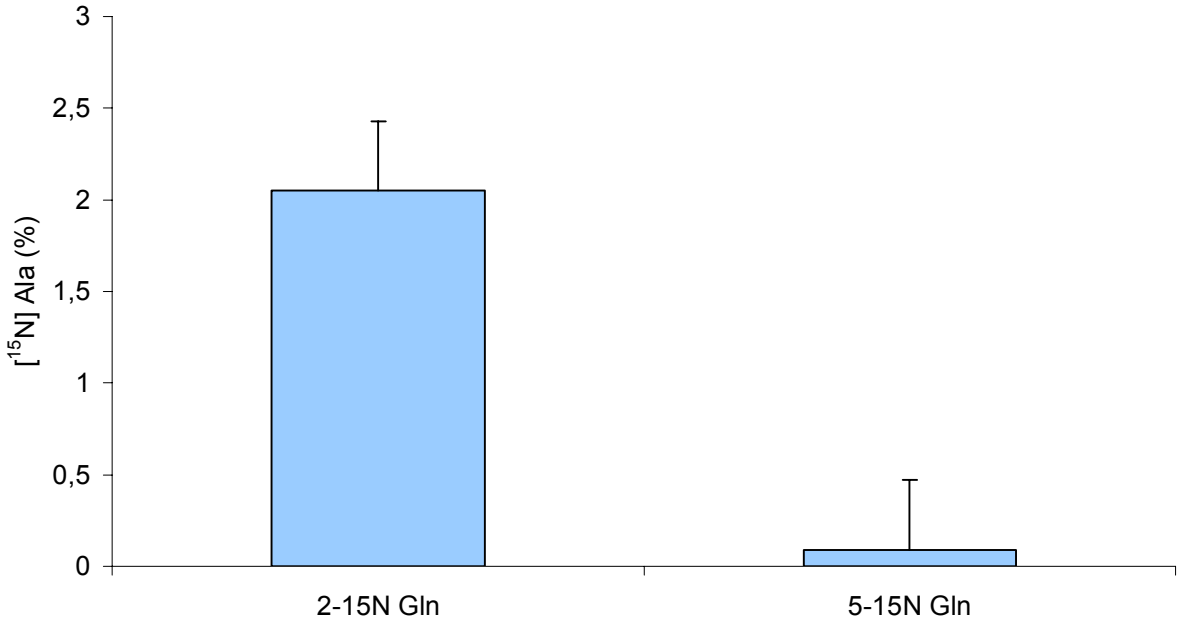

Abbildung 4. 18: [^{15}N] Transferrate auf Alanin im arteriellen Plasma nach der Applikation von 2-[^{15}N] oder 5-[^{15}N] Glutamin

Obwohl die Nettoumsätze für Alanin sowohl im Darm als auch in der Leber keine Signifikanz erreichten, konnte eine signifikante Extraktion des Alanins im gesamten Splanchnikusgebiet nach der Applikation von 2-[^{15} N] Glutamin nachgewiesen werden (Abbildung 4.19).

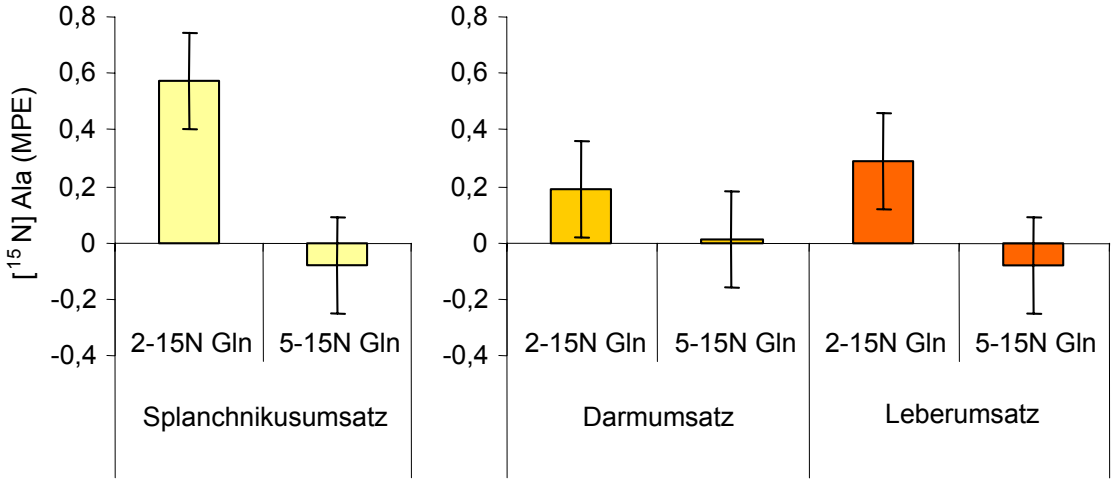

Abbildung 4.19: arterio-venöse Differenzen des [^{15} N] Alanins als spezifischer Splanchnikus-, Darm- und Leberumsatz nach der Applikation von 2-[^{15} N] oder 5-[^{15} N] Glutamin

Glycin

Sowohl der Tracer (2-[^{15}N] vs. 5-[^{15}N] Glutamin) als auch der Blutentnahmeort (A vs. VMS vs. VH) und der Zeitfaktor (postabsorptiv vs. absorptiv) als unabhängige Einflußfaktoren hatten eine signifikante Wirkung auf Glycinkonzentrationen (Tabelle 4.4b). Es ließ sich einerseits ein signifikanter Abfall der Konzentration nach der Gabe der Nährlösung nachweisen, andererseits waren die Konzentrationen in der Arterie und V. mesenterica superior signifikant höher als in der V. hepatica. Des weiteren konnte in der Gruppe mit der 2-[^{15}N] Glutamin-Applikation signifikant niedrigere Konzentrationen gemessen werden als in der Gruppe mit der 5-[^{15}N] Glutamin-Applikation. Der signifikante Effekt des Tracers ist aber auf die individuelle Unterschiede zurückzuführen.

Allerdings war die Wechselwirkung von Tracer und Zeitfaktor auf die Glycinkonzentration nicht signifikant (Abbildung 4.20).

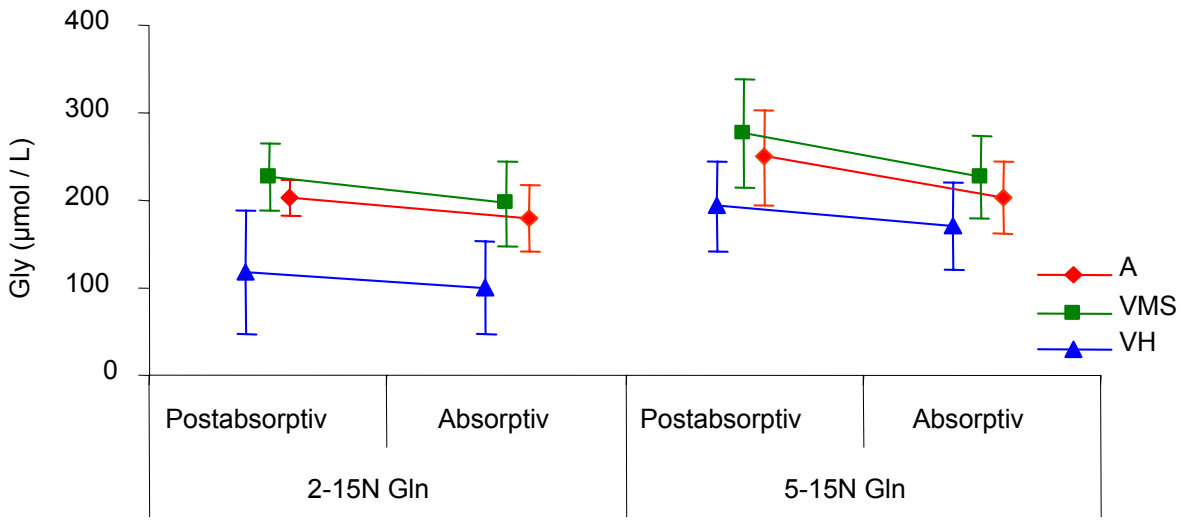

Abbildung 4. 20: Glycinkonzentration arteriell (A), mesenterialvenös (VMS) und hepatalvenös (VH) postabsorptiv und absorptiv nach der Applikation von 2-[^{15}N] oder 5-[^{15}N] Glutamin

Die [^{15}N] Anreicherung in Glycin (Tabelle 4.3b) war analog zum Alanin nach der Gabe von Amino-markiertem Glutamin signifikant höher als nach der Gabe von Amid-markiertem Glutamin (Abbildung 4.21). Der Blutentnahmeort wies keinen signifikanten Effekt auf die [^{15}N] Glycin auf.

Ebenso wie bei Alanin war die Übertragung von markiertem Stickstoff auf Glycin nach der Gabe von 2-[^{15} N] Glutamin signifikant höher als nach der Gabe von 5-[^{15} N] Glutamin (Tabelle 4.1 und Abbildung 4.22).

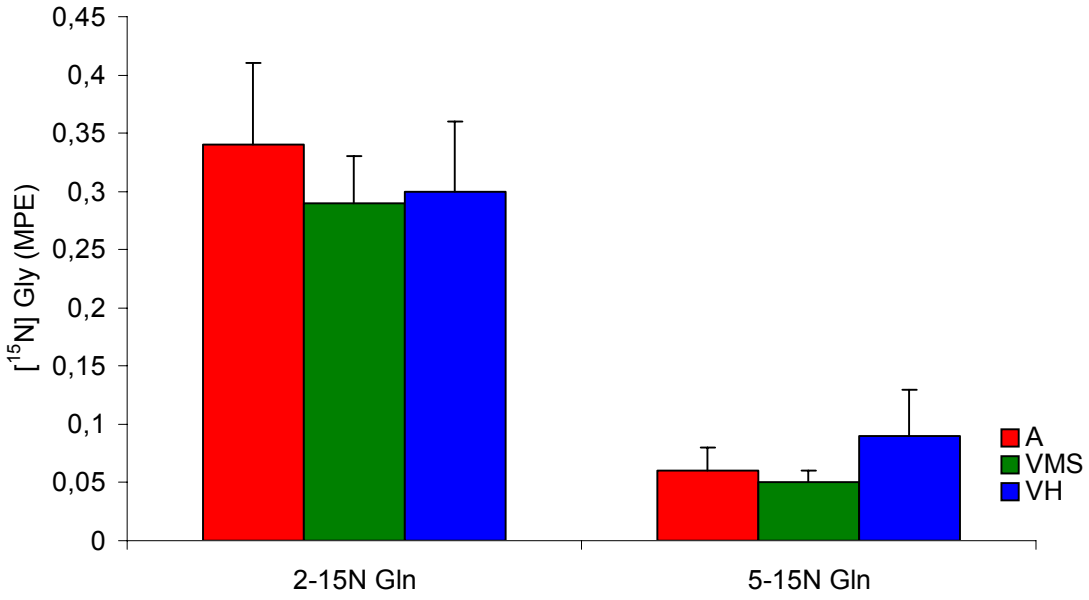

Abbildung 4. 21: [^{15} N] Anreicherung in Glycin arteriell (A), mesenterialvenös (VMS) und hepatalvenös (VH) nach der Applikation von 2-[^{15} N] oder 5-[^{15} N] Glutamin

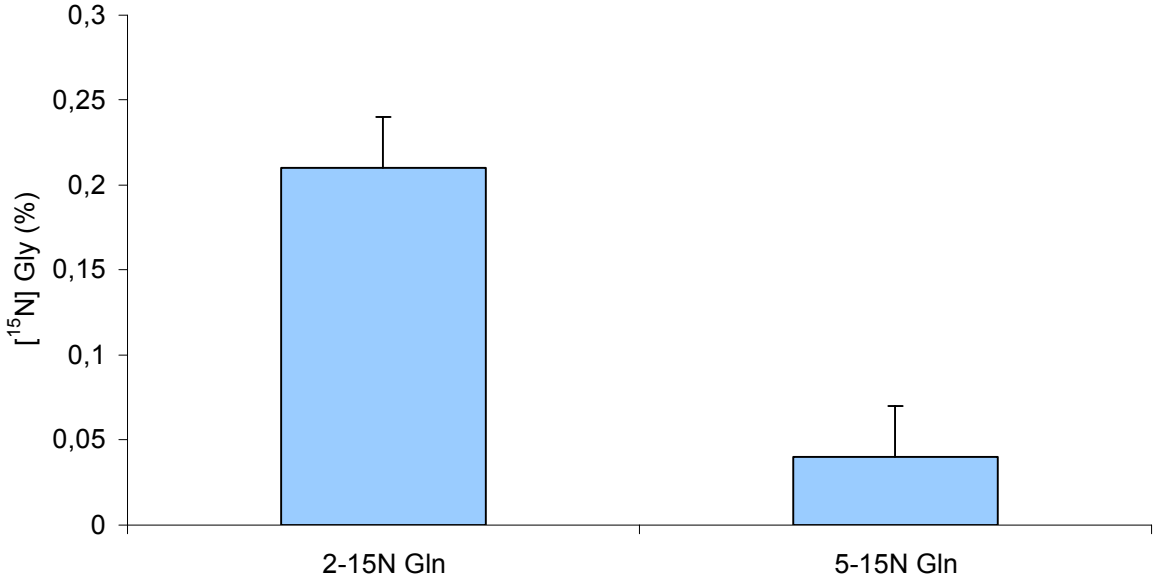

Abbildung 4. 22: [^{15} N] Transferrate auf Glycin im arteriellen Plasma nach der Applikation von 2-[^{15} N] oder 5-[^{15} N] Glutamin

Serin

Die Serinkonzentrationen (Tabelle 4.4b) fielen nach der Applikation der Nährlösung (absorptiv) ungeachtet der Art des Tracers und des Orts der Blutentnahme signifikant ab. Der Einfluß des Tracers und des Orts der Blutentnahme auf die Serinkonzentration war nicht signifikant (Abbildung 4.23).

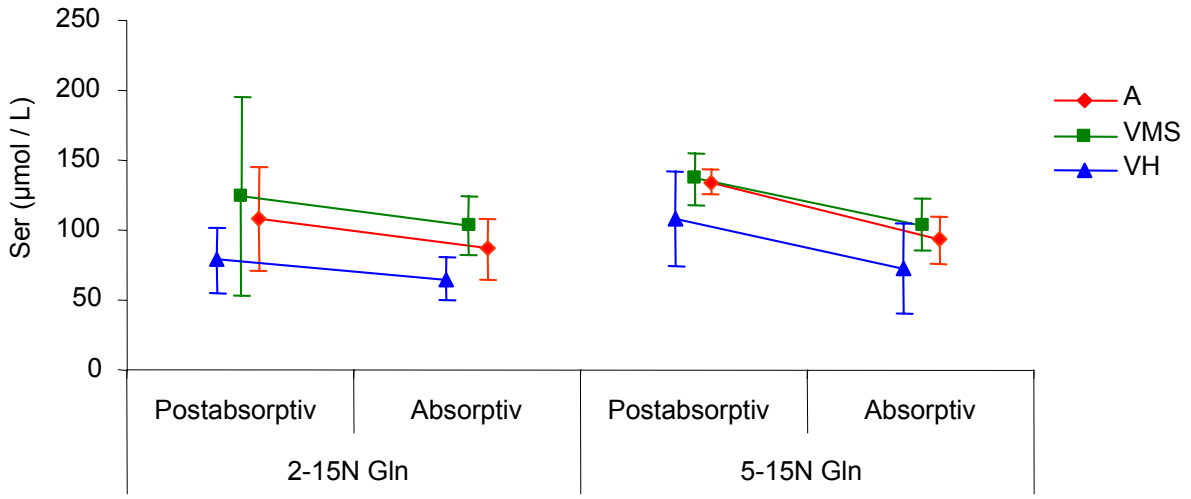

Abbildung 4. 23: Serinkonzentration arteriell (A), mesenterialvenös (VMS) und hepatalvenös (VH) postabsorptiv und absorptiv nach der Applikation von 2-[^{15}N] oder 5-[^{15}N] Glutamin

Nach der Applikation von 2-[15 N] Glutamin wurde eine signifikant höhere [15 N] Anreicherung in Serin gemessen als nach der Applikation von 5-[15 N] Glutamin (Tabelle 4.3b und Abbildung 4.24).

Die Übertragung des markierten Stickstoffes auf Serin zeigte nach der Gabe des 2-[15 N] Glutamins tendenziell einen höheren Anteil als nach der Applikation von 5-[15 N] Glutamin. Die Werte erreichten jedoch keine statistische Signifikanz (Tabelle 4.1 und Abbildung 4.25).

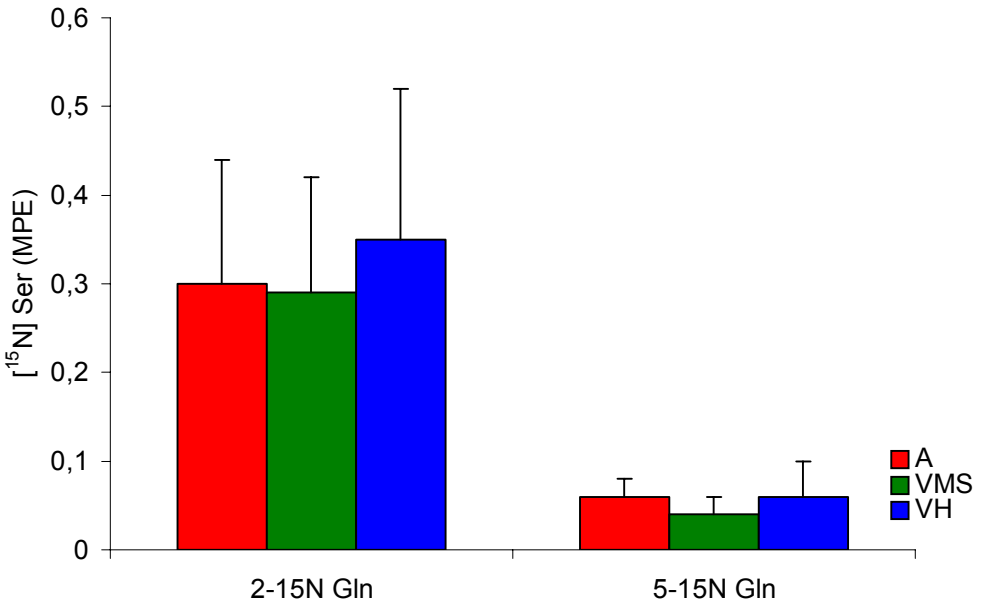

Abbildung 4. 24: [^{15}N] Anreicherung in Serin arteriell (A), mesenterialvenös (VMS) und hepatalvenös (VH) nach der Applikation von 2-[^{15}N] oder 5-[^{15}N] Glutamin

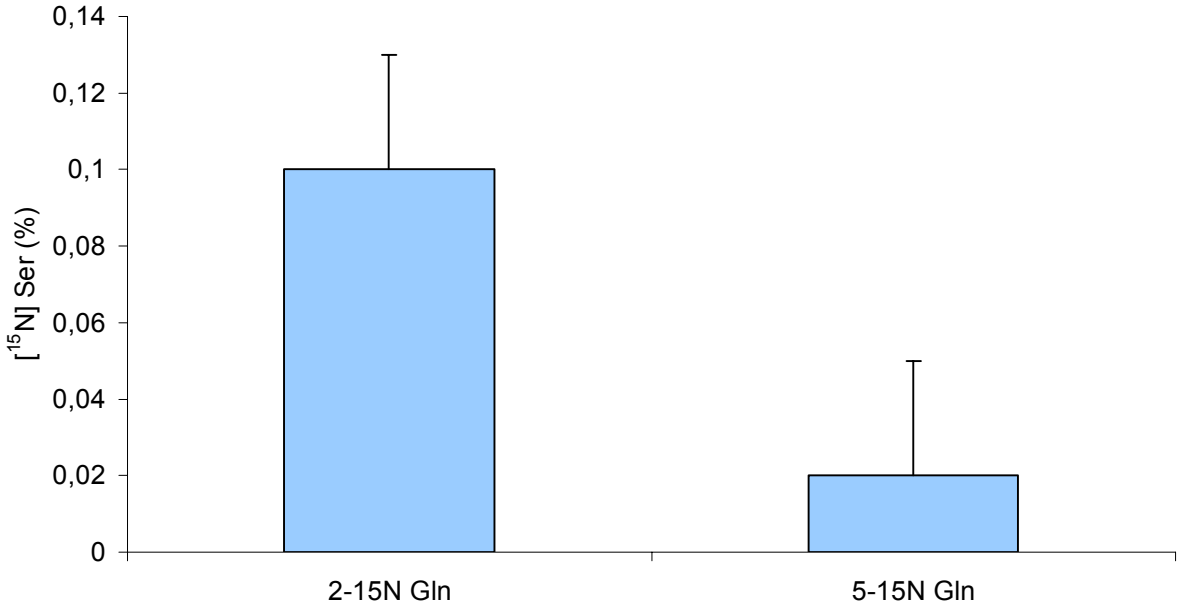

Abbildung 4. 25: [^{15}N] Transferrate auf Serin im arteriellen Plasma nach der Applikation von 2-[^{15}N] oder 5-[^{15}N] Glutamin

Prolin

Das Verhalten der Prolinkonzentrationen (Tabelle 4.4b) war mit einem signifikanten Abfall nach der Infusion (absorptiv) unabhängig von der Art des Tracers und dem Ort der Blutentnahme analog zum Serin (Abbildung 4.26).

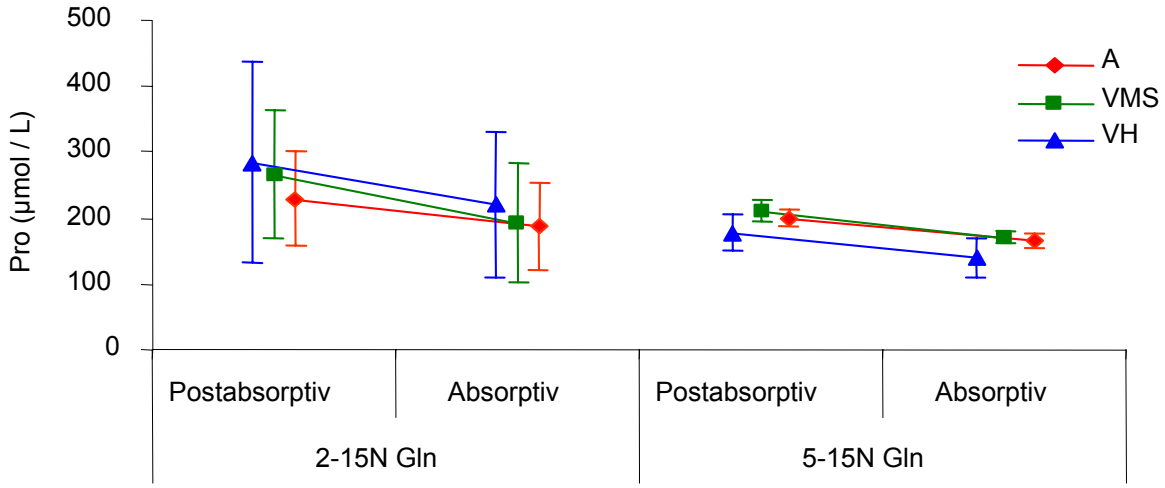

Abbildung 4. 26: Prolinkonzentration arteriell (A), mesenterialvenös (VMS) und hepatalvenös (VH) postabsorptiv und absorptiv nach der Applikation von 2-[^{15}N] oder 5-[^{15}N] Glutamin

Ebenso war die [15 N] Anreicherung in Prolin unabhängig vom Ort der Blutentnahme nach der Gabe von 2-[15 N] Glutamin signifikant höher als nach der Gabe von 5-[15 N] Glutamin (Tabelle 4.3b und Abbildung 4.27).

Die Übertragung von markiertem Stickstoff auf Prolin war nach der Applikation von Amino-markiertem Glutamin signifikant höher als nach der Applikation von Amid-markiertem Glutamin (Tabelle 4.1 und Abbildung 4.28).

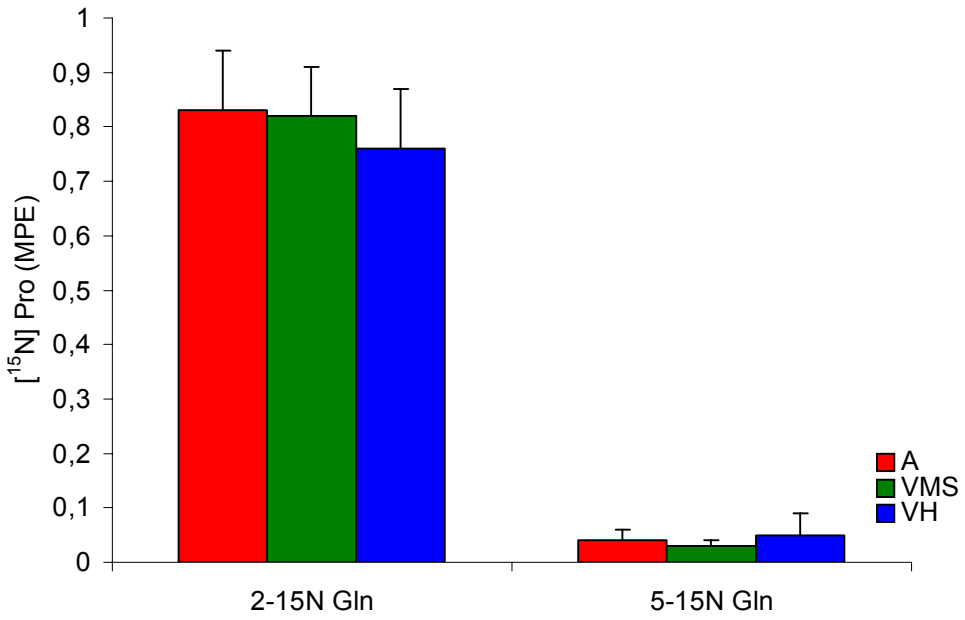

Abbildung 4. 27: [^{15}N] Anreicherung in Prolin arteriell (A), mesenterialvenös (VMS) und hepatalvenös (VH) nach der Applikation von 2-[^{15}N] oder 5-[^{15}N] Glutamin

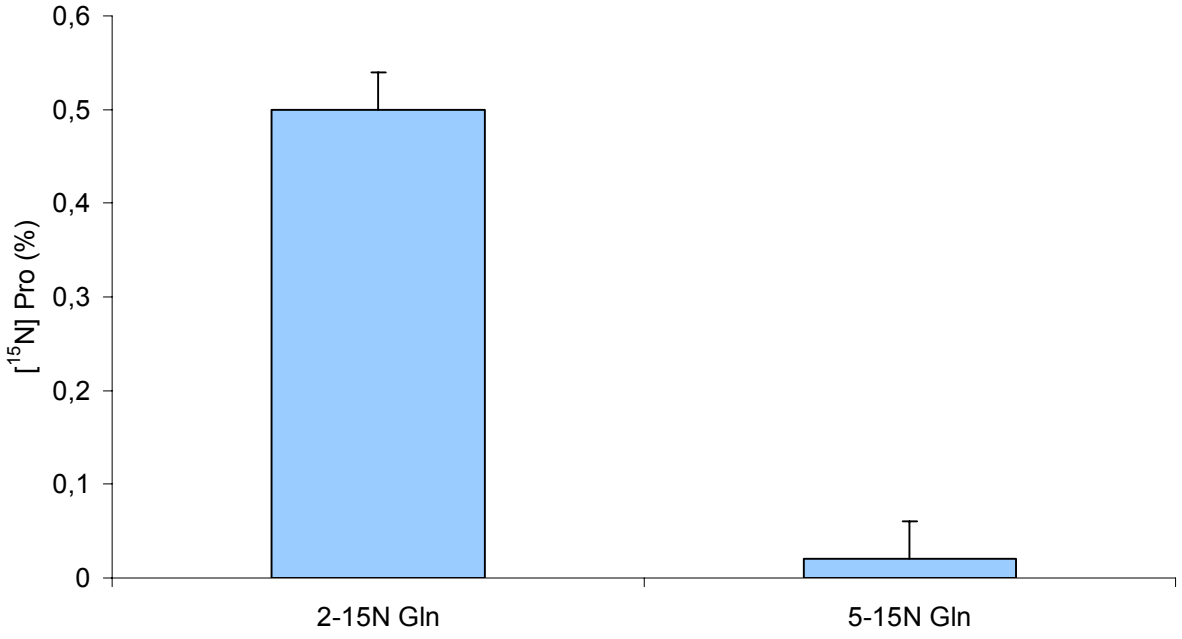

Abbildung 4. 28: [^{15}N] Transferrate auf Prolin im arteriellen Plasma nach der Applikation von 2-[^{15}N] oder 5-[^{15}N] Glutamin

5. Diskussion

In der vorliegenden Untersuchung wurde der TIPS bei Leberzirrhosepatienten als Zugang zur selektiven Blutentnahme aus den Splanchnikusgefäßen benutzt, die bisher nur auf invasivem Weg während einer Laparotomie erreicht werden konnten. Hierdurch konnte erstmals auch am Menschen der Metabolismus der Stickstoffgruppen des Glutamins im Dünndarm untersucht werden. Durch die enterale Applikation von einerseits in der Aminoposition und andererseits an der Amidoposition markiertem Glutamin konnte der Stoffwechsel sowohl über den Glutamatdehydrogenase- als auch den Glutaminaseweg untersucht werden.

5.1. Methodologie

Stabile Isotopen ermöglichen die genaue Verfolgung von Stoffwechselwegen und erlauben uns, genaue Aussagen über die Herkunft bestimmter Produkte des intermediären Stoffwechsels ohne radioaktive Belastung der Patienten zu treffen. Die quantitative Analytik der stabilen Isotopen in den Stoffwechselprodukten erfolgt beispielsweise aus Blutproben mittels Gaschromatographie / Massenspektrometrie nach entsprechender Probenaufbereitung.

Bisher war die Katheterisierung von mesenterialen Venen nur im Rahmen von tierexperimentellen Studien [45] oder elektiven abdominalen Eingriffe beim Menschen [11,13,14] möglich . Nach Anlage eines TIPS bei Patienten mit Leberzirrhose kann die Mesenterialvene selektiv katheterisiert werden, ohne die Patienten einem chirurgischen Eingriff unterziehen zu müssen [9,16]. Darüber hinaus können auf diese Weise mögliche beeinflussende Faktoren wie Anästhesie oder Traumastoffwechsel im Rahmen des elektiven abdominalen Eingriffes ausgeschlossen werden. Die vorliegende Untersuchung erfolgte an Patienten mit Leberzirrhose nach einer minimal invasiven Prozedur, entweder einer TIPS-Neuanlage oder einer TIPS-Angiographie. Die in tierexperimentellen Studien durchgeführte selektive Katheterisierung der zuführenden arteriellen Darmgefäße kann beim Menschen allenfalls intraoperativ erfolgen. Bei nicht invasiven Untersuchungen ist bis heute das Problem einer ausreichend genauen Messung des Volumenflusses noch nicht befriedigend gelöst. Dies gilt besonders für sonographische Verfahren [46,47], deren Messfehler zu einer nicht zu akzeptierenden Ungenauigkeit der Ergebnisse führt und auf

die daher in der vorliegenden Untersuchung verzichtet wurde. Darüber hinaus bestehen bei Patienten mit Leberzirrhose zusätzlich zu dem leichter zu quantifizierenden Shuntfluss durch den TIPS weitere teils auch intrahepatische Gefäßshunts, die eine Unterscheidung der effektiven Leberdurchblutung vom Shuntvolumen zusätzlich erschweren. Daher beschränkte sich die vorliegende Untersuchung auf die Messung der arterio-venösen Differenzen anstatt des Stoffumsatzes pro Zeiteinheit.

Die Berechnung der Transferrate des markierten Stickstoffes auf die verschiedenen Metabolite basiert auf einer geschätzten Plasmapoolgröße, welche abhängig von der Körpermasse, dem Alter und Geschlecht einem publizierten Nomogramm entnommen wurde [44]. Mit dieser Berechnung ist es möglich, eine Aussage über den Transfer des markierten Stickstoffes aus dem infundierten Glutamin auf die anderen nur im Blutplasma vorkommenden Metabolite zu treffen.

Bei der Interpretation der Ergebnisse ist zu berücksichtigen, dass die an Patienten mit Leberzirrhose erhobenen Befunde nicht ohne weiteres auf Gesunde übertragbar sind. Bei einer eingriffsbezogenen Letalität von ca. 1-2% für die Anlage eines TIPS verbietet sich die Untersuchung an gesunden Probanden.

5.2. Stoffwechselmetabolite

Ammonium

Die signifikant höhere Ammoniumkonzentration in der Vena mesenterica superior verglichen mit der Konzentration in der Arteria radialis und Vena hepatica ist Ausdruck der intestinalen Ammoniumfreisetzung. Diese Beobachtung war seit den Pionierarbeiten von Windmüller und Spaeth aus Tierexperimenten bekannt [7,48,49] und wurde von Plauth und Mitarbeitern erstmals auch bei Patienten mit Leberzirrhose und TIPS nachgewiesen [16]. Die hohe portalvenöse Ammoniumkonzentration entstammt in den Tierexperimenten zu 50 % dem Glutaminstoffwechsel des Dünndarmes durch die Glutaminase-Reaktion, welche durch die Abspaltung der Amid-Gruppe Ammonium und Glutamat freisetzt [4]. Dieser Beitrag des Dünndarms zur Ammoniogenese erklärt das Phänomen des „ germ free paradox “, bei welchem das Auftreten von hepatischer Enzephalopathie nach portocavaler Anastomose bei keimfrei aufgezogenen Tieren beobachtet wurde [17]. Diese Ammoniogenese als Folge des intestinalen Glutaminstoffwechsels ist durch Lactulose und Neomycin nicht zu beeinflussen [10]. Die intestinale Ammoniogenese trägt durch das hohe portalvenöse Ammoniumangebot an die Leber der Aufrechterhaltung der Harnstoffsynthese bei.

In der vorliegenden Untersuchung konnte durch die höhere [15N] Anreicherung in [15N]-Ammonium nach der Applikation von 5-[15N]-Glutamin, nicht aber nach der Applikation von 2-[15N] Glutamin erstmals am Menschen nachgewiesen werden, dass die intestinal-mukosale Ammoniumproduktion nahezu ausschließlich über die Glutaminase-Reaktion verläuft. Dieses Ergebnis steht in guter Übereinstimmung mit den Daten, die in Untersuchungen an Hunden gewonnen wurden [31].

Der Dünndarm und die Niere gelten als Hauptproduzenten des Ammoniums [9]. Unter physiologischen Säure-Basen-Status spielt die Aktivität der Glutaminase in der Ammoniogenese der beiden Organe die vorrangige Rolle. Erst im azidotischen Zustand gewinnt die Aktivität der Glutamat-Dehydrogenase in der renalen Ammoniogenese an Bedeutung [26-30]. Wir konnten eine signifikant höhere Transferrate des [15N] Stickstoffes auf das [15N]-Ammonium nach der Gabe von 5-[15N]-Glutamin beobachten. Dies bestätigt, dass die intestinale Ammoniogenese unter physiologischen Säure-Basen-Status ganz überwiegend durch die Wirkung der Glutaminase bestimmt wird. Im Dünndarm lässt sich eine hohe Aktivität der Glutaminase nachweisen [23-25], dagegen beträgt die

Glutamat-Dehydrogenase Aktivität lediglich 10-20 % derjenigen in der Leber [50]. Inwieweit der Flux durch Glutamat-Dehydrogenase Reaktion im Dünndarm von Änderungen des Säure-Basen-Status verändert wird, müsste in weiteren Studien untersucht werden.

Aus der Abbildung 3.2 wird ersichtlich, dass mit dem von unserer Arbeitsgruppe entwickelten experimentellen Ansatz der Substratumsatz im gesamten Splanchnikusgebiet untersucht werden kann. Darüberhinaus war es durch die selektive Katheterisierung der V. mesenterica superior und V. hepatica möglich, auch differenziert organspezifische Substratumsätze für den Darm und die Leber zu quantifizieren. Nach der Applikation von 5-[15N] Glutamin kam es zu einer Nettoextraktion des [15N] Ammoniums im Splanchnikusgebiet.. Diese splanchnische Nettoextraktion setzt sich aus einer intestinalen Freisetzung und einer hepatischen Extraktion von [15N] Ammonium zusammen. Das von der Leber extrahierte Ammonium steht unter anderem der Harnstoff- und Glutaminsynthese zur Verfügung.

Glutamin und Glutamat

Die oben diskutierte intestinale Ammoniumproduktion ist Folge des intestinalen Glutaminabbaus über die Glutaminase-Reaktion. Das enteral zugeführte Glutamat wird sowohl vom Menschen als auch vom Tier im Gegensatz zum Glutamin in viel höheren Raten (ca. 90 % vs 50 %) während der ersten Passage vom Splanchnikusgebiet verstoffwechselt. Der Hauptweg dieses Metabolismus stellt die Oxidation des Glutamats dar [18-22].

Der differenzierte Stoffwechsel des Glutamins in der Leber entlang der Sinusoide wurde in dem Modell von Häussinger geklärt [51]. Danach wird das Glutamin in den periportalen Zellen über die Glutaminase-Reaktion zu Glutamat und Ammonium abgebaut und in den Zellen nahe der Vena zentralis erneut aus Glutamat und Ammonium über die Glutamin-Synthase-Reaktion gebildet.

Da wir in unserer Untersuchung Stickstoff-markiertes Glutamin enteral appliziert haben, können wir nur über die metabolischen Wege des Stickstoffes, und nicht die des Kohlenstoffes treffen.

Die Abbildung 5.1 fasst den Glutaminstoffwechsel aus den tierexperimentellen Daten zusammen.

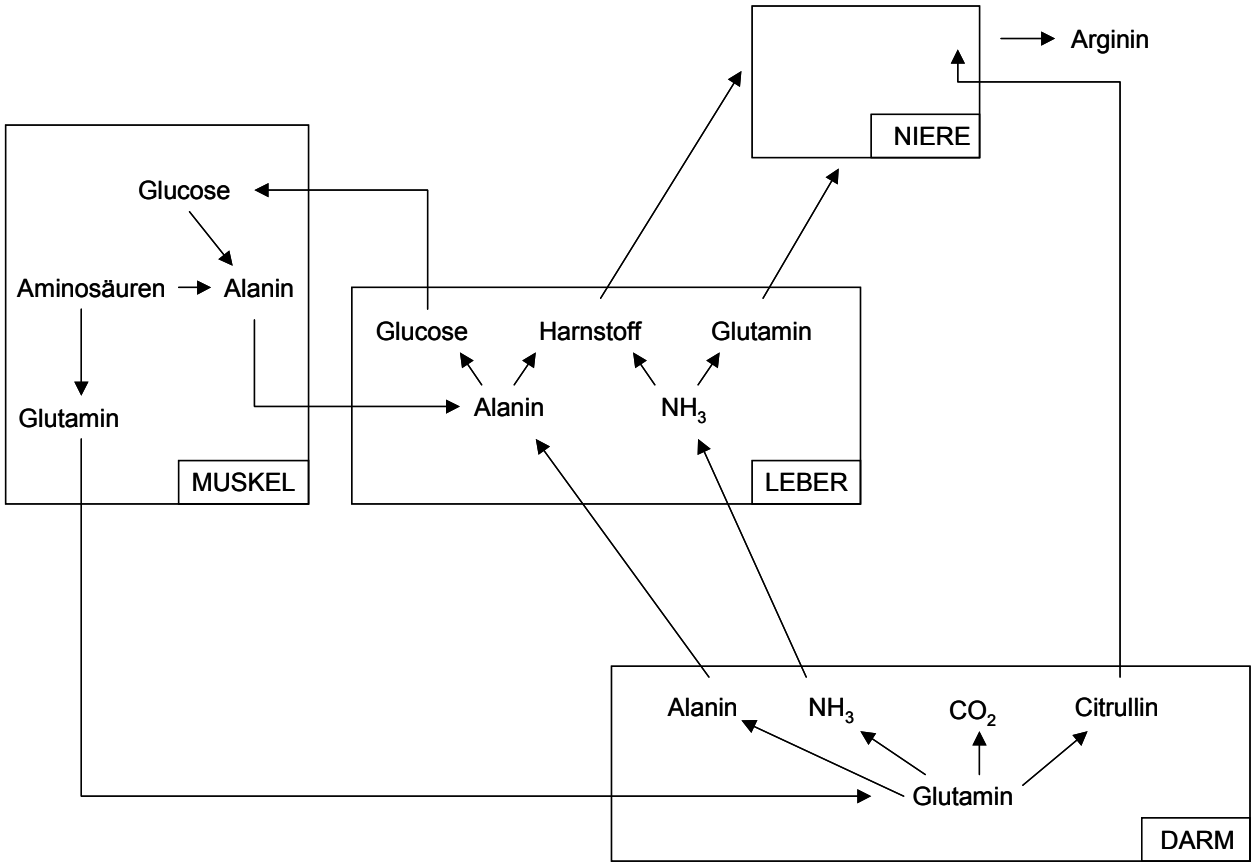

Abbildung 5.1: Schematische Darstellung des Glutaminstoffwechsels in verschiedenen Organen

Der signifikante Unterschied in der Glutaminkonzentration zwischen den beiden Patientengruppen ist durch die Patientencharakteristika bedingt und bei einer kleinen Fallzahl wie in der vorliegenden Untersuchung trotz gleicher Einschlusskriterien nicht sicher zu vermeiden. Dieser Unterschied zeigt sich bereits im postabsorptiven Zustand und ist somit unabhängig von der Tracermarkierung. Nach der Applikation der Nährstofflösung konnte ein signifikanter Abfall der Glutaminkonzentration beobachtet werden. Dieser kommt dadurch zustande, dass die Nährlösung zusätzlich zum Tracer 145 g Kohlenhydrate enthielt, welche eine Insulin-Antwort nach sich ziehen. Unter IGF-I und Insulin kommt es bekanntermassen zu einer Hypoaminoacidämie [52].

Die signifikant höhere [15N] Anreicherung in 2+5-[15N]-Glutamin und die signifikant höhere [15N] Transferrate auf 2+5-[15N]-Glutamin nach der Applikation von 5-[15N]-Glutamin weisen auf eine Übertragung des Amid-Stickstoffes auf die Amino-Position des Glutamins hin. Hierfür spricht auch die Tatsache, dass sich die [15N] Transferrate auf das

2-[15N]-Glutamin und [15N]-Glutamat zwischen beiden Infusionsgruppen nicht unterschied. Ähnliche Beobachtungen sind aus Untersuchungen an der perfundierten Rattenleber und an Schafen beschrieben [53, 54]. Nissim und Mitarbeiter führten das Erscheinen von [15N] Stickstoff in Glutamat, Alanin und Aspartat nach der Applikation von 5-[15N]-Glutamin auf die Reversibilität der Glutamat-Dehydrogenase Reaktion zurück und bezeichneten diesen Weg als „reduktive Aminierung“.

In der Darmmukosa ist sowohl immunhistochemisch als auch durch direkte Messungen das Enzym Glutamin-Synthase nachgewiesen worden [55, 56]. Darüber hinaus liegen Hinweise vor, dass im Darm geringe Mengen Glutamin aus Glutamat entstehen können [20]. Somit könnte auch der Darm an dem Prozeß der sogenannten „reduktiven Aminierung“ beteiligt sein. Dafür findet sich in unserer Untersuchung aber keine Bestätigung, denn die gemessenen arterio-venösen Differenzen von 2+5-[15 N]-Glutamin zeigen lediglich eine hepatische Extraktion nach der Applikation von 5-[15N]-Glutamin an. Daher ist davon auszugehen, dass die „reduktive Aminierung“ unter Bedingungen, wie sie bei den untersuchten Zirrhosepatienten vorlagen, offenbar von allenfalls untergeordneter Bedeutung ist.

Die signifikante [15N] Anreicherung in 2-[15N]-Glutamin und dessen signifikante intestinale Abgabe nach der Applikation von 2-[15N]-Glutamin ist in erster Linie mit der intakten Translokation des markierten Glutamins durch die Darmmukosa erklärbar.
Die signifikant höhere Glutamatkonzentration in der Vena hepatica stimmt mit den Daten aus der Literatur überein und zeigt die Glutamatabgabe aus der Leber an [12, 57].

Die [15N] Anreicherung in [15N]-Glutamat und die [15N] Transferrate auf das [15N]-Glutamat waren interessanterweise in beiden Gruppen nicht unterschiedlich. Dies bedeutet, dass der Amidstickstoff des Glutamins auf die Amino-Position transferiert wird und damit die oben erwähnte reduktive Aminierung bestätigt.
Aus den Daten der arterio-venösen Differenzen von [15N]-Glutamat ist zu ersehen, dass die Leber signifikante Mengen des [15N]-Glutamats extrahiert und einer erneuter Glutaminsynthese und der Synthese weiterer Aminosäuren über die Aminotransferase-Reaktionen zur Verfügung stellt.

Alanin

Alanin ist eine nicht-essentielle Aminosäure, die zu Pyruvat transaminiert wird. Alanin ist über die reversible Transaminierung von Pyruvat sowohl ein Stickstoff-Donator als auch ein Stickstoff-Akzeptor. Neben der Skelettmuskulatur geben Darm und Niere Alanin ab, während die Leber das vorrangige Organ für die Alaninaufnahme darstellt [58-62]. Die hauptsächliche Quelle für Pyruvat als Alaninbaustein ist die Glycolyse. Die Deaminierung des Alanins liefert Stickstoff für den Harnstoffzyklus und Oxalacetat über Pyruvat für den Citratzyklus.

In unserer Untersuchung stimmt die signifikant höhere Alaninkonzentration in der Vena mesenterica superior mit den bisher bekannten Daten aus den humanen und Tierexperimenten über die intestinale Alaninabgabe überein [63-66]. Ebenso ist die signifikant niedrigere Alaninkonzentration in der Vena hepatica durch die Alaninaufnahme in der Leber zu erklären. Da unsere Infusionslösung Glucose enthielt, konnten wir nach der Applikation der Nährlösung unabhängig von der Art des Tracers und vom Ort der Blutabnahme einen signifikanten Anstieg der Alaninkonzentration beobachten. Das Pyruvat als Baustein für dieses Alanin dürfte aus der in die Nährlösung hinzugefügten Glucose stammen.

In Untersuchungen mit Kohlenstoff- und Stickstoff-markiertem Glutamin / Glutamat nach enteraler Tracerapplikation ist gut belegt, dass Glutamat während der ersten Passage durch das Splanchnikusgebiet zu ca. 90 % metabolisiert wird [18]. Das enteral zugeführte Glutamat wird im Darm zu einem Teil vollständig oxidiert und zum anderen Teil dessen Kohlenstoffgerüst in den Citratcyklus eingeschleust [67]. Die verbliebene Amino-Gruppe des Glutamats steht in beiden Fällen dem Pyruvat als Stickstoffakzeptor zur Verfügung. Durch diese Transaminierung entsteht Alanin. Dementsprechend haben wir in unserer Untersuchung nach der Applikation von 2-[15N]-Glutamin eine signifikant höhere [15N] Anreicherung in und [15N] Transferrate auf [15N]-Alanin beobachtet. Dies steht in guter Übereinstimung mit den Daten von Volman-Mitchell und Mitarbeitern, die eine Alanin-Aminotransferase Aktivität im Dünndarm der Ratte nachgewiesen haben [68].

Glycin, Serin

Die beiden Aminosäuren sind in ihrem Aufbau sehr ähnlich und zeigen im Stoffwechsel enge Beziehungen. Die Umwandlung von Serin in Glycin findet durch die Reaktion mit Serin-Hydroxymethyltransferase statt [69]. Dieses Enzym liegt im Dünndarm der Ratte in hoher Aktivität vor [70]. Als Nebenprodukt dieser Reaktion entsteht das 5,10 Methylentetrahydrofolat, welches unter anderem für die Synthese von Purin und Pyrimidin notwendig ist [71]. Dagegen enthält der Dünndarm der Ratte nur eine geringe Aktivität der Serin-Dehydratase und Serin-Aminotransferase [72]. Die beiden letzteren Enzymen katalysieren den reversiblen Abbau von Serin zu Pyruvat und Ammonium. Die Aufnahme von Glycin im Dünndarm dient der Synthese von Glutathion [73].

In unserer Untersuchung konnten wir übereinstimmend mit der Literatur eine signifikant höhere Glycinkonzentration in der Vena mesenterica superior als Hinweis für die intestinale Abgabe des Glycins beobachten [58,65,66,74]. Dagegen spricht die niedrigere Konzentration in der Vena hepatica für die hepatische Extraktion des Glycins. Der signifikante Glycin- und Serinkonzentrationsabfall nach der Applikation unabhängig von der Art des Tracers und dem Ort der Blutentnahme ist auch in diesem Fall auf IGF-I und Insulin als Antwort auf die zugeführten Kohlenhydrate zurückzuführen [52].

Die signifikant höhere [15-N] Anreicherung in [15-N]-Glycin und [15N]-Serin, aber auch die signifikant höhere [15N] Transferrate auf das [15N]-Glycin nach der Applikation von 2-[15N]-Glutamin sprechen für die Herkunft des [15-N] Stickstoffes in beiden Aminosäuren aus der Amino-Gruppe des Glutamins bzw. Glutamats. Da die arterio-venösen Differenzen von [15N]-Glycin und [15N]-Serin sich nicht signifikant von Null unterschieden, können wir aus unseren Daten über den Ort dieser Transaminierung keine Aussage treffen.

Prolin

Ebenso wie bei den anderen Aminosäuren war die Prolinkonzentration nach der Applikation der Nährlösung aufgrund der Wirkung von IGF-I und Insulin signifikant abgefallen [52]. Die signifikante [^{15}N] Anreicherung in [^{15}N]-Prolin und die [^{15}N] Transferrate auf [^{15}N]-Prolin nach der Infusion von 2-[^{15}N]-Glutamin stehen in guter Übereinstimmung mit der beschriebenen Prolinsynthese aus Glutamat und dem Prolinabbau zu Glutamat [69,75]. Prolin wird zu ca. 38 % von den Pfortader drainierenden Organen des Schweins während der ersten Passage aufgenommen [76] und in den Enterozyten zu ca. 80-90 % in Ornithin, Citrullin und Arginin überführt [75,77]. Daher ist entgegen der früheren Auffassung anzunehmen, dass Prolin als ein intermediäres Produkt des Glutamin-/Glutamatstoffwechsels in der Darmmukosa einer höheren Metabolisierungsrate unterliegt und ein wichtiges Substrat für die Synthese von Arginin, Ornithin und Polyaminen darstellt.

6. Zusammenfassung

In dieser Untersuchung wurde bei Patienten mit transjugulärem intrahepatischen portosystemischen Shunt (TIPS) die besondere anatomische Situation genutzt, um aus der V. mesenterica superior und V. hepatic Blutproben während der enteralen Applikation von mit stabilen Isotop markierten Glutamin zu gewinnen. Daraus konnten Aussagen über die Stoffwechselwege der Amino- und Amidgruppe des Glutamins getroffen werden.

Nach unseren Kenntnissen ist dies die erste humane Untersuchung über die differenzierte intestinale und hepatale Stoffwechselwege der beiden Stickstoffgruppen des Glutamins.

Die wesentlichen Befunde dieser Untersuchung werden im Folgenden zusammengefasst:

1. Das durch den Dünndarm produzierte Ammonium stammt ganz überwiegend aus der Deamidierung des Glutamins über die Glutaminase-Reaktion. Die Glutamat-Dehydrogenase als Enzym für den Stoffwechsel der Amino-Gruppe des Glutamins bzw. des Glutamats spielt im Dünndarm keine wesentliche Rolle.

2. Die Beobachtung einer signifikant höheren Anreicherung von 2+5-[^{15}N] Glutamin nach der Infusion von 5-[^{15}N] Glutamin in allen Gefäßen und signifikante Transferrate des Amid-Stickstoffes auf das 2+5-[^{15}N] Glutamin führt zu der Annahme, dass die beiden Stickstoffgruppen des Glutamins austauschbar sind, wobei der Transfer des Amid-Stickstoffes zum Amino-Stickstoff zweifach höher liegt als der Transfer von Amino-Gruppe zur Amid-Gruppe. Die gleiche Transferrate des markierten Stickstoffes nach der enteralen Applikation vom markierten Glutamin auf das [^{15}N] Glutamat unterstützt diese Annahme. Der Austausch von Stickstoffgruppen, in diesem speziellen Fall die Platzierung des Amid-Stickstoffes an die Amino-Position, kann nur stattfinden, wenn die Reversibilität der Glutamat-Dehydrogenase Reaktion vorausgesetzt ist.

3. Aus der signifikant höheren [^{15}N] Anreicherung in 2-[^{15}N] Glutamin in allen Gefäßen und der signifikanten intestinalen Abgabe von 2-[^{15}N] Glutamin nach der Infusion von 2-[^{15}N] Glutamin ist anzunehmen, dass eine Translokation des intakten, markierten Glutaminmoleküls nach der enteralen Applikation des

entsprechenden Tracers vom Darmlumen durch die Dünndarmmucosa zur vasalen Seite stattfindet.

4. Der Transfer von Amino-Gruppe auf andere Aminosäuren wie Alanin, Serin, Glycin und Prolin findet überwiegend durch die Transaminierung statt, was durch die signifikant höhere [^{15} N] Anreicherungen und [^{15} N] Transferraten in den genannten Aminosäuren nach der enteralen Applikation von Amino-markiertem Glutamin als nach der Applikation von Amid-markiertem Glutamin gemessen werden konnte.

Hieraus geht hervor, dass der Dünndarm aus dem enteral zugeführten Glutamin durch die Deamidierung über die Glutaminase-Reaktion Ammonium produziert. Dagegen verläuft die Abspaltung der Amino-Gruppe über die Glutamat-Dehydrogenase-Reaktion, die in geringen Mengen auch im Darm stattfindet. Die Amino-Gruppe steht in hohem Maße in der Leber und geringfügig im Darm weiterer Transaminierungen zur Verfügung. Es liegt eine Transformation des Amid-Stickstoffes zum Amino-Stickstoff vor, die aber im Gegensatz zu den in vitro Modellen in unserem Modell (in vivo) geringfügig ist

Literaturverzeichnis

1. Gerok W: Metabolische Grundlagen der hepatischen Enzephalopathie. Internist 1985, 26:377-387
2. Butterworth RF. Pathophysiology of hepatic encephalopathy; the ammonia hypothesis revisited. In Progress in hepatic encephalopathy and metabolic nitrogen exchange (Eds: Bengtsson F, Jeppsson B, Almdahl T, Vilstrup H). CRC Press, Boca-Raton, 1991, 9-24
3. Conn HO: Hepatic encephalopathy. In Diseases of the liver (Eds: Schiff L, Schiff ER), Lippincott, Philadelphia, 1993, 1036-1060
4. Weber FL, Veach GA: The importance of the small intestine in gut ammonium production in the fasting dog. Gastroenterology 1979, 77:235-240
5. van Berlo CLH, VanLeeuwen PAM, Soeters PB: Porcine intestinal ammonia liberation. Influence of food intake, lactulose and neomycin treatment. J Hepatol 1988, 7:250-257
6. Imler R, Chabrier G, Simon C, Schlienger JL: Intestinal ammonium production in the rat: The role of the colon, small intestine, and circulating glutamine. Res Exp Med 1988, 188:1-7
7. Windmueller HG, Spaeth AE: Inestinal metabolism of glutamine and glutamate from the lumen as compared to glutamine from blood. Arch. Biochem. Biophys. 1975; 71:662-672
8. Plauth M, Raible A, Vieillard-Baron D, Bauder-Groß D, Hartmann F. Is glutamine essential for the maintenance of intestinal function? A study in the isolated perfused rat small intestine. Int J Colorectal Dis 1999, 14:86-94
9. Olde Damink SWM, Jalan R, Redhead DN, Hayes PC, Deutz NEP, Soeters PB: Interorgan Ammonia and Amino Acid Metabolism in Metabolically Stable Patients With Cirrhosis and a TIPSS. Hepatology 2002;36:1163-1171
10. Plauth M, Raible A, Graser TA, Nöldecke I-L, Fürst P, Dölle W, Hartmann F: Lactulose or paromomycin do not affect ammonia generation in the isolated perfused rat small intestine. Z Gastroenterol 1994, 32:141-145
11. Felig P, Wahren J, Karl I, Cerasi E, Luft R, Kipnis DM: Glutamine and glutamate metabolism in normal and diabetic subjects. Diabetes 1973, 22:573-576
12. Felig P, Wahren J, Räf L: Evidence of inter-organ amino acid transpoprt by blood cells in humans. Proc Natl Acad Sci USA 1973;70:1775-1779

13. Owen OE, Mozzoli MA, Reichle FA, Kreulen TH, Owen RS, Boden G, Polansky M: Hepatic and renal metabolism before and after portosystemic shunts in patients with cirrhosis. J Clin Invest 1985;76:1209-1217
14. Mc Anena OJ, Moore FA, Moore EE, Jones TN, Parsons P: Selective uptake of glutamine in the gastrointestinal tract: confirmation in a human study. Br J Surg 1991; 78: 480-482
15. van der Hulst RRWJ, von Meyenfeldt MF, Deutz NEP, Soeters PB: Glutamine extraction by the gut is reduced in patients with depleted gastrointestinal cancer. Ann Surg 1997; 225: 112-121
16. Plauth M, Roske A-E, Romaniuk P, Roth E, Ziebig R, Lochs H. Post-feeding hyperammonemia in patients with transjugular intrahepatic portosystemic shunt and liver cirrhosis: role of small intestinal ammonia release and route of nutrient administration. Gut 2000;46:849-855
17. Schalm SW, van der Mey T: Hyperammonemic coma after hepatectomy in germ-free rats. Gastroenterology 1979, 77:231-234
18. Matthews DE, Marano MA, Campbell RG. Splanchnic bed utilization of glutamine and glutamic acid in humans. Am J Physiol 1993; 264: E848-E854
19. Battezzati A, Brillon DJ, Matthews DE. Oxidation of glutamic acid by the splanchnic bed in humans. Am. J. Physiol 1995; 269: E269-E276
20. Reeds PJ, Burrin DG, Jahoor F, Wykes L, Henry J, Frazer EM. Enteral glutamate is almost completely metabolized in first pass by the gastrointestinal tract of infant pigs. Am. J. Physiol 1996; 270:E413-E418
21. Stoll B, Burrin DG, Henry J, Yu H, Jahoor F, Reeds PJ. Substrate oxidation by the portal drained viscers of fed piglets. Am. J. Physiol 1999; 277: E168-E175
22. Haisch M, Fukagawa NK, Matthews DE. Oxidation of glutamine by the splanchnic bed in humans. Am. J. Physiol 2000; 278: E593-E602
23. James L.A, Lunn PG, Middleton S, Elia M: Distribution of glutaminase and glutamine synthetase activities in the human gastrointestinal tract. Clin Sci 1998, 94: 313-319
24. Elia M, Lunn P: The use of glutamine in the treatment of gastrointestinal disorders in man. Nutrition 1997, 13:743-747
25. Pinkus, L.M., Windmueller,H.G. : Phosphat-dependent glutaminase of small intestine: Localization and role in intestinal glutamine metabolism. Arch Biochem Biophys 1977, 182:506-517

26. Welbourne TC, Phromphetcharat V, Givens G, Joshi S: Regulation of interorganal glutamine flow in metabolic acidosis. Am J Physiol 1986, 250:E457-E463
27. Nissim I, Yudkoff M, Segal S: Metabolism of glutamine and glutamate by rat renal tubules. J Biol Chem 1985, 260:13955-13967
28. Nissim I, States B, Yudkoff M, Segal S: Characterization of amino acid metabolism by cultured rat kidney cells: a study with ^{15}N. Am J Physiol 1987, 253: F1243-1252
29. Nissim I, States B. Ammoniagenesis by cultured human renal cortical epithelial cells. Am J Physiol 1989, 256:F187-196
30. Nissim I, Sahai A, Sandler RS, Tannen RL. The intensity of acidosis differentialy alters the pathways of ammoniogenesis in LLC-PK1 cells. Kidney Int 1994, 45:1014-1019
31. Yang D, Hazey JW, David F, Singh J, Rivchum R, Streem JM, Halperin ML, Brunengraber H. Integrative physiology of splanchnic gutamine and ammonia metabolism. Am. J. Physiol 2000; 278:E469-E476
32. Rössle M, Haag K, Ochs A, Sellinger M, Nöldge G, Perarnau J-M, Berger E, et al: The transjugular intrahepatic portosystemic stent-shunt procedure for variceal bleeding. N Engl J Med 1994, 330:165-171
33. Petzke KJ, Daenzer M, Backes G, Metges CC. Analysis of stable nitrogen and carbon isotope enrichment in biological samples by GC-C-IRMS with special reference to amino acids, Recent Res. Devel. Anal. Biochem., 2 (2002): 45-64
34. Metges CC, Petzke KJ. Measurement of $^{15}N/^{14}N$ isotopic composition in individual plasma free amino acids of human adults at natural abundance by gas chromatography-combustion isotope ratio mass spectrometry. Anal. Biochem. 1997;247: 158-164
35. Metges CC, Petzke KJ, Hennig U. Gas chromatography/combustion/isotope ratio mass spectrometric comparison of N-acetyl- and N-pivaloyl amino acid esters to measure ^{15}N isotopic abundances in physiological samples: A pilot study on amino acid synthesis in the upper gastro-intestinal tract of minipigs. J. Mass Spectrom. 1996; 31: 367-376
36. Yang D, Puchowicz MA, David F, Powers L, Halperin ML, Brunengraber H. ^{15}N Enrichment of ammonium, glutamine-amide and urea, measured via mass isotopomer analysis of hexamethylenetetramine. J. Mass. Spectrom. 1999;34:1130-1136

37. Pugh RNH, Murray-Lyon IM, Dawson JL: Transsection of the oesophagus of bleeding oesophageal varices. Brit J Surg 1973, 60:646-649
38. Moore S, Spackman DH, Stein WH: Chromatographie of amino acid on sulfonated polystyrene resins. Anal Chem 1958; 30:1185-1190
39. Kirsten E et al. Biochem Z. 1963; 337: 312
40. Da Fonseca-Wollheim F: The significance of the hydrogen ion concentration and addition of ADP in the determination of ammonia with glutamate dehydrogenase. An improved enzymatic determination of ammonia. Z Klin. Chem. Klin. Biochem 1973; 11 (10): 421-425
41. Fujihara S, Nakashima T, Kuroguchi YL: Determination of $^{15}NH_3$ by gas chromatography-mass spectrometry. Application to the measurment of putrescine oxidation by human plasma. J Chromatogr 1986; 383(2): 271-280
42. Patterson BW, Carrero F, Wolfe RR: Measurment of ^{15}N enreachment in multiple amino acids and urea in a Single analysis by gas chromatography/Mass spectrometry. Biol Mas Spectrom1993; 22 (9):518-523
43. Patterson BW, Carrero F, Klein S, Wolfe RR: Quantification of incorporation of [^{15}N]ammonia into plasma amino acids and urea. Am J Physiol 1995; 269 (3 Pt 1):E 508-515
44. Wissenschaftliche Tabellen Geigy, CIBA-GEIGY Limited, Basel, Schweiz. 1979, Teilband Hämatologie und Humangenetik, 8. Auflage Seite 67
45. Weber FL Jr., Maddrey WC, Walser M: Amino acid metabolism of dog jejunum before and during absorption of keto analogues. Am J Physiol 1977; 28: E263-269
46. Seitz KH, Wermke W: Portale Hypertension – derzeitiger Stand der sonographischen Diagnostik. Z Gastroenterol 1995; 33: 349-361
47. Seitz KH: Duplexsonographie in der Gastroenterologie. Schweiz Rundschau Med (Praxis) 1992; 81: 988-990
48. Windmueller HG, Spaeth AE: Uptake and metabolism of plasma glutamine by the small intestine. J. Biol. Chem. 1974; 249:5070-5079
49. Windmueller HG, Spaeth AE: Respiratory fuels and nitrogen metabolism in vivo in small intestine of fed rats. Quantitative importance of glutamine, glutamate and aspartate. J. Biol. Chem. 1980; 255:107-112

50. Plauth M, Hartmann F: The role of the small intestine in intermediary metabolism of L-glutamine. Progress in Pharmacology and Clinical Pharmacology Gustav Fischer Verlag 1989; Vol 7 / 2:99-117
51. Häussinger D: Nitrogen metabolism in liver: structural and functional organization and physiological relevance. Biochem J. 1990; 267-281
52. Liu Z, Barrett EJ: Human protein metabolism: its measurment and regulation Am. J. Physiol 2002; 283:E1105-E1112
53. Eriksson LS, Olsson M, Björkman O: Splanchnic Metabolism of Amino Acids in Healthy Subjects: Effect of 60 Hours of Fasting. Metabolism 1988; XXXVII: 1159-1162
54. Nissim I, Brosnan ME, Yudkoff M, Nissim I, Brosnan JT: Studies of hepatic glutamine metabolism in the perfused rat liver with ^{15}N-labeled glutamine. J Biol Chem 1999; 274 (41): 28958-28965
55. Hoskin SO, Gavet S, Milne E, Lobley GE: Does glutamine act as a substrate for transamination reactions in the liver of fed and fasted sheep ? Br J Nutr 2001; 85: 591-597
56. Shenoy V, Roig JC, Chakrabarti R, Kubilis P, Neu J: Ontogeny of glutamin synthetase in rat small intestine. Pediatr. Res. 1996; 39:643-648
57. James L.A, Lunn PG, Elia M: Glutamine metabolism in the gastrointestinal tract of the rat assessed by the relative activities of glutaminase and glutamin synthetase. Br. J. Nutr. 1998; 79: 365-372
58. Felig P: Amino acid metabolism in man. Annu. Rev. Biochem 1975; 44: 933-955
59. Souba WW, Wilmore DW: Gut-liver interaction during accelerated gluconeogenesis. Arch Surg 1985; 120: 66-70
60. Cersosimo E, Williams PE, Radosevic PM et al: Role of glutamine in adaptations in nitrogen metabolism durino fasting. Am J Physiol 1986; 250: E622-E628
61. Perriello G, Jorde R, Nurjhan N et al: Estimation of glucose-alanine-lactate-glutamine cycles in postabsorptive humans: Role of skeletal muscle. Am J Physiol 1995; 269: E443-E450
62. Lochs H, Roth E, Gasic S et al: Splanchnik, renal, and muscle clearance of alanylglutamine in man and organ fluxes of alnin and glutamine when infused in free and peptide forms. Metabolism 1990; 39: 833-836

63. Owen OE, Reichle FA, Mozzoli MA, Kreulen T, Patel MS, Elfenbein IB, Golsorkhi M, Chang KHY, Rao NS, Sue HS, Boden G: Hepatic, gut, and renal substrate flux rates in patients with hepatic cirrhosis. J Clin Invest 1981; 68: 240-252
64. De Blaauw I, Deutz NEP, von Meyenfeldt MF: In vivo amino acid metabolism of gut and liver during short and prolonged starvation. Am J Physiol 1996; 270: G298-G306
65. Bloomgarden ZT, Liljenquist J, Lacy W, Rabin D: Amino acid disposition by liver and gastrointestinal tract after protein and glucose ingestion. Am J Physiol, 1981; 4: E90-E99
66. Barrett EJ, Gusberg R, Ferrannini E, Tepler J, Felig P, Jacob R, Smith D, De Fronzo RA. Amino acid and glucose metabolism in the postabsorptive state and following amino acid ingestion in the dog. Metabolism, 1986; XXXV:709-717
67. Watford M: Glutamine metabolism in rat small intestine: synthesis of three carbon products in isolated enterocytes. Biochem. Biophys. Acta 1994;1200: 73-78
68. Volman-Mitchell H, D. S. Parsons: Distribution and activities of dicarboxylic amino acid transaminases in gastro intestinal mucosa of rat, mouse, hamster, guinea pig, chicken and pigeon. Biochem. Biophys. Acta 1974; 334:316-327
69. Rapoport SM: Medizinische Biochemie. VEB Verlag Volk und Gesundheit Berlin 1987
70. Kikuchi G, Hiraga K, Yoshida T: Role of the glycine-cleavage system in glycine and serine metabolism in various organs. Biochem. Soc. Trans. 1980; 8: 504-506
71. Burrin DG, Reeds PJ: Alternative fuels in the gastrointestinal tract. Curr. Opin. Gastroenterol. 1997; 13: 165-170
72. Wu G: intestinal mucosal amino acid catabolism. J. Nutr. 1998; 128: 1249-1252
73. Reeds PJ, Burrin DG, Stoll B, Jahoor F, Wykes L, Henry J, Frazer ME. Enteral glutamate is the preferential source for mucosal glutathione synthesis in fed piglets. Am. J. Physiol. 1997; 273: E408-E415
74. Deferrari G, Garibotto G, Robaudo C, Canepa A, Bagnasco S, Tizianello A: Leg metabolism of amino acids and ammonia in patients with chronic renal failure. Clin Sci, 1985; 69: 145-151
75. Murphy JM, Murch SJ, Ball RO: Proline is synthesized from glutamate during intragastric infusion but not during intravenous infusion in neonatal piglets. J. Nutr. 1996; 126: 878-886

76. Stoll B, Henry J, Reeds PJ, Yu H, Jahoor F, Burrin DG: catabolism dominates the first-pass intestinal metabolism of dietary essential amino acids in milk protein-fed piglets. J. Nutr. 1998b; 128: 606-614
77. Wu G: Synthesis of citrulline and arginine from proline in enterocytes of postnatal pigs. Am. J. Physiol. 1997; 272: G1382-G1390

Danksagung

Mein herzlicher Dank gebührt folgende Personen und Institutionen, ohne die diese Arbeit nicht hätte vollendet werden können:

Prof. Dr. med. Mathias Plauth für die Vergabe des Themas und für die zügige, geduldige und kompetente Hilfestellung während der Betreuung der Arbeit

PD Dr. habil. Cornelia C Metges bzw. Dr. G Nürnberg Bereich Ernährungsphysiologie bzw. Genetik und Biometrie des Forschungsinstituts für die Biologie landwirtschaftlicher Nutztiere für die Aufsicht der analytischen Methoden und für die kompetente Beratung und Betreuung bzw. für die statistische Beratung

Dr. Angelika Elsner, Dr. Klaus J Petzke und dem Deutschen Institut für die Ernährungsforschung für die Hilfestellung bei der Etablierung der analytischen Methoden und für die Durchführung der Analytik

Dr. rer. Nat. Tatjana-Elke Schütz für ihre uneingeschränkte und bedingungslose Hilfsbereitschaft in organisatorischen und sachlichen Fragen

Prof. Dr. med. Herbert Lochs für die Protektion der Abläufe als Direktor der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Gastroenterologie, Hepatologie und Endokrinologie der Charité

Allen Ärzten und Pflegepersonal der Station 141 der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Gastroenterologie, Hepatologie und Endokrinologie der Charité Für ihre Kooperation und organisatorische Hilfsbereitschaft

Dr. med. Petersein und der Radiologischen Abteilung der Charité für die angiographische Betreuung und Plazierung der Katheter in die Mesenterialgefäße

Dr.rer. nat. Reinhard Ziebig und den Klinisch theoretischen und Vorklinischen Instituten für die Durchführung der Ammoniumbestimmung

Dr. rer. Nat. Sabine Bühner und Fr. Martina Wehrich für Bereitstellung der Räumlichkeit in ihrem Labor zur Verarbeitung der Proben

European society for parenteral and enteral nutrition (ESPEN) für Verleihung der Fellowship-Auszeichnung, womit die finanzielle Grundlage für das Projekt hergestellt werden konnte

Nicht zuletzt allen Patienten, die an der Studie freiwillig teilgenommen haben und damit erst das Entstehen der Daten ermöglicht haben

Eigenständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich Esmatollah Kasim, geboren am 25.05.1971 in Kabul-Afghanistan, an Eides statt, daß die vorliegende Dissertationsschrift von mir selbst und ohne die unzulässige Hilfe Dritter verfaßt wurde, keine Kopie andere Arbeiten darstellt und daß die benutzten Hilfsmittel sowie die Literatur vollständig angegeben ist.

Berlin, den 01.08.2003

Esmatollah Kasim