

Gesamtamylase multipliziert und so als Aktivitätswerte verglichen werden.

Klinisch konnte gezeigt werden, daß Pankreas- α -Amylase bei der Beurteilung einer akuten Pankreatitis empfindlicher anspricht als Gesamtamylase und über die Summe der Fälle ebenso empfindlich ist wie die Lipase (turb. Methode).

Lipase und Pankreasamylase ergänzen sich insofern, als in einigen dikordanten Fällen jeweils nur ein Enzym pathologisch erhöht ist. Durch Bestimmung der Pankreas-Amylase zusätzlich zur Lipase werden 13% mehr pathologische Fälle erkannt (Referenz: Ultraschall, CT), jeweils bezogen auf die 3fache 95.-Perzentil-Obergrenze einer Kontrollgruppe.

Schrifttum:

1. JUNGE, W.: 13. Internationaler Kongreß für Klinische Chemie, Den Haag/Niederlande, 28. Juni bis 3. Juli 1987.
2. GERBER, M., WULFF, K.: Fortschritte in der spezifischen Bestimmung der Pankreas-Amylase. Lab.med. (Germany) 12, 110-113 (1988).

P 11

Die Bedeutung der Osmolalität in verschiedenen Körperflüssigkeiten für die Intensivmedizin

H. Fiedler und L. Lieb
Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsdiagnostik und Klinik für Anästhesie und Intensivmedizin
Bezirkskrankenhaus Suhl

Wasser- und Elektrolytstörungen durch Flüssigkeitsverschiebungen, durch iatrogene Einflüsse und mangelhafte Nierenfunktion haben bei kritisch Kranken eine hohe Prävalenz und bedürfen der ständigen Kontrolle. Kryoskopische Osmolalitätsmessungen gehören deshalb bei folgenden Problemstellungen zur (mindestens täglichen) Standarduntersuchung:

1. Die absolute Höhe bzw. die Veränderungen der Osmolalität erlauben Aussagen zur Prognose. Bei Serumosmolalitäten über 360 mmol/kg ($n = 83$) beträgt nach 1 Tag der Letalitätsfaktor 0,4 und steigt nach 3 Tagen auf 0,92.
2. Zur Früherkennung eines norm- oder polyurischen Nierenversagens wurde der Osmolalitätsquotient Urin/Serum und/oder die osmotische Clearance eingesetzt. Diese Funktionsgrößen einschließlich der Freie-Wasser-Clearance haben bei Sepsispatienten mit abdominalen Ursachen eine abwartende Haltung durch den lebensrettenden Eingriff der Relaparotomie ersetzt. Die renalen osmolalen Ausscheidungsmengen werden in Bilanzberechnungen einbezogen, um die Zufuhr von Kalorien, Wasser, Elektrolyten und anderen osmotisch aktiven Substanzen rechtzeitig zu verändern. Der kumulative Computerausdruck aller gemessenen und berechneten Größen gewährleistet die frühzeitige Erkennung sich anbahnender Funktionseinschränkungen der Niere (1).
3. Kleinmolekulare organische Substanzen tragen zum gemessenen osmotischen Druck bei, ohne in den üblichen Formeln zur Berechnung der Osmolalität erfaßt zu werden. Die resultierende osmotische Lücke kann zur Erkennung toxischer Substanzmengen (Ethanol) und zur Steuerung von Osmotherapeutika beitragen. Kleinmolekulare Lösungsvermittler (Propylenglykol) von Medikamenten (Etomidate) können bei unkontrollierter Anwendung kritische Osmolalitätssteigerungen herbeiführen (2).

Schrifttum:

1. FIEDLER, H., LIEB, L.: Anforderungen der Intensivmedizin an die Labordiagnostik. Z. med. Labor-Diag. 31, 192-199 (1990).

P 12

Monitoring of Lithium Therapy by the Use of Saliva instead of Blood Serum

W. Tadeusiak, M. J. Krawczyński and B. Balicka
Dept. of Laboratory Diagnostics, Medical Centre of Postgraduate Education, Warsaw

The increase of interest in uninvasive methods of material taking and standardization of methods of saliva collection encouraged us to investigate the possibility to replace the blood serum by saliva in monitoring of lithium therapy.

Investigations were carried out on 31 subjects (5 women and 26 men) treated at least for one year with lithium carbonate in doses 0.5-1.0 g/d. Lithium concentration was determined with flame photometry. Saliva was taken with "Salivette" container and simultaneously blood from cubital vein. During two years 73 determinations were carried out. For one group of patients (7) the determinations were carried out several times (3-10) to establish the stability of lithium concentration ratio in saliva and serum. Both, invidual as well as interindividual stability of this ratio was stated. Its value was 2.17 ± 0.16 , $sv = 7.4\%$. Only one patient showed the value of 0.93. The correlation factor between lithium concentration in blood serum and salvia was $r = 0.9025$ (all results) and $r = 0.9858$ (two extremal results excluded).

P 13

Bestimmung von Magnesium in EDTA-haltigen Flüssigkeiten mit einer enzymatischen Methode

S. W. Golf, A. Balsler, V. Graef, N. Katz und F. Schneider¹
Klinikum Gießen und Klinikum Marburg¹

Als Referenzmethode zur Bestimmung von Magnesium (Mg) in Körperflüssigkeiten wird die Atomabsorptionsspektroskopie (AAS) betrachtet. Wegen der hohen Anschaffungskosten eines AAS-Photometers wurden zahlreiche Versuche durchgeführt, eine chemische oder enzymatische Methode zu entwickeln. Bestimmungen von Mg im Vollblut oder Chelatbildner enthaltenden Lösungen waren mit chemischen Methoden allerdings nicht möglich.

Die kinetische Methode zur Bestimmung von Mg basiert auf einer magnesiuminduzierten Aktivierung der Hexokinase und anschließender Koppelung an die Reaktion der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase in Gegenwart von NADP⁺, ATP, Glucose, Digitonin und CuSO₄ bei pH 8,5. Die Probenvolumen-Fraktion am Endvolumen beträgt 1:201, eine 15minütige Vorinkubation von lysiertem Vollblut oxygeniert Hämoglobin vollständig. Die Meßzeit beträgt 2 Minuten. Die Magnesiumkonzentration wird durch Vergleich der ermittelten Extinktionsdifferenz bei 334 nm mit einer Standardkurve ermittelt. Regressionsanalysen der mit der AAS und enzymatischen Methode ermittelten Mg-Konzentrationen ergaben bei 120 Vollblut- und Serumproben eine Steigung von 1,0 und einen Korrelationskoeffizient von 0,92. Die vorgestellten methodischen Details erlauben die schnelle, automatisierbare enzymatische Bestimmung von Mg in biologischen Flüssigkeiten einschließlich EDTA-haltigem Vollblut.

P 14

Bestimmung von Pravastatin mittels Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography

R. Siekmeier, W. März und W. Groß
Gustav Embden-Zentrum der Biologischen Chemie,
Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt/Main

Pravastatin ist ein neuer, spezifischer, kompetitiver Inhibitor der HMG-CoA-Reduktase. In vivo stimuliert die Substanz die Express-

sion von LDL-Rezeptoren und führt auf diesem Weg zur Senkung des Plasmacholesterins. Bisher war die Bestimmung von Pravastatin nur mittels aufwendiger GC/MS-Methoden möglich. Hier wird eine HPLC-Methode zur Bestimmung von Pravastatin im Plasma vorgestellt.

Die Proben wurden mittels Festphasenextraktion an Bond-Elut-Cartridges extrahiert. Triamcinolonacetat diente als interner Standard. Die Trennung erfolgte an einer C8-Matrix (250* 4 mm). Der Eluent enthielt Methanol, Acetonitril und Wasser.

Die Methode ist linear im Bereich von 5 bis 50 ng/mL Pravastatin. Der Variationskoeffizient von Lauf zu Lauf hängt von der Pravastatin-Konzentration ab, liegt aber für den gesamten Meßbereich unter 12%.

Vier gesunde Probanden erhielten eine orale Einzeldosis von 60 mg Pravastatin, und die Plasmakonzentration des Pharmakons wurde bis 5 Stunden nach der Einnahme in Intervallen von einer halben Stunde bestimmt. Um die intra-individuelle Reproduzierbarkeit des Konzentrationsverlaufs zu bestimmen, wurde ein Proband dreimal an verschiedenen Tagen untersucht. Die maximale Plasmakonzentration von Pravastatin wurde etwa eine Stunde nach oraler Einnahme gefunden, und die Plasmahalbwertszeiten lagen zwischen 1,0 und 1,5 h. Intraindividuell waren die Profile gut reproduzierbar. Inter-individuell gab es deutliche Unterschiede im Verlauf der Pravastatin-Konzentrationen.

Die hier entwickelte HPLC-Methode eignet sich zur Bestimmung von Pravastatin im Plasma. Sie liefert pharmakokinetische Daten, die mit GC/MS-Messungen exzellent übereinstimmen.

P 15

Genetische Marker bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit

W. März¹, M. Proft¹, R. Siekmeier¹, Sabine Cezanne¹, J. Schreier², J. Kähler², H. Kronenberger², W. Schneider², M. Kaltenbach² und W. Groß¹

¹Gustav Embden-Zentrum der Biologischen Chemie und ²Zentrum der Inneren Medizin, Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt/Main

Genetische Polymorphismen der Apolipoproteine B und E sind mit der Höhe des Plasma- und LDL-Cholesterins assoziiert.¹ Einige Beobachtungen sprechen dafür, daß Variationen der Apolipoproteingene neben dem Lipoproteinmuster direkt das Koronarrisiko beeinflussen könnten.

In dieser Studie wurden Lipoproteine, Apolipoproteine (kinetische Nephelometrie), Lipoprotein (a) (RIA), ApoE-Phänotypen (Immuno-blotting) und ein Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus des ApoB-Gens (XbaI, polymerase chain reaction) bei 108 Patienten mit angiografisch gesicherter koronarer Herzkrankheit (KHK) und einer altersgleichen Kontrollgruppe (n = 58) untersucht. Verteilung der XbaI-Genotypen (X1/X1, X1/X2, X2/X2) und ApoE-Phänotypen sowie die Mittelwerte der Lipoproteine und Apolipoproteine [g/L] sind in der Tabelle zusammengefaßt:

	X1/X1	X1/X2	X2/X2	E2/2	E3/2	E3/3	E4/3	E4/2	E4/4
KHK [%]	28,7	45,4	25,9	0	11,1	53,7	31,5	0,9	2,8
Kontr. [%]	24,1	48,3	27,6	3,5	15,5	55,2	22,4	3,5	0

	C	TG	LDL-C	HDL-C	ApoA-I	ApoA-II	ApoB	Lp(a) ¹
KHK	2,12	1,61	1,43	0,37	1,26	0,52	0,92	0,23
Kontr.	2,16	1,08	1,47	0,47	1,47	0,47	0,88	0,115

¹ Median

Gesamt- und LDL-Cholesterin (C) diskriminieren nicht zwischen Patienten mit KHK und Gesunden. In der Verteilung der ApoB-Genotypen gab es keine Unterschiede zwischen den beiden Kollektiven. Allerdings war das X2-Allel in der Kontrollgruppe positiv mit Triglyceriden (TG), LDL-C und ApoB sowie invers mit HDL-C und ApoA-I assoziiert. Das ApoE4-Allel fand sich bei Pa-

tienten mit KHK deutlich häufiger als im Kontrollkollektiv. Ausgeprägte Unterschiede wurden bei TG und beim HDL-C beobachtet. ApoA-I war bei Patienten mit KHK erniedrigt, ApoA-II lag im Normbereich. Der Median des Lp(a) war in der Patientengruppe doppelt so hoch wie bei Gesunden. Die Ergebnisse unterstreichen die Bedeutung des ApoE-Polymorphismus sowie des Lp(a) als Risikoindikatoren. Die Relevanz genetischer Variation am ApoB-Locus bedarf weiterer Untersuchungen.

Schrifttum:

1. BRESLOW, J. L.: *Physiol. Rev.* 68, 85-132 (1988).

P 16

Charakterisierung des Gens für ApoE5-Frankfurt mittels Polymerase Chain Reaction, Restriction Isotyping und Temperatur-Gradienten-Gel-Elektrophorese (TGGE)

W. März, V. Ruzicka und W. Groß
Gustav Embden-Zentrum der biologischen Chemie,
Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt/Main

Apolipoprotein E (ApoE) ist Ligand des ApoB,E-Rezeptors. Es moduliert den Katabolismus triglyceridreicher Lipoproteine und ist an der Regulation der LDL-Konzentration beteiligt. Am ApoE-Locus kennt man die drei häufigen Allele ε2, ε3 und ε4. Der Polymorphismus beruht auf Substitutionen der Aminosäuren 112 und 158. ApoE4 enthält Arginin, ApoE2 enthält Cystein an beiden Positionen. ApoE3 enthält Cystein an Position 112 und Arginin an Position 158. In vivo wird ApoE4 schneller katabolisiert als ApoE2 und ApoE3. Dies führt zu einem erhöhten Flux von Remnant-Cholesterin in die Leber, einer Suppression von LDL-Rezeptoren und einer Erhöhung des Plasmacholesterins. Hier wird über eine Variante des ApoE berichtet, in der es offensichtlich durch Einführung einer zusätzlichen positiven Ladung in ein ApoE4-Molekül zu einer Hypercholesterinämie kommt.

Bei dem 43jährigen Patienten lag neben der Hypercholesterinämie lediglich eine essentielle Hypertonie vor. Die Lipoproteinanalyse ergab: Cholesterin (C) 2,66 g/l, Triglyceride (TG) 1,91 g/l, VLDL-C 0,34 g/l, VLDL-TG 1,05 g/l, IDL-C 0,26 g/l, LDL-C 1,85 g/l, HDL-C 0,47 g/l, ApoA-I 1,38 g/l, ApoB 1,29 g/l. Im Immunblot war der ApoE-Phänotyp des Patienten 5/3. In der SDS-PAGE hatte ApoE5 das gleiche Molekulargewicht wie ApoE3.

Mittels polymerase chain reaction (PCR) wurde ein 244 bp langes Fragment des ApoE-Gens amplifiziert und mit HhaI verdaut (1). Auf diese Weise ergab sich als scheinbarer Genotypus ε4/ε3. Damit handelt es sich bei ApoE5-Frankfurt um ein mutiertes ε4Allel. Durch vollständige PCR-Amplifikation der Exone 3 und 4 des ApoE-Gens und Analyse der Amplifikate mittels Temperatur-Gradienten-Gel-Elektrophorese (TGGE) konnte die für ApoE5-Frankfurt verantwortliche Mutation dem vierten Exon des ApoE Gens zugewiesen werden. ApoE5-Frankfurt unterscheidet sich damit von einer kürzlich beschriebenen ApoE-Mutante (2), bei der durch eine einzelne Aminosäuresubstitution (Glu₃ -> Lys) zwei zusätzliche Ladungen in ein ApoE3-Molekül eingeführt wurden.

Die Charakterisierung des Gens für ApoE5-Frankfurt illustriert die Leistungsfähigkeit der TGGE in der Diagnostik genetischer Stoffwechseldefekte. Die TGGE trennt Nucleinsäuren aufgrund ihres unterschiedlichen Schmelzverhaltens. Gegenüber anderen Verfahren der Genomanalyse setzt sie a priori keine Kenntnisse über Lage oder Art einer Mutation voraus. Sie ermöglicht die Nachweis nahezu jeder Punktmutation in Segmenten bis zu etwa 400 bp Länge. Die Methode ist einfach und erlaubt einen hohen Probendurchsatz. Sie stellt damit eine effiziente Screeningmethode im Vorfeld der DNA-Sequenzierung dar.

Schrifttum:

1. HIXSON, J. E., VERNIER, D. T.: *J. Lipid Res.* 31, 545-548 (1990).
2. TAJIMA, S., YAMAMURA, T., YAMAMOTO, A.: *J. Biochem.* 104, 48-52 (1988).