

Aus dem Zentrallabor  
(Leiter: Prof. Dr. med. M. Seyfarth)  
am Campus Lübeck  
des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein  
und der Medizinischen Fakultät  
(Dekan: Prof. Dr. med. W. Solbach)  
der Universität zu Lübeck

---

**Analyse des Kohlenhydrat- defizienten Transferrins im Serum des  
Menschen mittels Hochleistungs- Flüssigkeitschromatographie  
Vergleich analytischer Methoden und Etablierung einer präparativen Methode**

Inauguraldissertation  
zur  
Erlangung der Doktorwürde  
der Universität zu Lübeck

- Aus der Medizinischen Fakultät -

vorgelegt von  
Ulrike Schmitz  
aus Neuss am Rhein

Lübeck 2008

1. Berichterstatter: Herr Professor Dr. med. M. Seyfarth

2. Berichterstatter/ Berichterstatterin: Herr PD Dr. med. K. Junghans

Tag der mündlichen Prüfung: 07.05.2009

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 07.05.2009

Für meine Eltern Jörg und Dorothee Schmitz

# Inhaltsverzeichnis

<b>Kapitel:</b>	<b>Seitenzahl:</b>
<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	1
<b>Verzeichnis häufig verwendeter Abkürzungen</b> .....	5
<b>1. Einleitung</b> .....	8
1.1. Alkohol in Deutschland.....	8
1.2. Labordiagnostische Marker des Alkoholkonsums.....	11
1.2.1. Ethanol im Blut oder Serum.....	11
1.2.2. Acetaldehyd im Serum.....	12
1.2.3. Ethylglukuronid im Urin oder Serum.....	12
1.2.4. Ethylsulfat.....	12
1.2.5. Phosphatidylethanol.....	13
1.2.6. Fettsäureester des Ethanols im Serum.....	13
1.2.7. 5-Hydroxy-Tryptophan-Glucuronid und 5-Hydroxy-Indolacetat.....	13
1.2.8. Gamma-Glutamyltransferase.....	14
1.2.9. Mittleres Korpuskuläres Erythrozytenvolumen.....	14
1.2.10. Transaminasen (ASAT, ALAT).....	15
1.3. Kohlenhydrat- defizientes Transferrin (CDT).....	15
1.4. Quantitative Bestimmung des CDT.....	20
1.5. Fragestellung der Arbeit.....	22
<b>2. Materialien und Methoden</b> .....	24
2.1. Geräte.....	24
2.1.1. Hochleistungs- Flüssigkeitschromatographie (HPLC).....	24
2.1.2. Konzentrierung isolierter Transferrinfraktionen.....	25
2.1.3. Isoelektrische Fokussierung (IEF).....	25
2.2. Untersuchungsmaterial ( Seren).....	26
2.3. Chemikalien, Reagenzien, Lösungen.....	26
2.3.1. Chemikalien.....	26

2.3.2.	Reagenzien und Lösungen.....	27
2.3.2.1.	HPLC- Probenvorbereitung und Eluenten.....	27
2.3.2.2.	Isoelektrische Fokussierung.....	29
2.4.	Methoden.....	29
2.4.1.	High-Performance- Liquid- Chromatographie- (HPLC)- Methoden.....	29
2.4.1.1.	HPLC- Methode des Zentrallabors Campus Lübeck.....	30
2.4.1.2.	HPLC- Methode der Firma Recipe.....	31
2.4.1.3.	HPLC- Methode Chromsystems.....	34
2.4.1.4.	HPLC- Methode Helander et al.....	35
2.4.2.	Präparative Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC).....	37
2.4.3.	Isoelektrische Fokussierung (IEF).....	38
2.5.	Versuchsdurchführung.....	40
2.5.1.	CDT- Bestimmung mittels HPLC: Vergleich zweier in der Routinediagnostik des CDT etablierter Methoden (kommerzielle Methode Fa. Recipe, laboreigene Methode ZLCL).....	40
2.5.2.	HPLC- Methodenvergleich unter Einschluss einer weiteren kommerziellen Methode (Fa. Chromsystems).....	41
2.5.3.	Methodenvergleich mit seriell gemischten Proben.....	41
2.5.4.	Modifizierung einer etablierten HPLC- Methode zur präparativen Isolierung der Ladungsisoformen des Transferrins.....	42
2.6.	Statistik.....	43
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>44</b>
3.1.	CDT- Bestimmung mittels HPLC: Vergleich zweier etablierter Methoden (kommerzielle Methode Fa. Recipe, laboreigene Methode ZLCL).....	44
3.1.1.	Bestimmung der Impräzision in der Serie.....	44
3.1.2.	Bestimmung der Impräzision von Lauf zu Lauf.....	45
3.1.3.	Statistik des Methodenvergleichs.....	46
3.2.	CDT- Bestimmung in seriell gemischten Proben.....	55
3.2.1.	Methode ZLCL, Auswertung baseline.....	55
3.2.2.	Methode ZLCL, Auswertung valley-to-valley.....	56
3.2.3.	Methode Recipe, Auswertung valley-to-valley.....	56

3.2.4. Methode Recipe, Auswertung baseline.....	56
3.3. Verifizierung der Untersuchungsergebnisse durch einen erneuten HPLC- Methodenvergleich unter Einschluss einer weiteren kommerziellen Methode (Fa. Chromsystems).....	57
3.3.1. Chromatogramme der verschiedenen Methoden.....	58
3.3.2. HPLC- Methode Helander et al.....	59
3.3.3. Statistik des Methodenvergleichs.....	61
3.4. Modifizierung einer etablierten HPLC- Methode zur präparativen Isolierung der Ladungsisoformen des Transferrins.....	65
3.4.1. Bestimmung der Elutionszeiten der Ladungsisoformen des Transferrins in der präparativen HPLC.....	65
3.4.2. Überprüfung der aufgefangenen Flüssigkeit auf ihren Transferrinisoformengehalt in der Isoelektrischen Fokussierung.....	67
3.4.3. Präparative Isolierung der Transferrinisoformen nach der für große Probenvolumina modifizierten HPLC- Methode nach Helander et al.....	68
3.4.4. Nachweis der isolierten Transferrinformen mit der Isoelektrischen Fokussierung..	69
3.4.5. Konzentrierung der Proben durch Membranfiltration und abschließender Nachweis der Isotransferrine in der IEF.....	70
<b>4. Diskussion.....</b>	<b>71</b>
4.1. HPLC- Methodenvergleich zur Bestimmung des CDT im menschlichen Serum.....	72
4.1.1. Vergleich einer kommerziellen (Fa. Recipe) und einer laboreigenen HPLC- Methode (ZLCL) zur Bestimmung des CDT.....	72
4.1.2. Vergleich zweier kommerzieller Methoden ( Fa. Recipe, Fa. Chromsystems) und der laboreigenen Methode (ZLCL) zur Bestimmung des CDT.....	72
4.1.3. CDT- Bestimmung mit seriell gemischten Proben zur Überprüfung, ob sich Präferenzen für eine Integrationsmethode ableiten lassen.....	81
4.2. Modifizierung einer etablierten HPLC- Methode zur präparativen Isolierung der Ladungsisoformen des Transferrins.....	82

<b>5. Zusammenfassung.....</b>	<b>84</b>
<b>6. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>85</b>
<b>7. Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>93</b>
<b>8. Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>95</b>
<b>9. Anhang.....</b>	<b>97</b>
<b>10. Danksagung</b>	
<b>11. Lebenslauf</b>	

## Häufig verwendete Abkürzungen

### A

Abb.	Abbildung
ALAT	Alanin- Aminotransferase
ASAT	Aspartat- Aminotransferase
Aqua bidest.	Doppelt destilliertes Wasser
AU	<i>Absorbance unit</i>

### B

Bis-Tris	2,2 Bis- (hydroxyethyl)- (iminotris)- (hydroxymethyl)methan
bs	baseline- Auswertung
bs/vtv	baseline/valley-to-valley- Auswertung
BSA	<i>bovine serum albumine</i>

### C

CDT	<i>Carbohydrate deficient transferrin</i>
CE	Kapillarelektrophorese

### D

DHS	Deutsche Hauptstelle gegen Suchtgefahren e.V.
-----	---

### E

EIA	Enzymatische Immunoassay
-----	--------------------------

### F

Fe	Ferrum, Eisen
FPLC	<i>Fast Protein Liquid Chromatography</i>

### G

$\gamma$ -GT	gamma- Glutamyltransferase
--------------	----------------------------

## **H**

H<sub>2</sub>O Wasser

HPLC *High- Performance- Liquid- Chromatographie*

## **I**

IEF Isoelektrische Fokussierung

IFCC *International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*

## **L**

Lsg. Lösung

## **M**

MCV mittleres korpuskuläres Erythrozytenvolumen

MIT Methylisothiazolone

MW Mittelwert

## **N**

N Anzahl

NaCl Natriumchlorid

NTA Nitrilotriessigsäure

## **R**

RIA Radioimmunoassay

## **S**

SD Standardabweichung

## **T**

Tab. Tabelle

TIA Turbidimetrischer Immunoassay

TMB 3,3'5,5'-tetramethyl Benzidine

## **V**

V	Varianz
VK	Variationskoeffizient
vtt	valley-to-valley- Auswertung

## **W**

W	Watt
WHO	Weltgesundheitsorganisation

## **Z**

ZLCL	Zentrallabor	Universitätsklinikum	Schleswig-Holstein,	Campus
	Lübeck			

## **Verwendete Einheiten**

bar	Druck
d	die, Tag
Da	Dalton
M	Molar
mA	Milliampere
min	Minute
nm	Nanometer
V	Volt
Vh	Volthours
W	Watt

# 1. Einleitung

## 1.1. Alkohol in Deutschland

Alkohol als ein für jeden erschwinglicher Genuss- und Suchtstoff gehört heute wie selbstverständlich dazu, wenn Menschen sich aus den verschiedensten Gründen an einem Tisch zusammenfinden. In Deutschland scheinen dieser Tradition viele Bürger ausgiebiger nachzugehen als in den meisten anderen Ländern in Europa, schließlich liegen wir mit einem jährlichen pro Kopf Konsum reinen Alkohols von 10,1 Litern (2006) weit oben auf dem 5. Platz der europäischen Rangliste [73]. Diese Zahl zeigt laut Untersuchungen der deutschen Hauptstelle gegen Suchtgefahren e.V. (DHS) seit Jahren eine erschreckende Konstanz. Unter den 52 Millionen (52.010.517 am 31.12.2005) 18- bis 64- jährigen Einwohnern der Bundesrepublik Deutschland liegt in der Berechnung der DHS die Zahl der Alkoholabhängigen bei 1,3 Millionen (2,4%). Man findet jedoch unterschiedliche Angaben der einzelnen Autoren, die sich vorwiegend um die 2,5 Millionen einpendeln [67,68,72,73].

Zusätzlich zu den bereits Abhängigen wird von der DHS eine Studie zitiert, in der eine Zahl von ca. 9,5 Millionen (18,3 %) Deutschen der gleichen Altersklasse beschrieben wird, die einen riskanten Alkoholkonsum betreiben [26,67]. Als Indikatoren dafür werden Gramm- Angaben von Alkohol verwendet, oberhalb derer auf Dauer psychische, physische und soziale Folgeschäden zu erwarten sind. Die Grenzwerte eines riskanten Alkoholkonsums wurden in einer Repräsentativerhebung der Bundesregierung von 1997 noch mit 20 – 40 g/d für Frauen und 30 – 60 g/d für Männer festgelegt [67]. Eine aktuelle Empfehlung der DHS definiert jedoch eine risikoarme Schwellendosis im Umgang mit Alkohol, die beim Mann bei  $\leq 24$  g/d reinen Alkohols und bei der Frau bei  $\leq 12$  g/d liegt [73].

Addiert man die 9,5 Millionen Deutschen, die einen riskanten Alkoholkonsum betreiben mit den 1,3 Millionen alkoholabhängigen Deutschen, so erhält man die Zahl von 10,8 Millionen Deutschen zwischen 18 und 64 Jahren (13 % der Gesamtbevölkerung), bei denen Folgeschäden durch Alkohol zu erwarten sind.

Analysen zu alkoholbedingten Gesundheitsstörungen und Todesfällen gehen von jährlich 73.714 Todesfällen durch Alkohol allein oder durch den kombinierten Konsum von Tabak und Alkohol aus. Damit beträgt der Anteil der alkoholbedingten Todesfälle an allen Todesfällen im Alter von 35 und 65 Jahren bei Männern 25 % und bei Frauen 13 % [26,73].

Ein riskanter Alkoholkonsum ist durch die oben genannte tägliche Trinkmenge definiert, oberhalb derer mit Folgeschäden gerechnet werden muss.

Der Alkoholabusus ist gleichzusetzen mit Alkoholmissbrauch oder schädlichem Gebrauch von Alkohol und wird laut ICD- 10 als somatische oder psychische oder soziale Schädigung durch den Alkoholkonsum beschrieben, ohne die Kriterien einer Alkoholabhängigkeit zu erfüllen [19,48]. Um einen Missbrauch handelt es sich laut DSM- IV bei Zutreffen eines von 4 Kriterien innerhalb von 12 Monaten (Vernachlässigen von Pflichten, Alkohol trotz körperlicher Risiken, Alkohol trotz Probleme mit der Polizei, Alkohol trotz psychosozialer Probleme) [52].

Als Abhängigkeit definiert die Weltgesundheitsorganisation (WHO) einen seelischen, eventuell auch körperlichen Zustand, der dadurch charakterisiert ist, dass ein dringendes Verlangen oder unbezwingbares Bedürfnis besteht, sich die entsprechende Substanz fortgesetzt und periodisch zuzuführen. Durch zunehmende Gewöhnung (Abstumpfung) besteht die Tendenz, die Dosis zu steigern [81].

Die Alkoholabhängigkeit wird international klar definiert (DSM-IV: Alkoholabhängigkeit 303.90 [52], ICD-10: Abhängigkeitssyndrom F 10.2 [19]). Nach ICD- 10 müssen innerhalb von 12 Monaten 3 der in Tabelle 1.1. (S. 10) aufgeführten 6 Kriterien erfüllt sein, nach DSM- IV müssen 3 von 7 Kriterien zutreffen, um die Diagnose „Alkoholabhängigkeit“ zu stellen.

Auch die wirtschaftlichen Auswirkungen sind nicht zu unterschätzen, die Kosten alkoholbedingter Krankheiten belaufen sich auf geschätzte 20,6 Mrd. Euro pro Jahr [1]. Alkohol kommt als Auslöser vieler akuter und chronischer Erkrankungen im klinischen Alltag in Frage, hier ist vor allem die chronische Pankreatitis zu nennen, bei der in der Ätiologie der chronische Alkoholkonsum mit ca. 80 % angegeben wird [34]. Aber auch die Leberzirrhose (in ca. 60 % der Fälle hervorgerufen durch Alkoholabusus), die akute Pankreatitis (zu ca. 35 %

verursacht durch übermäßige Alkoholzufuhr) und in Kombination mit Tabakrauchen das Ösophaguskarzinom sind Diagnosen, die häufig als Folge eines über lange Zeit anhaltenden überhöhten Alkoholkonsums auftreten [34].

**Tabelle 1.1.:** Kriterien für Alkoholabhängigkeit nach DSM- IV und ICD- 10 [19,52]

<b>DSM- IV</b>	<b>ICD- 10</b>
Toleranzentwicklung	Nachweis einer Toleranzentwicklung
Entzugssymptome oder Substanzgebrauch zur Abschwächung oder Vermeidung der Symptome	Körperliches Entzugssyndrom bei Beendigung des Konsums
Substanzgebrauch länger oder in größeren Mengen als beabsichtigt	Verminderte Kontrollfähigkeit bezüglich Beginn, Beendigung und Menge des Konsums
Anhaltender Wunsch/ erfolglose Versuche, Substanzgebrauch zu kontrollieren	Starker Wunsch oder Zwang, Substanz zu konsumieren
Hoher Zeitaufwand für Beschaffung, Gebrauch und Erholung	
Aufgabe/ Einschränkung von sozialen, beruflichen und Freizeitaktivitäten	Vernachlässigung Vergnügen/ Interessen zugunsten des Substanzkonsums
Fortgesetzter Substanzgebrauch trotz eindeutig schädlicher Folgen	Anhaltender Substanzkonsum trotz eindeutig schädlicher Folgen

Bei dieser Größenordnung der Zahlen ist es verständlich, dass zur klinischen Diagnose des Alkoholabusus oder der Abhängigkeit zuverlässige Kriterien und Parameter unabdingbar sind. In erster Linie wird durch die Anamnese und die gängigen Fragebögen CAGE (Cut down, Annoyed, Guilty, Eye opener - ein mit diesen Stichpunkten vier Fragen umfassender Test), MAST (Michigan Alcoholism Screening Test - 25 Fragen bezüglich Umgang mit Alkohol), AUDIT (Alcohol Use Disorders Identification Test - ein von der WHO erstellter, 10 Fragen umfassender Test bezüglich Häufigkeit und Symptomen eines Alkoholkonsums) und LAST (Lübecker Alkoholabhängigkeits- und Missbrauchs- Screening- Test- 7 Fragen bezüglich alkoholbedingter Störungen) eine Diagnose versucht [56]. Diese ist aber ohne eine ehrliche Beantwortung der Fragen kaum gebrauchsfähig und damit von der Mitarbeit des Patienten abhängig.

Le Go versuchte mit seinen Kardinalzeichen für problematisches Trinkverhalten einige physische Zeichen zu beschreiben, die auf eine mögliche Frühphase des

pathologischen Trinkens hinweisen könnten. Dazu zählte er unter anderem eine erhöhte Hautvaskularisation (z.B. Teleangiektasien im Gesicht), konjunktivale Injektionen und einen Tremor des Mundes, der Zunge und der Hand [41]. Diese sehr unspezifischen Frühzeichen machen deutlich, dass der Schwerpunkt der Alkoholismusdiagnostik in der Anamnese und in der Laboranalyse zu suchen ist. Es wird ein Laborparameter gefordert, der in seiner diagnostischen Spezifität und Sensitivität so zuverlässig ist, dass er nicht nur zur eigentlichen Diagnose, sondern auch zur Beurteilung der Alkoholentzugstherapie und zur Rückfall-Diagnostik herangezogen werden kann.

Jedes Labor muss sich seiner Verantwortung bei Aussagen über einen möglichen Alkoholabusus eines Patienten anhand der Laborwerte im Klaren sein, da diese auch für arbeitsmedizinische, verkehrsmedizinische und forensische Fragestellungen herangezogen werden können.

## 1.2. Labordiagnostische Marker des Alkoholkonsums

Eine Vielzahl von Laborparametern kann mit unterschiedlichem Erfolg für die Diagnose und Verlaufskontrolle des chronisch erhöhten Alkoholkonsums eingesetzt werden. Hierzu gehören neben Bestimmungen des Alkohols und seiner Metabolite auch einige Untersuchungen von Messgrößen, deren Konzentration direkt oder indirekt durch den aufgenommenen Alkohol beeinflusst wird.

### 1.2.1. Ethanol im Blut oder Serum

Die Blutalkoholkonzentration ist direkt proportional zur aufgenommenen Ethanol-Menge und gibt Aufschluss über den Alkoholkonsum in den zurückliegenden Stunden. Der Abbau des Alkohols im Blut vollzieht sich mit ca. 0,1g pro Kilogramm Körpergewicht pro Stunde. Für den Nachweis eines chronischen Alkoholabusus ist eine isolierte Bestimmung der Alkoholkonzentration im Vollblut oder Serum jedoch ungeeignet, da sie nur den akuten Alkoholkonsum aufzeigen kann und damit in der Differenzierung zwischen gelegentlicher und chronischer Alkoholzufuhr versagt [8,65].

### 1.2.2. Acetaldehyd im Serum

Das primäre Oxidationsprodukt im Stoffwechsel des Ethanols ist der Acetaldehyd. Seine Konzentration im Blut steigt nach Alkoholkonsum ebenfalls an. Zur Analyse des Acetaldehyd existieren Gaschromatographie- (GC-) und Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie- (HPLC-) Methoden. Ein in einer Versuchsreihe erprobter Nachweis des an HbA1 gebundenen Acetaldehyd konnte durch eine Sensitivität von 25-50% nicht überzeugen [40,44,55]. Gegenüber der Ethanolbestimmung bietet die Acetaldehydbestimmung wegen der niedrigen Konzentration (im  $\mu\text{M}$ - Bereich) [21] und des schnellen enzymatischen Abbaus des Analyten zu Acetat keine Vorteile in der Diagnostik des chronisch erhöhten Alkoholkonsums [21,55].

### 1.2.3. Ethylglukuronid im Urin oder Serum

Ethylglukuronid als nicht oxidatives Stoffwechselprodukt von Ethanol tritt nach Alkoholkonsum im Blut oder Urin auf. Es wird vorwiegend durch hepatische Glukuronidierung gebildet und renal ausgeschieden. Ethylglukuronid ist auch in Haaren und noch post mortem nachweisbar. Die Zeitspanne der Nachweisbarkeit von Ethylglukuronid wird im Urin mit bis zu 39 h angegeben bei einer diagnostischen Sensitivität von 100 % [15], im Serum liegt sie bei etwa 18 h [79]. Durch die längere Nachweisbarkeit erweitert Ethylglukuronid das Zeitfenster der Labordiagnostik eines Alkoholkonsums, kann aber wie die Ethanolbestimmung selbst keine Differenzierung zwischen einmaliger und chronischer Alkoholzufuhr bieten [60].

### 1.2.4. Ethylsulfat

Ethylsulfat entsteht in einer Konjugationsreaktion aus Ethanol und aktiviertem Sulfat zu größtem Teil in den Leberzellen. Eine Nachweismethode wurde für Ethylsulfat aus dem Urin mittels Flüssigkeitschromatographie/ Elektrospray Ionisierung/ Massenspektrometrie entwickelt. Besonders in der kombinierten Bestimmung mit Ethylglukuronid kann Ethylsulfat zur Bestimmung eines akuten Alkoholkonsums herangezogen werden [20,29].

### 1.2.5. Phosphatidylethanol

Phosphatidylethanol ist ein abnormes Phospholipid, welches ausschließlich bei Anwesenheit von Ethanol durch das Enzym Phospholipase D in der Zellmembran gebildet wird. Es kann im Blut von Patienten, die einen Alkoholmissbrauch betreiben, bis zu 2 Wochen nach dem letzten Alkoholkonsum nachgewiesen werden. Als Nachweismethode dient die HPLC mit Streulichtdetektion (ELSD, evaporative light scattering detection). In neueren Studien konnte eine gute Korrelation zwischen Alkoholkonsum und Phosphatidylethanol im Blut nachgewiesen werden, sowie auch eine gute Spezifität und Sensitivität (99 %) [4,5,27]. Phosphatidylethanol kann auch im Urin von Patienten nachgewiesen werden. Als Verfahren wurde eine Flüssigkeitschromatographie mit einem Massenspektrometer entwickelt, wodurch auch Ethylglukuronid und als weiterer Marker Ethylsulfat bestimmt werden können. Bei diesem Verfahren zeigte sich Phosphatidylethanol jedoch als weniger sensitiv als die beiden anderen Analyten [11].

### 1.2.6. Fettsäureester des Ethanols im Serum

Ethyl-Fettsäureester sind weitere nicht-oxidative Metaboliten des Ethanols, die ausschließlich nach Alkoholkonsum bis zu 24 Stunden im Serum messbar sein sollen. Der Anstieg dieser Parameter korreliert mit einem Anstieg der Blutalkoholkonzentration, wobei ein größerer Anstieg bei Patienten mit chronischem Alkoholkonsum beobachtet werden konnte als bei Patienten nach einem einmaligen Alkoholexzess. Dies lässt eine Bedeutung als Parameter für einen chronischen Alkoholkonsum erhoffen [38].

### 1.2.7. 5-Hydroxy-Tryptophan-Glucuronid und 5-Hydroxy-Indolacetat

Als Abbauprodukte des Serotonins fallen diese Stoffe im Urin bei Alkoholkonsum erhöht an und können über mehrere Stunden (ca. 7 Stunden, danach abfallende Tendenz) nachgewiesen werden. Das Verhältnis von 5-Hydroxy-Tryptophan-Glucuronid zu 5-Hydroxy-Indolacetat ist dabei als Nachweisparameter entscheidend. Als Nachweisverfahren findet die HPLC Verwendung [15].

Alle aufgeführten Metabolite und Derivate des Ethanols sind derzeit in der klinischen Anwendung noch nicht als Alkoholismuskriterium etabliert.

### 1.2.8. Gamma- Glutamyltransferase

Die Aktivität der Gamma- Glutamyltransferase ( $\gamma$ - GT) im Plasma oder Serum wird in erster Linie durch die Leber und das Gallengangsepithel bestimmt, da hier große Mengen des Enzyms an die Plasmamembran der Zellen gebunden vorliegen und somit leicht in das Plasma gelangen können. Durch chronische Alkoholfuhr steigt die Plasma- bzw. Serumkonzentration dieses Enzyms an. Dies ist auf eine Enzyminduktion durch Ethanol oder seine Stoffwechselprodukte, einen Austritt des Enzyms aus geschädigten Hepatozyten, eine gesteigerte Synthese bei sekundärer Cholestase, ein vermehrtes „shedding“ (Abgang von gefalteten Membranteilen ins Plasma) und auf einen verzögerten Abbau zurückzuführen. Die  $\gamma$ - GT ist aber auch durch eine Vielzahl anderer Faktoren beeinflussbar und produziert deshalb falsch- positive Ergebnisse im Sinne der Alkoholismusdiagnostik, wie z.B. im Rahmen einer hepatobiliären Erkrankung, Adipositas, Diabetes mellitus, Pankreatitis, bei verschiedenen Medikamenten etc. Eine Normalisierung der Serumkonzentration ist nach 4- 5 Wochen Alkoholabstinenz zu erwarten. Die  $\gamma$ - GT ist ein Indikator des chronischen Alkoholkonsums, nach einmaligem Trinkexzess zeigt sich kein Anstieg. Mit einer immer wieder unterschiedlich beschriebenen diagnostischen Sensitivität von 60- 90% und einer diagnostischen Spezifität im relativ weiten Bereich von 50- 85% in den unterschiedlichen Untersuchungen zeigt sich, dass dieser Parameter nur begrenzt geeignet ist zum Screening des Alkoholabusus, jedoch klinisch häufig Verwendung findet als richtungsweisender Labormarker bei bestehendem Verdacht eines Alkoholmissbrauchs [24,55].

### 1.2.9. Mittleres korpuskuläres Erythrozytenvolumen

Ein weiterer häufig verwendeter Laborparameter in der Alkoholismusdiagnostik ist das mittlere korpuskuläre Erythrozytenvolumen (MCV). Dieses erhöht sich mit der Menge und der Häufigkeit des Alkoholkonsums, steigt aber erst nach 4- 6 Wochen täglicher Alkoholfuhr von  $>60$  g an und braucht mehrere Monate der Abstinenz, um sich wieder zu normalisieren. Daher ist das MCV für eine Abstinenzkontrolle ungeeignet. Die alkoholbedingte Makrozytose ist wahrscheinlich auf eine Suppression des Knochenmarkes zurückzuführen. Eine Makrozytose wird auch verursacht durch z.B. Vitamin B12- oder Folsäuremangel, Hypothyreose und chronische

Lebererkrankungen. Die Sensitivität des MCV für die Diagnose des chronisch erhöhten Alkoholkonsums wird mit ungefähr 40- 50 % angegeben, wohingegen die diagnostische Spezifität Werte um 80 % erreichen soll [55,56].

#### 1.2.10. Transaminasen (ASAT, ALAT)

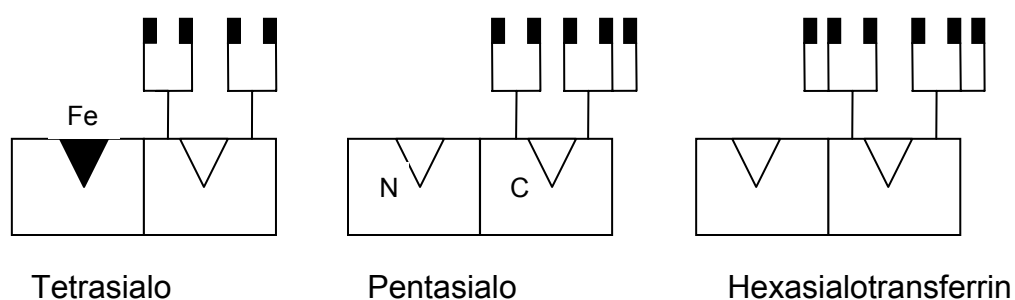
Die Transaminasen als im Organismus weit verbreitete Enzyme sind nicht rein leberspezifisch, aber ihr Anstieg im Zusammenhang mit Alkoholabhängigkeit wird vorwiegend durch die Schädigung der Hepatozyten verursacht. Um einen alkohol-induzierten Enzymanstieg wahrscheinlich zu machen, bedient man sich des ASAT/ALAT- Quotienten: Ein Quotient  $> 2$  spricht für einen durch Alkohol hervorgerufenen Leberschaden. Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass Ethanol vorwiegend das Mitochondrium schädigt, wobei verstärkt die mitochondriale ASAT freigesetzt wird [55].

Zusammenfassend ist zu sagen, dass keiner der aufgeführten Marker bei einmaliger Bestimmung einen Alkoholmissbrauch in der Frühphase sicher zu identifizieren vermag. Ein Verdacht kann zwar erhoben werden, dennoch bedarf es immer einer ausführlichen Anamnese und klinischen Untersuchung, ohne die kein Labormarker eine Diagnosestellung herbeiführen kann [55]. Durch eine Kombination verschiedener Marker kann eine Verbesserung der diagnostischen Sensitivität erreicht werden, leider oft unter Verschlechterung der Spezifität der Alkoholismusdiagnostik [50,55]. Im klinischen Alltag wird oft die Kombination von  $\gamma$ - GT und Leberenzymen verwendet, um eine Aussage über den Grad der alkoholtoxischen Leberschädigung zu machen.

#### 1.3. Kohlenhydrat- defizientes Transferrin (CDT)

Das 1976 von Helena Stibler [57] aus dem Liquor alkoholabhängiger Patienten isolierte Kohlenhydrat- defiziente Transferrin (carbohydrate- deficient transferrin, CDT) gilt derzeit als der spezifischste Parameter in der Labordiagnostik des chronischen Alkoholabusus [6,14,35,45].

Transferrin, das 80 kDa große Eisentransportprotein des menschlichen Plasmas, enthält zusätzlich zur Polypeptidkette, die u.a. zwei Bindungsstellen für Eisen bildet, auch zwei in ihrem Auftreten und Verzweigungsgrad variable Kohlenhydratseitenketten vom komplexen Typ, die negativ geladene Sialinsäuren als terminale Bausteine aufweisen. Aufgrund genetischer Aminosäure-Variationen, unterschiedlicher Beladung mit  $\text{Fe}^{3+}$ - Ionen und variabler Struktur der Glykanketten zeigt Transferrin eine ausgeprägte Mikroheterogenität (Abb. 1.1.), die mit geeigneten Methoden nachzuweisen ist [16].

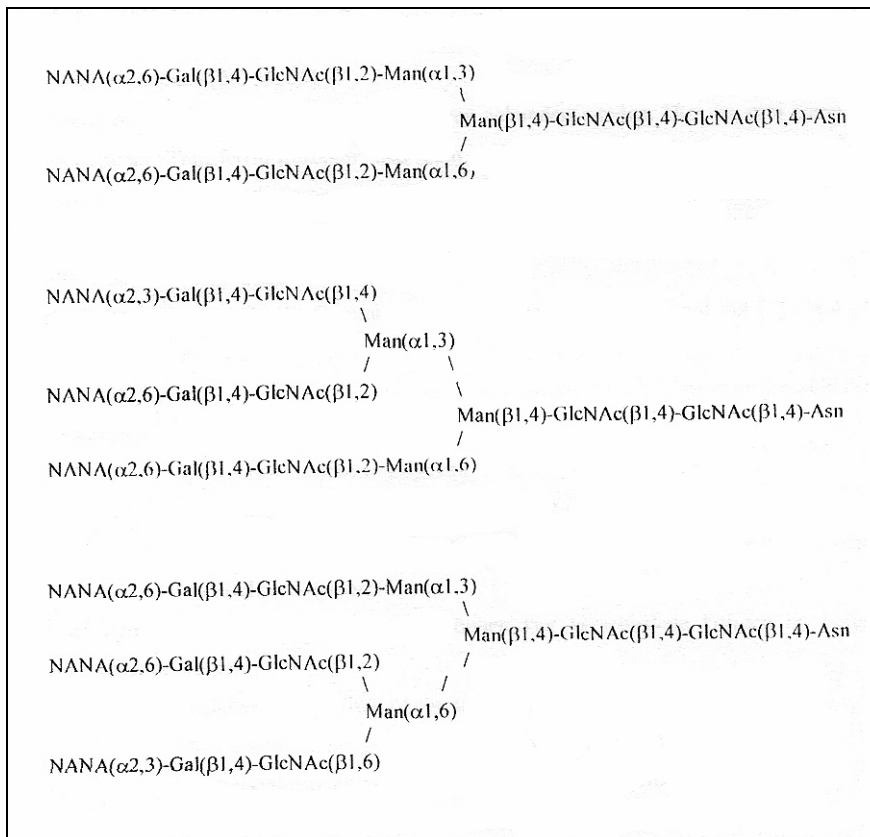


**Abbildung 1.1.:** Mikroheterogenität des menschlichen Transferrins

Die an die Polypeptidkette (2 Rechtecke für die strukturell verwandten N- und C- terminalen Domänen des Proteins) gebundenen Kohlenhydratseitenketten tragen mit unterschiedlichem Verzweigungsgrad Sialinsäure als terminalen Baustein (schwarz gefärbtes Rechteck). Transferrin besitzt zwei Eisenbindungsstellen (Dreiecke), wovon im Beispiel nur eine beladen ist (Fe im schwarz gefärbten Dreieck).

Betrachtet man den Aufbau der Glykanketten, so nimmt beim abstinenten Gesunden den größten Anteil am gesamten Plasma- Transferrin mit 64-80 % das so genannte Tetrasialotransferrin ein, das zwei biantennäre Glykane mit insgesamt vier terminalen Sialinsäuren enthält. Als höher sialylierte Transferrine treten Penta- (12- 18 %) und Hexasialotransferrin (1- 3 %) auf, bei denen eine bzw. beide Glykanketten triantennär aufgebaut sind. Ein niedrigerer Sialylierungsgrad liegt im Trisialotransferrin (nur ein Glykan mit drei Antennen, alternativ zwei Glykane, eines biantennär, eines monoantennär) und Disialotransferrin (nur ein biantennäres Glykan) vor, deren Anteil am gesamten Transferrin beim gesunden Nichttrinker 4,5- 9 % bzw. < 2,5 % ausmacht (Abb. 1.3., S. 18); Monosialotransferrin (nur ein monoantennäres Glykan) und

Asialotransferrin (kein Glykan) lassen sich beim gesunden Abstinenzler praktisch nicht nachweisen [6].



**Abbildung 1.2.:** Typische Glykankettenstrukturen des Transferrins [28]

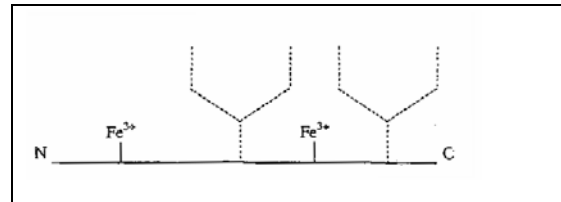
NANA: N- Acetyl- Neuraminsäure, Gal: Galactose, GlcNAc: N- Acetyl- Glucosamin, Man: Mannose, Asn: Asparagin

Als CDT wird eine Fraktion von Transferrin- Isoformen bezeichnet, die eine verminderte Anzahl an Kohlenhydratseitenketten aufweisen. Definitionsgemäß sind dies die Isoformen Asialo-, Monosialo- und Disialotransferrin, wobei der Asialoform wahrscheinlich die kompletten Glykanstrukturen fehlen, während das Monosialotransferrin nur 1 Glykan mit nur einer terminalen Sialinsäure besitzt. Eine Zeit lang wurde auch ein Teil der Trisialotransferrinfraktion in die CDT-Fraktion mit einbezogen, wobei aber letzten Endes eine Verschlechterung der diagnostischen Effizienz nachgewiesen werden konnte [43].

Bei chronischem Alkoholkonsum zeigt sich im Serum eine Verschiebung des Verhältnisses der Transferrin- Isoformen zu Gunsten der CDT- Fraktion, d.h. der Anteil der geringer glykosylierten Varianten nimmt nachweisbar zu.

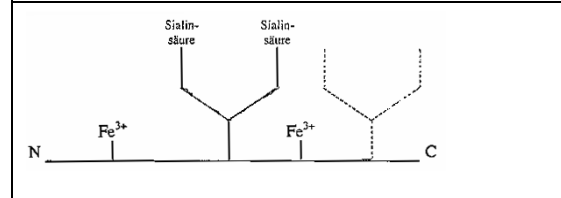
Asialotransferrin,  $Fe^{3+}_2$  :

0 %



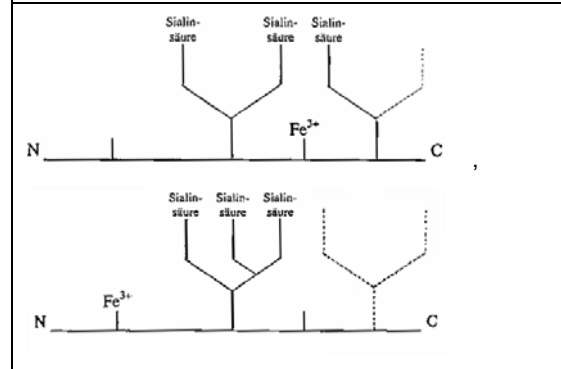
Disialotransferrin,  $Fe^{3+}_2$  :

<2,5 %



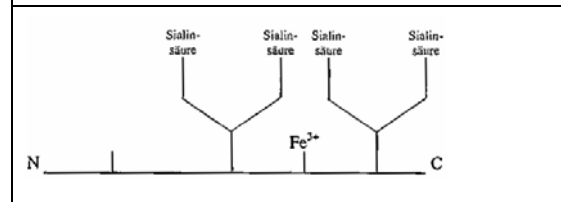
Trisialotransferrin,  $Fe^{3+}_{C1/N1}$  :

4,5-9 %



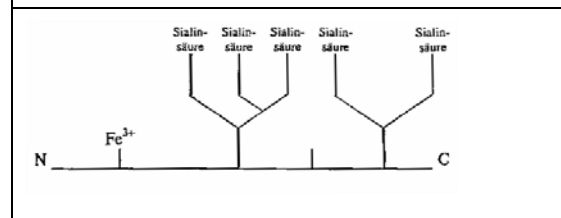
Tetrasialotransferrin,  $Fe^{3+}_{C1}$  :

64-80 %



Pentasialotransferrin,  $Fe^{3+}_{N1}$  :

12-18 %



**Abbildung 1.3.:** Vereinfachte Darstellung des Transferrins mit distinkten Glykanstrukturen und unterschiedlicher Eisenbeladung

Prozentzahlen der unterschiedlich sialylierten Transferrinformen als Anteil am Gesamttransferrin beim Gesunden. Bilder aus [6], Darstellung des Trisialotransferrin durch triantennäre Glykanstruktur ergänzt

Ein Anstieg des CDT- Wertes kann bei gesunden Probanden nach frühestens 3 Wochen starken Alkoholkonsums von etwa 80 g/d beobachtet werden [55,59]. Der Entstehungsmechanismus des CDT ist immer noch nicht vollständig aufgeklärt, man nimmt eine Störung der Glykosyltransferasen in den Hepatozyten durch Abbauprodukte des Alkohols, hier v.a. Acetaldehyd, an [57,63].

CDT zeigte in verschiedenen Studien einen chronisch erhöhten Alkoholkonsum mit einer diagnostischen Spezifität zwischen 80 und 97 % und einer diagnostischen Sensitivität von ca. 80 % an [35,55,57]. Damit ist es den zuvor genannten Parametern der Labordiagnostik des Alkoholmissbrauchs deutlich überlegen [35]. Auch mit der CDT- Bestimmung kann man allerdings zu falsch positiven Ergebnissen gelangen. Diese beschränken sich vornehmlich auf Lebererkrankungen wie z.B. die primäre biliäre Leberzirrhose, eine viral bedingte Leberzirrhose, das primäre Leberzellkarzinom und andere Karzinome [55], sowie auf seltene kongenitale Störungen in der Glykosylierung von Proteinen (CDG-Syndrom= Carbohydrate Deficient Glycoprotein- Syndrome). Analytische Verfahren wie der indirekte Immunoassay (s. Kap. 1.4, S. 20), die anstelle der isolierten Isoformen des Transferrins die CDT- Fraktion als Gruppe erfassen, werden auch durch genetische Variation in der Aminosäurekette des Transferrins gestört. Diese Verfahren sind auf den in allen Populationen häufigsten Phänotyp des Transferrins, Transferrin C (>95 %), eingestellt; der sehr seltene Phänotyp Transferrin D verursacht falsch positive, der geringfügig häufigere Phänotyp Transferrin B falsch negative CDT- Befunde. Außerdem können sehr niedrige und sehr hohe Gesamttransferrin- Konzentrationen zu falsch negativen bzw. falsch positiven Ergebnissen führen [6,31,62].

Eine Beeinflussung des CDT- Wertes durch Ethnizität, Body- Mass- Index, Alter, Geschlecht und Nikotinabusus konnte ausgeschlossen werden [10].

CDT weist besondere Stärken in der Diagnostik der Langzeittrinker sowie in der Abstinenzüberwachung ehemals alkoholabhängiger Patienten auf, da ein schneller Wiederanstieg bei geringen Alkoholmengen nach einer Abstinenzphase gezeigt werden konnte [23,55]. Auch in der Unterscheidung zwischen alkoholischen und nicht- alkoholischen Leberschäden gelangt CDT zu deutlich besseren Ergebnissen als die  $\gamma$ - GT [35,51]. Deshalb ist die CDT- Bestimmung seit etwa 10 Jahren ein etablierter Bestandteil in der Beurteilung alkoholkranker Patienten.

#### 1.4. Quantitative Bestimmung des CDT

Zur CDT- Bestimmung werden nach wie vor überwiegend Verfahren eingesetzt, die die einzelnen Isoformen des Transferrins oder die gesamte CDT- Fraktion nach der elektrischen Ladung der jeweiligen Moleküle differenzieren [9]. Ladungsunabhängige Verfahren wie etwa der direkte Immunoassay, bei dem spezifische Antikörper die Abwesenheit einer oder beider Glykanketten des Transferrins detektieren, oder die Affinitätschromatographie mit immobilisierten Lektinen sind erst kürzlich in die Analytik eingeführt worden [17,64].

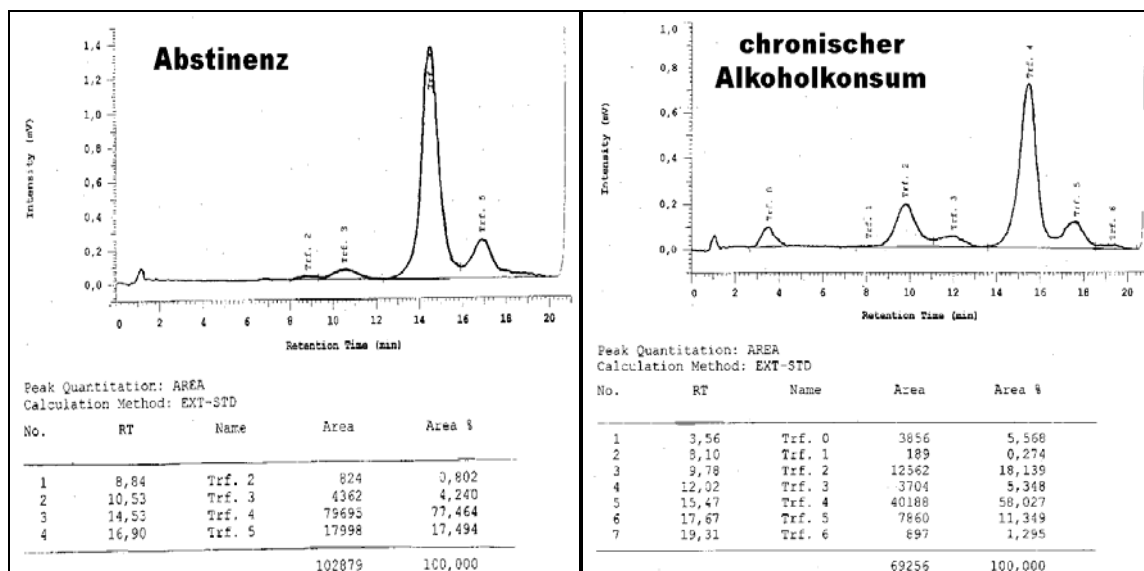
Zu den Methoden, die einzelne Isoformen oder die gesamte CDT- Fraktion ladungs- und pH- abhängig auftrennen, gehören z.B. die Anionenaustauscher-Chromatographie (manuell bzw. automatisiert als HPLC, s.u.), die isoelektrische Fokussierung (IEF) und die Kapillarelektrophorese (CE). Als IEF wird die elektrophoretische Auftrennung unterschiedlich geladener Proteine in einem Gel mit einem präformierten pH- Gradienten bezeichnet, in dem diese Proteine bis zu dem ihrem isoelektrischen Punkt entsprechenden pH wandern [25,80]. Die CE ist ein elektrophoretisches Trennverfahren, bei dem die Trennung in mit Puffer gefüllten Kapillaren erfolgt. Durch Anlegen von Hochspannung werden geladene Moleküle auf Grund unterschiedlicher Ladungszahl und Mobilität getrennt [12,42 53,75]. Sie gilt in der CDT- Diagnostik besonders bei der Differenzierung genetischer Transferrinvarianten als besonders empfindlich [42,61].

Die Detektion und Quantifizierung der chromatographisch oder elektrophoretisch aufgetrennten Isoformen des Transferrins kann immunologisch mit Hilfe von Transferrin- spezifischen Antikörpern unter Verwendung verschiedener Detektionsverfahren (RIA- Radioimmunoassay, TIA- Turbidimetrischer Immunoassay, EIA- Enzymatischer Immunoassay) durchgeführt werden, oder man verwendet physikalische Methoden wie eine Absorptions- oder Streulichtmessung [2,28,30,32,33].

In der labordiagnostischen Routineanalytik am weitesten verbreitet waren und sind die flüssigkeitschromatographischen Verfahren der CDT- Bestimmung. Den größten Anteil stellen immer noch diejenigen Verfahren, die mit Hilfe einer manuell betriebenen, miniaturisierten Anionenaustauschersäule die CDT- Fraktion isolieren

und dann in einem zweiten Schritt immunchemisch quantifizieren (indirekter Immunoassay) [36,32,54]. Dabei wird die CDT- Konzentration heute ausschließlich in Relation zur Konzentration des Gesamt- Transferrins angegeben (% CDT), früher übliche Absolutwerte (in U/l) sind inzwischen obsolet [39].

Eine spezielle Form der flüssigkeitschromatographischen CDT- Bestimmung stellt die Anionenaustausch- Hochleistungs- Flüssigkeitschromatographie (AE- HPLC) dar, die zunächst zu wissenschaftlichen Zwecken entwickelt wurde [37,58], inzwischen aber im labordiagnostischen Alltag der CDT- Analytik etabliert ist, nicht zuletzt aufgrund der Einführung kommerzieller Applikationen [30,54,70,76]. Diese Methode kombiniert die effiziente Auftrennung der eisengesättigten Transferrin- Isoformen nach ihrer Ladung an einer geeigneten Ionenaustauscher- Säule mit der praktikablen Quantifizierung der separierten Fraktionen durch Messung der Absorption der Eisen- Protein- Komplexe. Die einzelnen Isoformen des Transferrins werden den *Peaks* im Chromatogramm anhand der Retentionszeiten zugeordnet, die Quantifizierung (in %) erfolgt anhand der jeweiligen *Peakfläche*, die ins Verhältnis gesetzt wird zur Gesamtfläche aller Transferrin- Isoformen des Chromatogramms (Abb. 1.4.).



**Abbildung 1.4.:** HPLC- Isotransferrin- Muster bei Abstinenz (links) und bei chronisch erhöhtem Alkoholkonsum (rechts).

Die Isoformen Asialo- bis Hexasialo-Transferrin sind als Transferrin 0 bis 6 bezeichnet, die Tabelle unter dem Chromatogramm listet die Retentionszeiten (RT), die zugehörigen Peakflächen (Area) sowie ihren prozentualen Anteil an der Gesamtfläche auf (Area %).

HPLC- Methoden zur CDT- Bestimmung galten und gelten als besonders zuverlässig. Diese Einschätzung basiert auf ihrer Eigenschaft, nicht nur einzelne Fraktionen, sondern das ganze Spektrum der Ladungsisoformen des Transferrins aufzutrennen und über die Absorption der Transferrin- Eisen- Komplexe auch sehr spezifisch quantifizieren zu können, sodass Störungen der Analytik z.B. durch genetische Transferrin- Varianten sicher erkannt werden. Allerdings bestehen zwischen den verschiedenen Verfahren Unterschiede hinsichtlich der Proben- vorbereitung, der verwendeten mobilen und stationären Phasen, der Elutions- gradienten bis hin zur Integration der Chromatogramme.

Eine allgemein akzeptierte Referenzmethode für die CDT- Bestimmung existiert bislang nicht; im Auftrag der *International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* wurde 2005 eine Arbeitsgruppe eingerichtet, die u.a. eine solche Referenzmethode erarbeiten soll [36,74].

#### 1.5. Fragestellung der Arbeit

Die vorliegende Arbeit befasste sich generell mit der HPLC- Analytik des CDT. Dabei standen zwei Fragenkomplexe im Vordergrund:

- 1.) Gibt es signifikante Unterschiede zwischen den Ergebnissen verschiedener, in der Laborroutine etablierter HPLC- Methoden zur CDT- Bestimmung? Lassen sich solche differenten Ergebnisse, sofern sie denn nachzuweisen sind, auf methodische Unterschiede zwischen den verschiedenen Applikationen zurückführen? Gibt es Möglichkeiten zur Harmonisierung der HPLC- Analytik des CDT?

Diese Fragen sollten im ersten Teil der Arbeit durch Vergleich verschiedener HPLC- Applikationen für die CDT- Bestimmung an mehreren umfangreichen Probenkollektiven geprüft werden; als Beispiel für eine Eigenentwicklung wurde die HPLC- Methode des Zentrallabors am UK S-H Campus Lübeck (ZLCL) eingesetzt, als Beispiele für kommerzielle Verfahren HPLC- Kits der Firmen Recipe und Chromsystems [71,76]. Dabei galt es, Unterschiede und Gemeinsamkeiten der Methoden herauszuarbeiten und insbesondere die

mögliche Bedeutung einer standardisierten Auswertung der Chromatogramme zu prüfen.

- 2.) Lässt sich eine etablierte HPLC- Methode so adaptieren, dass mit ihrer Hilfe einzelne Isotransferrine präparativ gewonnen werden können? Diese Untersuchungen sollten den Grundstein legen für die laboreigene Herstellung geeigneter Standards und Qualitätskontrollproben für die HPLC- Analytik des CDT im Zentrallabor.

## 2. Materialien und Methoden

### 2.1. Geräte

#### 2.1.1. Hochleistungs- Flüssigkeitschromatographie (HPLC)

Für die CDT- Bestimmungen in humanem Serum wurden zwei HPLC- Anlagen des Zentrallabors eingesetzt, die mit Ausnahme eines Entgasers der Fa. Knauer und eines Motorventils der Fa. Besta ausschließlich aus Modulen von Merck-Hitachi aufgebaut waren:

Anlage 1	Anlage 2
- 3- Kanal- Entgaser (Knauer)	- 4- Kanal- Entgaser L- 7614
- ternäre Pumpe L- 6220	- quaternäre Pumpe L- 7100
- Autosampler AS- 2000 A	- Autosampler L- 7200
- UV/VIS- Detektor L- 4250	- UV/VIS-Detektor L- 7420
- Interface D- 6000 A	- Interface D- 7000
- 6- Wege- Motorventil (Besta)	

Gesteuert wurden beide Anlagen mit Hilfe der D- 7000 HPLC System Manager Software Version 3.0 (Merck- Hitachi), die an jeder Anlage auf einem handelsüblichen Pentium PC mit Bildschirm, Tastatur und Drucker installiert war.

Die laboreigene HPLC- Methode des Zentrallabors zur CDT- Bestimmung lief auf Anlage 1, als stationäre Phase wurde eine Mono Q 5/5 HR Anionenaustauschersäule mit 1 ml Gelbett (Amersham Biosciences, 17-0546-01) mit Vorfilter eingesetzt [18,49].

Die optimierte HPLC- Methode nach Helander et al. 2003 war auf Anlage 2 installiert, zur analytischen Trennung der Isotransferrine wurde eine SOURCE® 15Q PE 4.6/100 Anionenaustauschersäule (Bettvolumen von 1 ml, Amersham

Biosciences, Best.-Nr. 17-5065-01) verwendet [33]. Die Methode wurde für präparative Trennungen modifiziert, es wurde eine Säule C10/20 (Pharmacia LKB, Bettvolumen 14 ml) mit dem gleichen Säulenmaterial SOURCE® 15Q PE 4.6/100 (Amersham Biosciences, 17-5065-01) manuell gefüllt.

Die Firma Recipe bot zwei kommerzielle HPLC- Methoden zur CDT- Bestimmung an; in der vorliegenden Arbeit wurde die online- Methode mit integrierter Probenvorbereitung (CDT im Serum, 21100) untersucht [76]. Diese Applikation war auf der HPLC-Anlage 1 installiert. Die analytische Säule (21030), ein Halter mit Vorsäule (21031/2), ein Vorfilterhalter mit Vorfilter (FK5820/1) und ein Inline-Filterhalter mit Filter (FK7400/7410) stammten ebenfalls von Recipe.

Das HPLC- Verfahren von Chromsystems (Reagenzienkit für die HPLC- Analytik von CDT im Serum für ternäre Gradientensysteme, 54030) lief auf Anlage 2; die HPLC- Anionenaustauschersäule (54100) und ein Gehäuse mit PEEK- Vorfilter (15009/15010) gehörten zum Startzubehör der kommerziellen Methode [71].

### 2.1.2. Konzentrierung isolierter Transferrinfraktionen

Präparativ gewonnene Transferrinfraktionen wurden durch Membranfiltration über Amicon Centriplus, Modell YM-10 der Firma Millipore konzentriert. Zur Beschleunigung der Filtration wurden die Membraneinsätze in einer Rotixa/ K- Zentrifuge (Fa. Hettich) bei 3000 g zentrifugiert.

### 2.1.3. Isoelektrische Fokussierung (IEF)

Die isoelektrische Fokussierung erfolgte mit dem Phast- System (Pharmacia LKB). Dieses System besteht aus einer Elektrophorese- und Kontrolleinheit, mit der die Methodenprogrammierung vorgenommen wird und die Gele platziert werden und einer Entwicklungseinheit, die der Färbung der Gele dient. Verwendet wurden IEF- Gele 4,5-6 (pH 4,5-6) der Firma Pharmacia für jeweils 8 Proben.

## 2.2. Untersuchungsmaterial (Seren)

Für die Untersuchungen wurden Serumreste mit bekannter CDT- Konzentration eingesetzt, die nach Abschluss aller labordiagnostischen Analysen zur Entsorgung freigegeben und bis zu ihrer weiteren Verwendung bei -70 °C gelagert worden waren. Nach dem Auftauen wurden diese Seren zentrifugiert und entweder als individuelle Proben analysiert oder zu Poolproben vereinigt. Außerdem wurden zur Entsorgung freigegebene Seren aus der Routineanalytik verwendet, die durch pathologische Konzentrationen anderer Parameter (Ethanol,  $\gamma$ -GT) den Verdacht auf einen möglichen chronischen Alkoholkonsum geweckt hatten. Diese Seren wurden mittels HPLC getestet und bei einem hohen CDT- Anteil zur Anreicherung einzelner Transferrinfraktionen verwendet.

## 2.3. Chemikalien, Reagenzien, Lösungen

### 2.3.1. Chemikalien

Bis-Tris		Aldrich, Bestell-Nr. 156663
Calciumchlorid-Dihydrat	zur Analyse	Merck, Bestell-Nr. 2382
Dextransulfat	zur Analyse	Sigma, Bestell-Nr. D8906
Essigsäure	zur Analyse	Merck, Bestell-Nr. 0063
Eisen-III-chlorid	zur Synthese	Merck, Bestell-Nr. 803945
Eisen-III-citrat-Monohydrat mit 18% Eisen purum		Fluka Chemika, Bestell-Nr. 44941
Ethanol	zur Analyse	Merck, Bestell-Nr. 0983
Formaldehyd mind. 37 %		Merck, Bestell-Nr. 4003
Glutaraldehyd 25 %	in Wasser	Serva, Bestell-Nr. 23115
Glycerol	reinst.	Merck, Bestell-Nr. 4093
2-Methylisothiazolone		Sigma, Bestell-Nr. 1585703
Natriumcarbonat	zur Analyse	Merck, Bestell-Nr. 6393
Natriumchlorid	zur Analyse	Merck, Bestell-Nr. 6404
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat	zur Analyse	Merck, Bestell-Nr. 6448
Natriumhydrogencarbonat	zur Analyse	Merck, Bestell-Nr. 6329

Natronlauge Plätzchen	zur Analyse	Merck, Bestell-Nr. 6498
Nitrilotriessigsäure	zur Analyse	Fluka Chemika, Bestell-Nr. 72559
Salzsäure	zur Analyse	Merck, Bestell-Nr. 0317
Silbernitrat	zur Analyse	Merck, Bestell-Nr. 101512
Trichloressigsäure	zur Analyse	Merck, Bestell-Nr. 100807

### 2.3.2. Reagenzien und Lösungen

#### 2.3.2.1. HPLC - Probenvorbereitung und Eluenten

##### HPLC- Methode des Zentrallabors Campus Lübeck (ZLCL) [18,49]

Lösungen für die Probenvorbereitung:

*Eisen-III-citrat-Lösung:* Für 100 ml Lösung wurden 1,31 g (50 mmol/l) Eisen-III-citrat-monohydrat in Aqua bidest. unter Erwärmung gelöst.

*Dextransulfat-Lösung:* 0,5 g (10 mmol/l) Dextransulfat Natriumsalz wurden mit Aqua bidest. auf 10 ml Lösung aufgefüllt.

*Natriumhydrogencarbonat:* Für 100 ml Lösung wurden 4,2 g (500 mmol/l) Natriumhydrogencarbonat in Aqua bidest. gelöst.

*Calciumchloridlösung:* Für 100 ml Lösung wurden 14,7 g Calciumchloridlösung in Aqua bidest. gelöst.

Lösungen für die Elution:

*Puffer A:* Für 1 l wurden 4,185 g Bis-Tris und 0,1 g Methylisothiazolone (MIT) in Aqua bidest. gelöst und der pH der Lösung mit 20 %iger Essigsäure auf 6,52 eingestellt.

*Puffer B:* Für 1 l wurden 4,185 g Bis-Tris, 0,1 g MIT und 20,45 g Natriumchlorid in Aqua bidest. gelöst und der pH der Lösung mit 20 %iger Essigsäure auf 6,52 eingestellt.

*Puffer C:* 58,44 g Natriumchlorid wurden mit Aqua bidest auf 1 l gelöst.

Alle Lösungen wurden bis zum Gebrauch bei 4 °C gelagert.

HPLC- Methode nach Helander et al. [33]

Lösungen für die Probenvorbereitung:

Für die Eisensättigung der Proben wurde 10 mmol/l *Eisen-Nitrilotriessigsäure* (FeNTA) hergestellt, indem 275 mg Nitrilotriessigsäure (NTA) und 270 mg Eisen-III-chlorid x 6 H<sub>2</sub>O in 90ml Aqua bidest. gelöst, mit Natronlauge auf einen pH von 7,0 eingestellt und dann auf 100 ml mit Aqua bidest. aufgefüllt wurden.

Zur Lipidfällung wurden 20 g/l *Dextransulfat* in Aqua bidest. mit einem gleichen Volumen einer wässrigen Lösung von 1,0 mol/l *Calciumchlorid* (14,7 g Calciumchlorid in 100ml Aqua bidest.) gemischt. Beide Lösungen wurden bei 4 °C gelagert.

Lösungen für die Elution:

Für diese Methode wurden 4 Puffer angesetzt:

*Puffer A:* 2,093 g (10 mmol/l) Bis-Tris wurden mit Aqua bidest. auf 1 Liter aufgefüllt, der pH der Lösung wurde mit HCl (2 mol/l) auf pH 7,0 eingestellt.

*Puffer B:* 1 Liter 10 mmol/l Bis-Tris (s.o.) wurde mit 29,22 g (0,5 mmol/l) NaCl versetzt und auf einen pH von 6,2 mit HCl (2 mol/l) eingestellt.

*Puffer C:* 10 mmol/l Bis-Tris (s.o.) mit HCl (2 mol/l) auf pH 6,2 eingestellt.

*Puffer D:* Es wurden 116,88 g (2,0 mol/l) NaCl in 1 l Aqua bidest. gelöst.

HPLC- Methode Recipe (CDT im Serum online) [76]

Die Lösungen für die Probenvorbereitung und die Puffer (Mobile Phase A, B und C) der Recipe- Methode wurden mit dem Set (*Kit*) gebrauchsfertig geliefert. Die exakte Zusammensetzung dieser Lösungen wird dem Anwender nicht bekannt gegeben.

HPLC- Methode Chromsystems (CDT im Serum, für ternäre Gradientensysteme) [71]

Die Lösungen für die Probenvorbereitung und die Puffer der HPLC- Methode von Chromsystems (Mobile Phase A bis C) wurden mit dem Reagenzkit für ternäre

Gradientensysteme gebrauchsfertig geliefert. Die Zusammensetzung dieser Lösungen ist dem Anwender nicht bekannt.

### 2.3.2.2. Isoelektrische Fokussierung

Lösungen für die Probenvorbereitung:

Zur Eisensättigung wurde den Proben Natriumhydrogencarbonat und Eisen-III-citrat- Lösung hinzugegeben. Dazu wurden die für die Probenvorbereitung der HPLC- Methode des ZLCL hergestellten Lösungen verwendet.

Chemikalien und Reagenzien für die Silberfärbung:

*Fixierung:* 20 % Trichloressigsäure: für 100 ml Lösung 20 ml Trichloressigsäure in Aqua bidest.

*Sensitizer:* 8,3 % Glutardialdehyd aus 25 %igem Glutardialdehyd hergestellt durch Mischung mit Aqua bidest. im Verhältnis 1:2

*Waschschritt.*

Lösung a) 10 % Ethanol, 5 % Essigsäure: für 100 ml 10 ml Ethanol und 5ml Essigsäure in Aqua bidest.

Lösung b) 50 % Ethanol, 10 % Essigsäure: für 100 ml 50 ml Ethanol und 10 ml Essigsäure in Aqua bidest.

*Färbung:* Silbernitrat 0,5 %: für 100 ml Lösung 0,5 g Silbernitrat in Aqua bidest.

*Entwickler* (1 l): 400 µl Formaldehyd einer 37 %igen wässrigen Formaldehyd-Lösung + 800 ml H<sub>2</sub>O + 200 ml Natriumcarbonat (12,5 %)

*Stopppad:* 5 % Essigsäure in Aqua bidest.: für 100 ml 5 ml Essigsäure in Aqua bidest.

## 2.4. Methoden

### 2.4.1. High- Performance- Liquid- Chromatographie- (HPLC) – Methoden

Grundsätzlich muss bei allen Probenvorbereitungen der verschiedenen Methoden eine Eisensättigung des Transferrins stattfinden, um die maximale Absorption des Eisen-Protein- Komplexes und damit die Zuverlässigkeit des Nachweisverfahrens

zu garantieren. Eine Lipoprotein-fällung soll außerdem Interferenzen bei der Chromatographie durch Bestandteile der Probenmatrix eliminieren.

2.4.1.1. HPLC- Methode des Zentrallabors Campus Lübeck [18,49]

**Tabelle 2.1.:** Serumaufarbeitung der HPLC- Methode nach ZLCL in 3 Schritten:

1. Eisensättigung
2. Lipidfällung
3. Bereitung des Injektionsvolumens

<p><b>1.</b> 200 µl Serum</p> <p>30 min Inkubation bei 8 °C</p>	<p>+6 µl Natriumhydrogencarbonat (NaHCO<sub>3</sub>)</p> <p>+4 µl Fe-III-Citrat-Lösung</p>
<p><b>2.</b></p> <p>30 min Inkubation bei 8 °C</p> <p>10 min Zentrifugation bei 10000 g</p>	<p>+4 µl Dextransulfat</p> <p>+10 µl Calciumchlorid (CaCl<sub>2</sub>)</p>
<p><b>3.</b> 150 µl Überstand</p>	<p>+600 µl Aqua bidest.</p>
<p><b>200 µl HPLC- Injektionsvolumen</b></p>	

Die aufgearbeiteten Proben wurden zu je 200 µl mittels des Autosamplers in das HPLC- System injiziert und mit zeitlich definiertem Puffergradienten über die Säule transportiert. Ein Vorfilter sorgte für mehr Reinheit auf der Säule. Die Pumpe beförderte Puffer A, B und C mit einer Flussgeschwindigkeit ( Flow) von 1 ml/min und einem Drucklimit von 0-50 bar durch die Anlage.

Als stationäre Phase wurde der Anionenaustauscher MonoQ 5/5 verwendet. Die Messung der unterschiedlich lang auf der Säule retentierten Substanzen erfolgte mittels eines UV/VIS- Detektors, der die Absorption des Eluats bei 460 nm registrierte. Die Durchlaufdauer wurde mit 18 Minuten festgelegt, danach erfolgte ein Spülschritt mit Kochsalz, der den Anionenaustauscher von restlichen

gebundenen Substanzen befreien sollte und eine Reäquilibrierung der Säule mit Puffer A, der das System auf den Ausgangspunkt zurückführte.

Der relative CDT- Anteil der einzelnen Probe wurde anhand des Chromatogramms am Computer mit der Flächenprozentmethode ermittelt. Hierzu wurden die Peakflächen der zu CDT zusammengefassten Transferrinvarianten addiert und als Prozentsatz der Gesamtfläche aller Peaks des Chromatogramms ausgedrückt.

**Tabelle 2.2.:** Pump Table der HPLC- Methode ZLCL und Darstellung des zeitlichen Mischungsverhältnisses der drei Puffer in einem Schema.

Zeit (min)	Puffer A (%)	Puffer B (%)	Puffer C (%)	Fluss (ml/min)
0,0	90,0	10,0	0,0	1,0
3,0	90,0	10,0	0,0	1,0
3,1	85,0	15,0	0,0	1,0
7,0	85,0	15,0	0,0	1,0
18,0	70,0	30,0	0,0	1,0
18,1	0,0	0,0	100,0	1,0
22,0	0,0	0,0	100,0	1,0
22,1	90,0	10,0	0,0	1,0
32,0	90,0	10,0	0,0	1,0

Im Zentrallabor (ZLCL) wird dabei für die Auswertung des Chromatogramms am Computer das baseline- Verfahren angewandt, d.h. es wird eine gemeinsame Basislinie unter alle Peaks gezogen, um dann über die Flächenprozentmethode den Wert für CDT errechnen zu lassen.

#### 2.4.1.2. HPLC- Methode der Firma Recipe [76]

Es wurde der ClinRep Kit „CDT in Serum- Online Analysis“ der Firma Recipe verwendet.

Der Autosampler injizierte 400 µl aufbereitete Probe. Die Dauer eines Laufs wurde mit 13 Minuten programmiert, nach 11,6 min startete der Spülschritt. Die Methode setzte zwei Pumpensysteme ein, eine Gradientenpumpe für Puffer A und B und eine isokratische Pumpe für Puffer C.

**Tabelle 2.3.:** Serumaufarbeitung der HPLC- Methode Recipe in einem Schritt:

## 1. Serum- Mischung mit Verdünnungslösung D

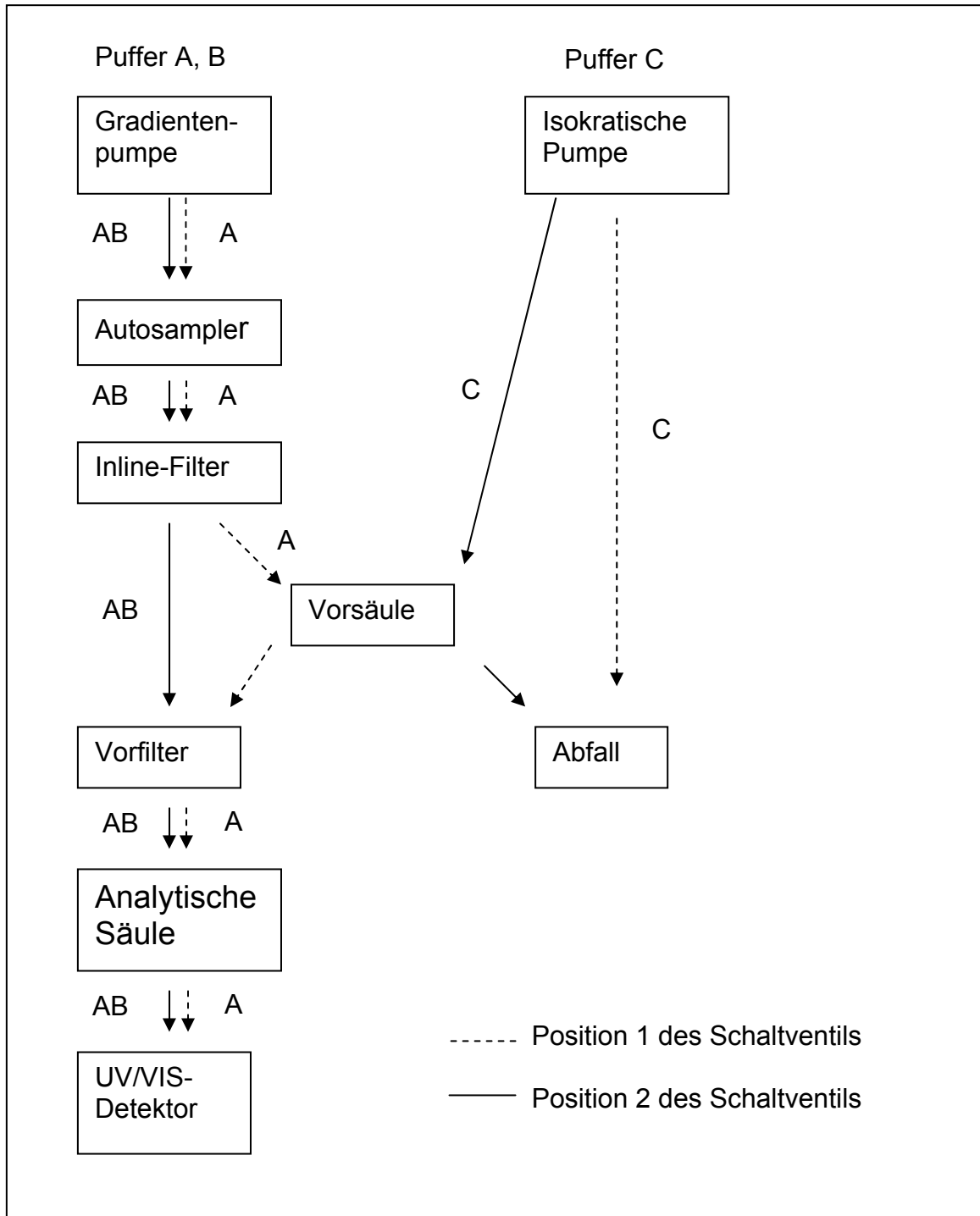
1. 100 µl Serum	in Probengefäß mit Verdünnungslösung D
30-60 min Inkubation bei 4 °C in Dunkelheit	
5 min Zentrifugation bei 10000 x g	
<b>400 µl HPLC- Injektionsvolumen</b>	

**Tabelle 2.4.:** Pump Table der HPLC- Methode Recipe und Darstellung des zeitlichen Mischungsverhältnisses der zwei Puffer in einem Schema.

Der dritte Puffer C (%) mit einer Flussgeschwindigkeit von 0,4 ml/min verläuft nicht über die Säule und ist deshalb nicht dargestellt. 1 Pulse bezeichnet den Umschaltbefehl des Systems für das eingebaute Schaltventil.

Zeit (min)	Puffer A (%)	Puffer B (%)	Fluss (ml/min)	Event
0,0	100,0	0,0	1,4	
2,0	100,0	0,0	1,4	
3,0	96,0	4,0	1,4	1 Pulse
11,0	68,0	32,0	1,4	
11,5	68,0	32,0	1,4	
11,6	100,0	0,0	1,4	1 Pulse
13,0	100,0	0,0	1,4	

Ein automatisches Schaltventil wurde in den Analyseverlauf eingebaut, welches zwischen zwei Positionen zeitlich definiert wechselte. In Position 1 wurde die integrierte Probenvorbereitung an einer Vorsäule vorgenommen, als Puffer lief zu diesem Zeitpunkt nur Puffer A durch das System. Puffer C lief von der isokratischen Pumpe direkt in den Abfall. In Position 2 wurde die Vorsäule durch Puffer C gespült, während Puffer A und Puffer B ohne über die Vorsäule zu laufen direkt auf die analytische Säule gelangten (siehe Abb. 2.1., folgend).



**Abbildung 2.1.:** Analyseverlauf der HPLC- Methode Recipe in der Darstellung mit beiden Positionen des Schaltventils.

Die Recipe- Methode verwendete zur Trennsäule, deren Material uns unbekannt ist, eine Vorsäule und platzierte beide Säulen in ein 40 °C warmes Thermostat. Zudem wurden ein Filter und ein Vorfilter verwendet, um eine größere Reinheit der Lösungen zu erreichen, die auf die Säule gelangen.

Die Absorption wurde mittels des UV/VIS- Detektors bei 460 nm gemessen. Die Auswertung des Chromatogramms und damit die Festlegung des gesuchten CDT- Wertes erfolgte bei Recipe am Computer über die Flächenprozentmethode, jedoch wurde hier nach Vorschrift das baseline- Verfahren um das valley-to-valley-Verfahren so erweitert, dass lediglich Asialo- und Disialotransferrin baseline integriert, die verbleibenden Peaks aber valley-to-valley berechnet wurden.

2.4.1.3. HPLC- Methode Chromsystems [71]

**Tabelle 2.5.:** Serumaufarbeitung der HPLC- Methode nach Chromsystems in zwei Schritten:

1. Serum- Mischung mit verschiedenen Fertig- Puffern
2. Bereitung des Injektionsvolumens

<p><b>1.</b> 200 µl Serum</p> <p>30 min Inkubation bei 4 °C</p> <p>10 min Zentrifugation bei 9000 x g</p>	<p>+25 µl Neutralisationspuffer</p> <p>+25 µl Stabilisationspuffer</p> <p>+25 µl Präzipitationspuffer 1</p> <p>+25 µl Präzipitationspuffer 2</p>
<p><b>2.</b> 200 µl Überstand</p>	<p>+400 µl Aqua bidest.</p>
<p><b>200 µl HPLC- Injektionsvolumen</b></p>	

Es wurden 200 µl der aufbereiteten Probe auf die Säule gegeben. Ein Lauf benötigte 20 min inklusive einer Spülung und Reäquilibration der Säule von 8,5 min. Die Säule wurde als Schutz vor Temperaturschwankungen in einem auf 25 °C eingestellten Thermostat inkubiert und ein PEEK Vorfilter fand Verwendung. Die mobilen Phasen A, B und C liefen mit einem Fluss von 1,5-2,0 ml/min über die Säule. Die Absorption wurde bei 460 nm gemessen. Die Auswertung des Chromatogramms erfolgte wieder nach der Flächenprozentmethode, wobei eine

baseline-Integration von Asialo-, Monosialo- und Disialotransferrin gefordert wurde, die restlichen Peaks wurden valley-to-valley integriert.

**Tabelle 2.6.:** Pump Table der HPLC- Methode Chromsystems und Darstellung des zeitlichen Mischungsverhältnisses der drei Puffer in einem Schema.

Zeit (min)	Puffer A (%)	Puffer B (%)	Puffer C (%)	Fluss (ml/min)
0,0	100,0	0,0	0,0	1,5
0,5	100,0	0,0	0,0	1,5
8,5	60,0	40,0	0,0	1,5
11,5	60,0	40,0	0,0	1,5
11,6	0,0	0,0	100,0	2,0
14,9	0,0	0,0	100,0	2,0
15,0	100,0	0,0	0,0	1,5
20,0	100,0	0,0	0,0	1,5

#### 2.4.1.4. HPLC- Methode Helander et al. [33]

Es wurden 200 µl der aufbereiteten Probe auf die Säule gegeben. Ein Lauf benötigte 40 min inklusive einer Spülungszeit und Reäquilibration der Säule. Die mobilen Phasen A, B, C und D liefen mit einem Fluss von 1,0-2,0 ml/min über die Säule. Eine Quantifizierung der Transferrin- Isoformen wurde durch Absorptionmessung bei 470 nm vorgenommen. Die Peaks des resultierenden Chromatogramms wurden mittels der Flächenprozentmethode am Computer nach baseline- Integration (s.o.) ausgewertet.

**Tabelle 2.7.:** Serumaufarbeitung der HPLC- Methode nach Helander in zwei Schritten:  
 1. Eisensättigung und Lipidfällung  
 2. Bereitung des Injektionsvolumens

1. 100 µl Serum	+ 20 µl Eisen-Nitrilotriessigsäure (FeNTA) + 20 µl Dextransulfat-Calciumchlorid-Lsg.
30-60 min Inkubation bei 4 °C 5 min Zentrifugation bei 3500 g	
2. 100 µl Überstand	+ 400 µl Aqua bidest. in Glasgefäß
<b>200 µl HPLC- Injektionsvolumen</b>	

**Tabelle 2.8.:** Pump Table der HPLC- Methode Helander et al. und Darstellung des zeitlichen Mischungsverhältnisses der vier Puffer in einem Schema.

Zeit (min)	Puffer A (%)	Puffer B (%)	Puffer C (%)	Puffer D (%)	Fluss (ml/min)
0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	1,0
1,0	100,0	0,0	0,0	0,0	1,0
1,1	0,0	0,0	100,0	0,0	1,0
30,0	0,0	20,0	80,0	0,0	1,0
30,1	0,0	0,0	0,0	100,0	1,0
35,0	0,0	0,0	0,0	100,0	1,0
35,5	100,0	0,0	0,0	0,0	2,0
40,0	100,0	0,0	0,0	0,0	2,0

2.4.2. Präparative HPLC

Zur präparativen Isolierung der verschiedenen Ladungsisoformen des Transferrins wurde prinzipiell die Methode nach Helander et al. 2003 [33] eingesetzt. Hierzu wurde eine größere FPLC- Säule (Länge 20 cm, Innendurchmesser 10 mm (Pharmacia LKB)) mit 14 ml SOURCE 15Q PE 4.6/100 befüllt. Die Probenvorbereitung und der Elutionsgradient wurden aus der Helander- Methode übernommen, es wurde lediglich ein größeres Ausgangsvolumen des Serums von 500 µl gewählt, daraufhin die Mengen in der Probenvorbereitung unter Beibehaltung des Mischungsverhältnisses angepasst. Die Elutionsdauer wurde auf 150 min verlängert.

**Tabelle 2.9.:** Serumaufarbeitung der HPLC- Methode nach Helander et al. mit vergrößertem Ausgangsvolumen des Serums in zwei Schritten:

1. Eisensättigung und Lipidfällung
2. Bereitung des Injektionsvolumens

<b>1.</b> 500 µl Serum	+ 50 µl FeNTA + 50 µl Dextransulfat-CaCl <sub>2</sub> -Lsg.
30-60 min Inkubation bei 4 °C 5 min Zentrifugation bei 3500 g	
<b>2.</b> 400 µl Überstand	+ 600 µl Aqua bidest. in Glasgefäß
<b>2x 400 µl HPLC- Injektionsvolumen</b>	

Nach Detektion bei 470 nm wurden die Fraktionen manuell aufgefangen und in der IEF (2.4.3., S. 38) auf ihre Zusammensetzung überprüft. Die Peaks des resultierenden Chromatogramms wurden mittels der Flächenprozentmethode am Computer nach baseline- Integration (s.o.) ausgewertet.

**Tabelle 2.10.:** Pump Table der modifizierten HPLC- Methode nach Helander et al. zeitlich verlängert zur Trennung größerer Probenvolumina. Darstellung des zeitlichen Mischungsverhältnisses der vier Puffer in einem Schema.

Zeit (min)	Puffer A (%)	Puffer B (%)	Puffer C (%)	Puffer D (%)	Fluss (ml/min)
0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	1,0
5,0	100,0	0,0	0,0	0,0	1,0
5,1	0,0	0,0	100,0	0,0	1,0
100,0	0,0	20,0	80,0	0,0	1,0
100,1	0,0	0,0	0,0	100,0	1,0
125,0	0,0	0,0	0,0	100,0	1,0
125,1	100,0	0,0	0,0	0,0	2,0
150,0	100,0	0,0	0,0	0,0	2,0

### 2.4.3. Isoelektrische Fokussierung

Die Proben wurden zunächst einer Eisensättigung mit Fe-III-citrat- Lösung unterzogen, gleichzeitig konnte die Trennungseinheit am Gerät vortemperiert werden.

**Tabelle 2.11.:** Serumaufarbeitung für die Isoelektrischen Fokussierung in einem Schritt: 1. Eisensättigung

<p><b>1.</b> 10 µl Probe</p> <p style="text-align: right;">+ 3 µl NaHCO<sub>3</sub></p> <p style="text-align: right;">+ 2 µl Fe-III-citrat</p> <p>30 min Inkubation bei 4 °C</p> <p>5 min Zentrifugation bei 10000 x g</p>
<b>1 µl zur Probenaufgabe</b>

Das Polyacrylamidgel wurde auf dem Separationsbett mit Fertigpuffern an der Anode und Kathode belegt, danach erfolgte das Beladen des Sample Applicators

mit 8 Proben je 0,5 µl, welcher in der Startposition nahe der Kathode auf das Gel aufgetragen wurden. Am Gerät wurde eine vorprogrammierte Methode gestartet, die die gewünschte IEF automatisch durchführte.

**Tabelle 2.12.:** Methode der Isoelektrischen Fokussierung im Programm als Separation Method 2 (IEF 4-6,5A) bezeichnet. Die Methode verläuft in drei Separationsschritten (Sep 2.1. bis 2.3.).

Probenauftrag	down at 2.2				0Vh
	up at 2.3				0Vh
Sep 2.1.	2000V	2,5mA	3,5W	15°C	200Vh
Sep 2.2.	200V	2,5mA	3,5W	15°C	015Vh
Sep 2.3.	2000V	5,0mA	3,5W	15°C	200Vh

Anschließend wurde das Gel mit Coomassie- Blau oder Silberionen gefärbt. In der Regel fand die Silberfärbung Verwendung aufgrund der besseren Empfindlichkeit für Proteine von 0,3- 0,5 ng pro Bande. Die Zubereitung der benötigten Chemikalien erfolgte wenige Stunden vor Beginn des Versuches. Das Gel wurde nach einer ausgewählten und programmierten Methode gefärbt (s.Tab. 2.13., S. 40). Die einzelnen Schritte der Silberfärbung entsprachen einer Fixierung, einer Sensitivierung der Proteine in einer Glutaraldehyd- Lösung, Herauswaschen des Glutaraldehyds, Reaktion mit Silberionen in einer Silbernitratlösung, Entwicklung in einer Formaldehyd- Lösung, Stoppreaktion in Essigsäure und eine Einwirkung in einer Glycerol und Essigsäure-Lösung, die das Gel haltbar und flexibel machte.

Die fertigen Gele wurden mit einem Fön getrocknet und in einer Plastikfolie geschützt aufbewahrt.

**Tabelle 2.13.:** Silberfärbung des Gels mit der Methode „Sensitive Silver Staining“ von Phast System in 15 Schritten

Schritt	Lösung	Zeit (min)	Temperatur (°C)
1 Fixierung	20 % Trichloressigsäure	5	20°C
2 Waschen	50 % Ethanol, 10 % Essigsäure	2	50°C
3	10 % Ethanol 5 % Essigsäure	2	50°C
4	10 % Ethanol 5 % Essigsäure	4	50°C
5 Sensitizer	8,3 % Glutardialdehyd	6	50°C
6 Waschen	10 % Ethanol 5 % Essigsäure	3	50°C
7	10 % Ethanol 5 % Essigsäure	5	50°C
8	Millipore-Wasser	2	50°C
9	Millipore-Wasser	2	50°C
10 Färbung	0,5 % Silbernitrat	10	40°C
11 Waschen	Millipore	0,5	30°C
12	Millipore	0,5	30°C
13 Entwicklung	Entwickler	0,5	30°C
14	Entwickler	4	30°C
15 Stoppbad	5 % Essigsäure	5	50°C

## 2.5. Versuchsdurchführung

### 2.5.1. CDT- Bestimmung mittels HPLC: Vergleich zweier in der Routinediagnostik des CDT etablierter Methoden (kommerzielle Methode Fa. Recipe, laboreigene Methode ZLCL)

Ein Vergleich der im Zentrallabor Campus Lübeck (ZLCL) etablierten Methode (Kap. 2.4.1.1., S. 30) [18] mit einer kommerziell verfügbaren Methode der Firma Recipe (Kap. 2.4.1.2., S. 31) [76] an 141 ausgewählten Seren, deren Untersuchung in der Routineanalytik abgeschlossen war. Dabei wurde darauf

geachtet, dass sich unter diesen Seren solche mit unauffälligen, grenzwertigen und pathologischen CDT- Werten befanden. Zur Charakterisierung der Reproduzierbarkeit in der Serie wurden eine unauffällige und eine pathologische Probe mehrfach bestimmt. Die Präzision von Lauf zu Lauf wurde mit aliquotierten Proben ermittelt, die in mehreren Versuchsreihen mitgeführt wurden. Die Auswertung der Chromatogramme am Computer erfolgte nach der Flächenprozentmethode und den jeweils für die Methoden vorgegebenen Integrationsarten. Die Ergebnisse der Recipe- Methode wurden zusätzlich noch mit der baseline- Integration ermittelt.

### 2.5.2. HPLC- Methodenvergleich unter Einschluss einer weiteren kommerziellen Methode (Fa. Chromsystems)

Es wurde eine weitere Testung der beiden oben beschriebenen Verfahren (Recipe und ZLCL) mit einem zwischenzeitlich auf den Markt gekommenen HPLC- Kit von Chromsystems [71] an 51 Patientenseren durchgeführt.

Die gemessenen CDT %- Ergebnisse aller Verfahren wurden mit den zwei bekannten Auswertungsarten baseline und baseline/valley-to-valley ermittelt, sowie durch eine weitere Auswertungsart ergänzt, bei der alle Peaks im Chromatogramm valley-to-valley integriert wurden.

### 2.5.3. Methodenvergleich mit seriell gemischten Proben

Es wurden mit den HPLC- Methoden Recipe und ZLCL Proben gemessen, die durch serielles Mischen von 2 Seren mit bekanntem CDT- Gehalt hergestellt worden waren.

Mischung 1: Serum 1: normale Probe + Serum 2: Probe mit leicht erhöhtem CDT (%)

Mischung 2: Serum 1: normale Probe + Serum 2: hochpathologische Probe

Mischung 3: Serum 1: normale Probe + Serum 2: pathologische Probe

Bei diesen drei Serumpaaren mit unterschiedlichen Mischungsverhältnissen ergaben sich Messwerte der CDT- Konzentration, welche mit den berechneten

Werten aus den Ausgangskonzentrationen der nicht gemischten Seren verglichen wurden.

**Tabelle 2.14.:** Mischungsverhältnis von 2 Seren für einen Methodenvergleich

1. Serum	2. Serum
100 %	0 %
90 %	10 %
70 %	30 %
50 %	50 %
30 %	70 %
10 %	90 %
0 %	100 %

#### 2.5.4. Modifizierung einer etablierten HPLC- Methode zur präparativen Isolierung der Ladungsisoformen des Transferrins

1. Bestimmung der Retentionszeiten der Ladungsisoformen im Chromatogramm und Bestimmung der Zeit, die das Eluat vom UV/VIS- Detektor (Peakanstieg) bis zum Auftreten im Fraktionensammler benötigte

Ein pathologisches Serum aus der Routineanalytik wurde mit unserer etablierten Hausmethode (2.4.1.1., S. 30) bestimmt und die Retentionszeiten der einzelnen Fraktionen am Chromatogramm abgelesen. Während der laufenden Analytik wurde alle 20 Sekunden bei einem Flow von 1,0 ml/min ein Plastikröhrchen mit der aus dem Auslaufschlauch austretenden Flüssigkeit befüllt.

2. Bestimmung der Fraktionen mittels Isoelektrischer Fokussierung

Die Röhrchen mit dem aufgefangenen Eluat wurden zeitlich markiert und mittels Elektrophorese auf ihren Transferrin- Isoformen- Gehalt untersucht. Die Durchführung fand analog Kap. 2.4.3. mit einer Silberfärbung (Tab. 2.13., S. 40) statt. Die benötigte Zeit vom Detektor bis zum Auftreten im Fraktionensammler konnte anhand des Vergleichs von Retentionszeit im Chromatogramm und Auftreten der Isoform in der IEF bestimmt werden.

3. Isolierung und Sammlung der Ladungsisoformen an einer größeren Säule und in größeren Mengen mit der HPLC- Methode nach Helander et al. [33]

Durchführung der präparativen Auftrennung des menschlichen Serumtransferrins in seine einzelnen Ladungsisoformen mit Hilfe der modifizierten HPLC- Methode Helander et al. (Kap. 2.4.2., S. 37). Es wurden mehrere Versuchsläufe eines Serums mit hohem CDT- Anteil durchgeführt und dabei die einzelnen Isoformen anhand ihrer Retentionszeiten in Fraktionen aufgefangen.

4. Bestimmung der Reinheit der Fraktionen mittels Isoelektrischer Fokussierung (Kap. 2.4.3., S. 38)

5. Konzentrierung der Fraktionen

Eine Konzentrierung der Proben fand durch Membranfiltration bei mehrmaliger Zentrifugation (Kap. 2.1.2., S. 25) statt.

Ein abschließender Nachweis der getrennten und konzentrierten Isoformen wurde erneut mit der Isoelektrischen Fokussierung (Kap. 2.4.3., S. 38) gegeben.

## 2.6. Statistik

Der Methodenvergleich wurde am Computer mit dem EVAPAK Programm für Windows, Version 3.0.2 (Boehringer Mannheim) statistisch ausgewertet. Eine Regressionsanalyse wurde mit dem Passing/ Bablok- Programm durchgeführt [46,47]. Die deskriptive Statistik, d.h. die Ermittlung von Mittelwert, Standardabweichung, Varianz und Variationskoeffizient wurden mit der MedCalc® Statistik-Software (MedCalc Software Belgium) berechnet. Der gepaarte t-Test zur Signifikanzprüfung der Ergebnisse des Methodenvergleichs und ein Vergleich der Mittelwerte in Bland-Altman Plots wurden mit der MedCalc® Statistik-Software (MedCalc Software Belgium) erhoben. In den Signifikanzprüfungen beschreibt das Signifikanzkriterium  $p < 0,05$  eine signifikante Unterschiedlichkeit der Mittelwerte der verglichenen Ergebnisse. Eine Signifikanzüberprüfung bei kleinem Zahlenkollektiv im Rahmen der Impräzisionsmessung in der Serie wurde mit dem Wilcoxon- Test für gepaarte Proben (MedCalc® Statistik-Software) erhoben (Signifikanzkriterium  $p < 0,05$ ).

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. CDT- Bestimmung mittels HPLC: Vergleich zweier etablierter Methoden (kommerzielle Methode Fa. Recipe, laboreigene Methode ZLCL)

##### 3.1.1. Bestimmung der Impräzision in der Serie

Die wiederholte Bestimmung von CDT in einer unauffälligen Poolprobe (N= 23) mit der HPLC- Methode des ZLCL ergab einen Variationskoeffizienten (VK) in der Serie von 15,8 % bei einem mittleren CDT- Anteil von 1,14 %. Die Recipe-Methode zeigte einen VK von 12,7 % bei einer Durchschnittskonzentration von 0,93 % CDT. Eine pathologische Probe (N= 12) wurde mit einem VK von 2,5 % mit der ZLCL- Methode und von 2,3 % mit der Recipe- Methode gemessen bei einem Mittelwert der CDT- Konzentration von 8,29 % in der Hausmethode und 9,47 % bei Recipe. Alle Auswertungen wurden mit dem für die jeweilige Methode vorgeschriebenen Integrationsverfahren durchgeführt (ZLCL: baseline; Recipe: baseline/valley-to-valley).

**Tabelle 3.1.:** Impräzision in der Serie:

A unauffällige Poolprobe

B pathologische Serumprobe

N = Anzahl der Messungen, MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung, VK= Variationskoeffizient

	A		B	
	ZLCL	Recipe	ZLCL	Recipe
N	23	23	12	12
MW CDT (%)	1,14	0,93	8,29	9,47
SD CDT (%)	+/-0,18	+/-0,12	+/-0,21	+/-0,22
VK (%)	15,8	12,7	2,5	2,3

**Tabelle 3.2.:** Impräzision in der Serie, Vergleich der Mittelwerte (Wilcoxon- Test)

Wilcoxon Test (gepaarter Test)	Unauffällige Probe	Pathologische Probe
Wahrscheinlichkeit P	0,0011	0,0005

Die statistische Auswertung der Daten (Tabelle 3.2., s.o.) zeigt, dass in beiden Proben die Ergebnisse der beiden HPLC- Methoden signifikant unterschiedlich sind.

### 3.1.2. Bestimmung der Impräzision von Lauf zu Lauf

Die wiederholte Bestimmung von CDT in einer identischen Probe an verschiedenen Tagen und in verschiedenen Läufen (N= 5) führte mit der Methode des ZLCL zu einem inter- assay Variationskoeffizienten von 14,7 % bei einer mittleren Konzentration von 1,15 % CDT. Die Recipe- Methode (N= 4) ergab einen VK von 18,8 % bei einer Durchschnittskonzentration von 1,08 % CDT. Eine pathologische Probe (N= 2) wurde mit der Methode ZLCL wiederholt bestimmt und zeigte einen VK von 3,8 % bei einem Mittelwert von 8,01 % CDT. Die gleiche Probe ergab mit der Recipe- Methode einen VK von 4,3 % bei einem Mittelwert von 9,35 % CDT. Aufgrund des kleinen Zahlenkollektivs wurde hier auf eine Wilcoxon- Analyse verzichtet.

**Tabelle 3.3.:** Impräzision von Lauf zu Lauf eines identischen Serums

A unauffällige Serumprobe

B pathologische Serumprobe

N = Anzahl der Messungen, MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung, VK= Variationskoeffizient

	A		B	
	ZLCL	Recipe	ZLCL	Recipe
N	5	4	2	2
MW CDT (%)	1,15	1,08	8,01	9,35
SD CDT (%)	+/-0,17	+/-0,20	+/-0,30	+/-0,40
VK CDT (%)	14,76	18,81	3,80	4,27

Die Ergebnisse der verschiedenen Präzisionsuntersuchungen weisen auf signifikante Unterschiede zwischen den beiden Methoden hin.

Um diese Unterschiede genauer charakterisieren zu können, wurde ein umfangreiches Probenkollektiv (N= 141) mit beiden HPLC- Methoden untersucht und die Messergebnisse statistisch evaluiert.

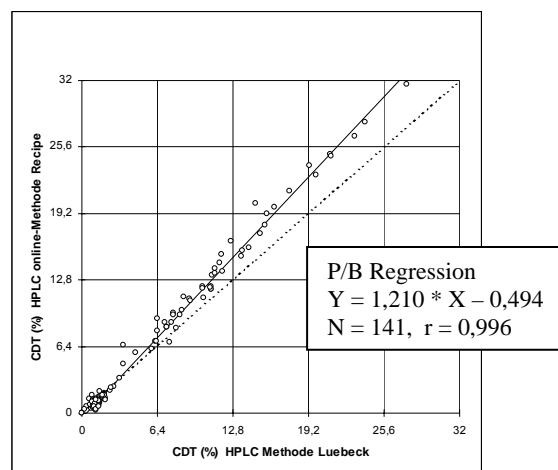
### 3.1.3. Statistik des Methodenvergleichs

**Tabelle 3.4.:** Deskriptive Statistik des Methodenvergleiches (N= 141)

MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung, V= Varianz

Methode	Wertebereich	Median	MW	SD	V
ZLCL baseline	0,0-27,5	1,419	5,0325	+/-5,9865	35,838
Recipe baseline/valley-to-valley	0,0-31,6	1,309	5,6814	+/-7,2339	52,329

Es ist zu erkennen, dass die Recipe- Methode mit der gemischten baseline/valley-to-valley- Auswertung im Mittel höhere CDT %- Werte (MW: 5,68 % CDT) erzielt als die HPLC- Methode des ZLCL mit der baseline- Integration des Chromatogramms (MW: 5,03 % CDT). In der Regressionsanalyse der Ergebnisse beider Methoden nach Passing und Bablok ergab sich ein Korrelationskoeffizient von 0,996 bei einer Regressionsgeraden von  $y=1,21x-0,49$  (Abb. 3.1.,  $y=$  % CDT Recipe und  $x=$  % CDT ZLCL). Die Regressionsgerade weicht deutlich von der (gestrichelt dargestellten) Einheitsgeraden (Steigung 1.0) ab zu Gunsten höherer CDT- Werte der Recipe- Methode.



**Abbildung 3.1.:** Passing und Bablok Regressionsanalyse der CDT-Konzentrationen, gemessen in 141 Patientenseren mit der Recipe- HPLC- Methode (y- Achse), verglichen mit der ZLCL- HPLC- Methode (x- Achse)

Um zu prüfen, ob sich analog zu den CDT- Werten der Kontrollproben auch die CDT- Werte der Patienten, die mit beiden Methoden erstellt wurden, signifikant unterscheiden, wurde ein gepaarter t- Test durchgeführt. Mit  $p < 0,05$  zeigte sich

ein signifikanter Unterschied zwischen den Mittelwerten der CDT- Ergebnisse beider Methoden (Tab. 3.5.).

**Tabelle 3.5.:** Gepaarter t- Test der Ergebnisse Methode ZLCL baseline-Integration und Methode Recipe Auswertung baseline/valley-to-valley

N= Anzahl der Messungen, bs= baseline, bs/vtv= baseline/valley-to-valley

	ZLCL bs	Recipe bs/vtv
N	141	141
Niedrigster Wert	0,0000	0,0000
Höchster Wert	27,4830	31,5960
Arithmetisches Mittel	5,0325	5,6814
Standardabweichung	+/-5,9865	+/-7,2339

Gepaarter t-Test		ZLCL vs. Recipe
Mittlere Differenz		0,6489
Standardabweichung		+/-1,3711
Wahrscheinlichkeit P		< 0,0001

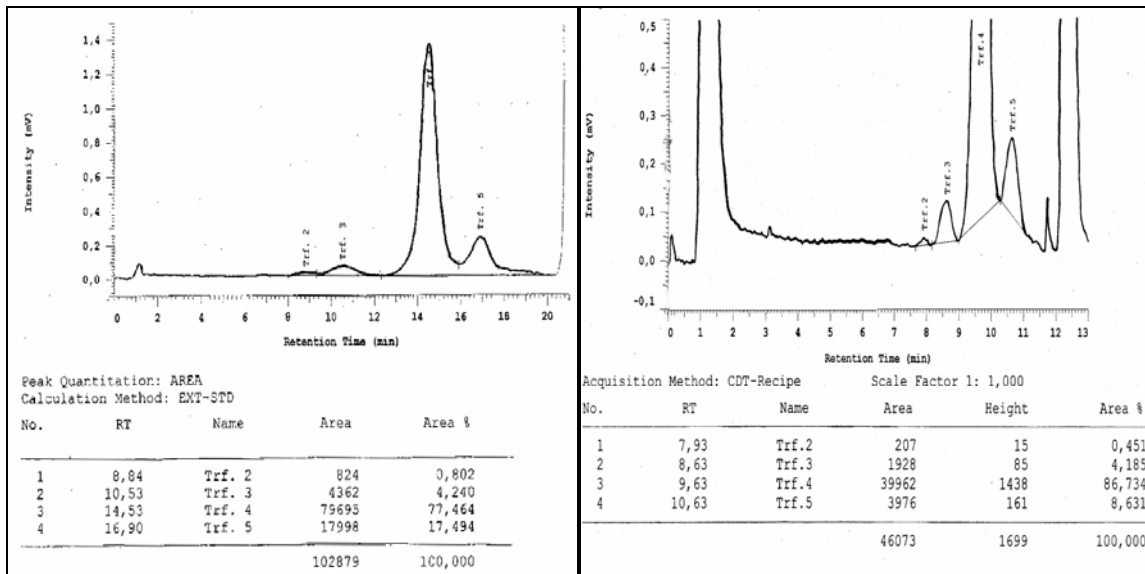
Um zu untersuchen, ob die unterschiedliche Art der Auswertung in beiden Methoden für die differenten Ergebnisse mit verantwortlich sein könnte, wurden die Chromatogramme, die mit beiden Methoden erstellt worden waren, einheitlich durch eine baseline- Integration ausgewertet (s. Abb. 3.2. im Vergleich zu Abb. 3.3., S. 48).

**Tabelle 3.6.:** Deskriptive Statistik des Methodenvergleiches der beiden Verfahren nach einheitlicher baseline- Auswertung

MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung, V= Varianz

Methode	Wertebereich	Median	MW	SD	V
ZLCL baseline	0,0-27,5	1,419	5,0325	+/-5,9865	35,838
Recipe baseline	0,0-30,0	1,240	5,2808	+/-6,7554	45,635

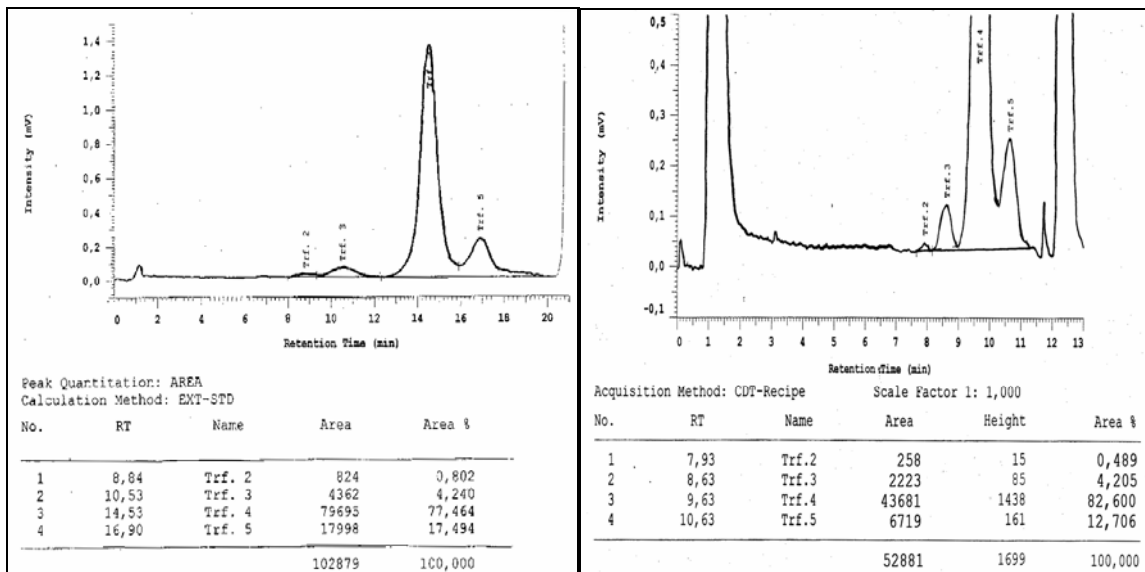
In der anschließenden Regressionsanalyse war der Korrelationskoeffizient praktisch unverändert (0,997), die Regressionsgerade  $y=1,12x-0,37$  näherte sich jedoch der Einheitslinie deutlich an, d.h. auch die Ergebnisse der verschiedenen Methoden glichen sich durch die einheitliche Auswertungsart einander an.



**Abbildung 3.2.:** Vergleich der Integrationsmethoden am Chromatogramm einer normalen Serumprobe

links: Methode ZLCL, Auswertung baseline

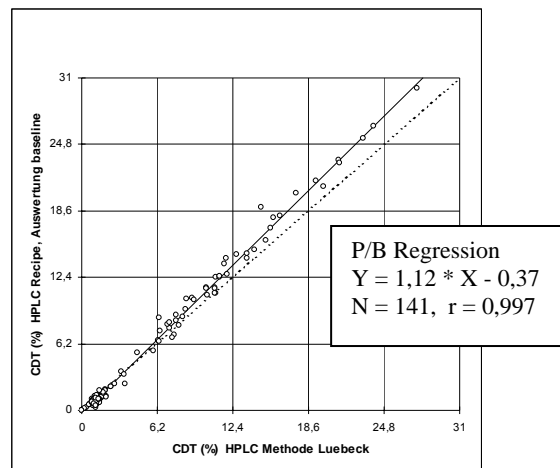
rechts: Methode Recipe, Auswertung baseline/valley-to-valley



**Abbildung 3.3:** Chromatogramme und Ergebnisse der normalen Serumprobe aus Abb.3.2. nach gleicher Auswertung beider Verfahren mit baseline- Integration

links: Methode ZLCL, Auswertung baseline

rechts: Methode Recipe, Auswertung baseline



**Abbildung 3.4.:** Passing und Bablok Regressionsanalyse der CDT-Konzentrationen, gemessen in 141 Patientenseren mit der Recipe HPLC-Methode (y- Achse), und mit der ZLCL- HPLC- Methode (x- Achse), jeweils nach Auswertung mit der gleichen Integrationsweise (baseline)

**Tabelle 3.7.:** Gepaarter t- Test der Ergebnisse Methode ZLCL baseline- Auswertung und Methode Recipe baseline- Auswertung

N= Anzahl der Messungen, bs= baseline

	ZLCL bs	Recipe bs
N	141	141
Niedrigster Wert	0,0000	0,0000
Höchster Wert	27,4830	30,0400
Arithmetisches Mittel	5,0325	5,2808
Standardabweichung	+/-5,9865	+/-6,7554

Gepaarter t-Test		ZLCL bs/ Recipe bs
Mittlere Differenz		0,2483
Standardabweichung		+/-0,9065
Wahrscheinlichkeit P		0,0014

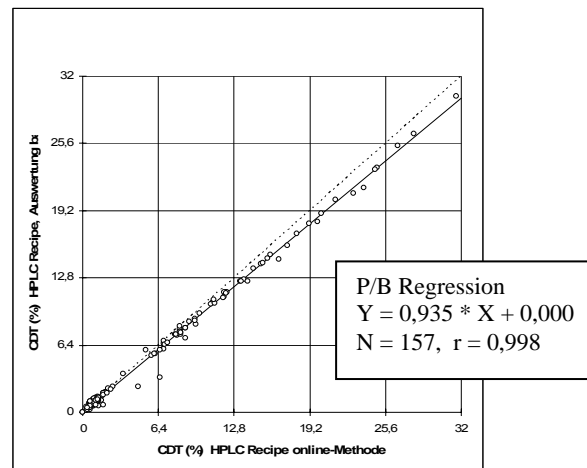
Bei gleicher Auswertung der Chromatogramme beider Methoden ergibt sich weiterhin ein signifikanter Unterschied der Mittelwerte ( $p < 0,0014$ ), bei einer geringeren mittleren Differenz.

Der interne Vergleich der Chromatogramme der Recipe- Methode bei gemischter baseline/valley-to-valley- Auswertung mit der reinen baseline- Integration für 157 CDT- Werte (gemessen in den oben erwähnten 141 Patientenseren und in einer Reihe von Kontrollen) ergab einen Korrelationskoeffizient von 0,998, die Geradengleichung der Regressionslinie war  $y=0,935 x+0,00$  (Abb. 3.5).

**Tabelle 3.8.:** Deskriptive Statistik des Methodenvergleiches

MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung, V= Varianz

Methode	Wertebereich	Median	MW	SD	V
Recipe baseline/valley-to-valley	0,0-31,6	1,386	5,694	+/-6,9148	47,814
Recipe baseline	0,0-30,0	1,340	5,290	+/-6,4552	41,670



**Abbildung 3.5.:** Passing Bablok Regressionsanalyse der CDT-Konzentrationen gemessen in 157 Patientenseren mit der Recipe HPLC- Methode baseline Auswertung (y- Achse), verglichen mit der Recipe HPLC- Methode baseline/valley-to-valley (x- Achse)

**Tabelle 3.9.:** Gepaarter t- Test der Ergebnisse Methode Recipe Auswertung  
baseline/valley-to-valley und Methode Recipe Auswertung baseline

N= Anzahl der Messungen, bs= baseline, bs/vtv= baseline/valley-to-valley

	Recipe bs/vtv	Recipe bs
N	157	157
Niedrigster Wert	0,0000	0,0000
Höchster Wert	31,596	30,0400
Arithmetisches Mittel	5,6936	5,2897
Standardabweichung	+/-6,9148	+/-6,4552

Gepaarter t-test		Recipe bs/vtv Recipe bs
Mittlere Differenz		- 0,4039
Standardabweichung		+/-0,6072
Wahrscheinlichkeit	P	<0,0001

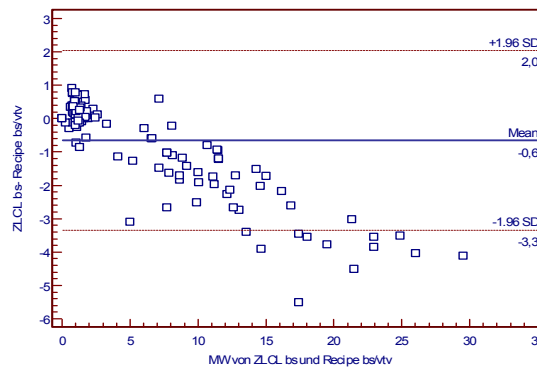
Bei unterschiedlicher Auswertung zeigen die Ergebnisse der Recipe- Methode signifikante Unterschiede. Dieser Befund weist auf einen entscheidenden Einfluss der Integrationsart auf das Ergebnis hin.

Um den Einfluss der CDT- Konzentration auf methodenabhängige Unterschiede zu prüfen, wurden aus dem Methodenvergleich von 141 Proben die Mittelwerte der zwei Verfahren sowie deren Differenz errechnet (Tab. 3.10) und in einem Bland- Altman- Diagramm einander gegenübergestellt (Abb. 3.6, S. 52).

**Tabelle 3.10.:** Statistische Kennzahlen des Vergleichs Methode ZLCL  
Auswertung baseline versus Methode Recipe Auswertung  
baseline/valley-to-valley (N= Anzahl der Messungen)

Statistik	
N	141
Arithmetisches Mittel	-0,6489
95 % Konfidenzintervall	-0,8772 to -0,4206
Standardabweichung	+/-1,3711
Unteres Limit	-3,3362
95 % Konfidenzintervall	-3,7272 to - 2,9451
Oberes Limit	2,0383
95 % Konfidenzintervall	1,6473 to 2,4294

Die Differenzen der Ergebnisse beider Methoden sind in niedrigem Wertebereich annähernd Null, bei steigendem CDT- Anteil allerdings steigen auch die Differenzen in den negativen Bereich über die Standardabweichung hinaus. Die Recipe CDT %- Werte sind deutlich höher als die ZLCL CDT %- Werte.



**Abbildung 3.6.:** Bland- Altman Plot

x- Achse: Mittelwert aus CDT % ZLCL baseline- Auswertung (bs) und CDT % Recipe kombinierte Auswertung baseline und valley-to-valley (bs/vtv)

y- Achse: Differenz aus CDT % ZLCL bs und CDT % Recipe bs/vtv

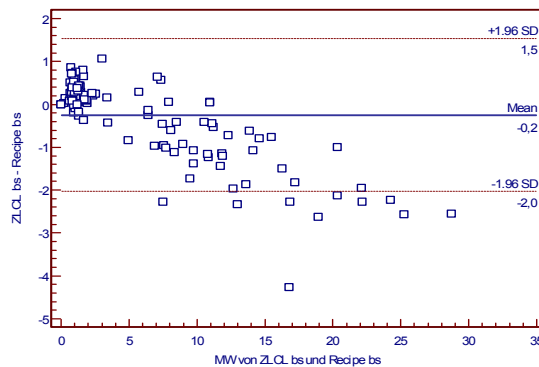
**Tabelle 3.11.:** Statistische Kennzahlen des Vergleichs Methode ZLCL Auswertung baseline versus Methode Recipe Auswertung baseline

N= Anzahl der Messungen

Statistik	
N	141
Arithmetisches Mittel	-0,2483
95 % Konfidenzintervall	-0,3992 to -0,0974
Standardabweichung	+/-0,9065
Unteres Limit	-2,0250
95 % Konfidenzintervall	-2,2835 to - 1,7664
Oberes Limit	1,5283
95 % Konfidenzintervall	1,2698 to 1,7869

Das Diagramm in Abbildung 3.7. (S. 53) zeigt eine Annäherung der beiden Methoden durch die baseline- Integration der Chromatogramme der Recipe-Methode. Die Differenzen der Methoden sind auch im höheren CDT- Wertebereich

geringer, mehr Werte befinden sich innerhalb der Standardabweichung und gruppieren sich um den Mittelwert der Differenz.



**Abbildung 3.7.:** Bland und Altman Plot

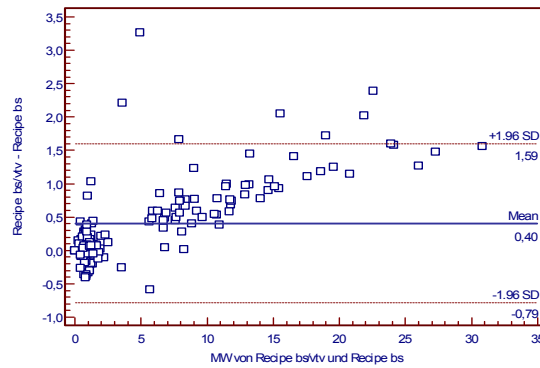
x- Achse: Mittelwert aus CDT % ZLCL baseline- Auswertung (bs) und CDT % Recipe baseline- Auswertung

y- Achse: Differenz aus CDT % ZLCL bs und CDT % Recipe bs

**Tabelle 3.12.:** Statistische Kennzahlen des Vergleichs Methode Recipe Auswertung baseline/valley-to-valley versus Methode Recipe Auswertung baseline (N= Anzahl der Messungen)

Statistik	
N	157
Arithmetisches Mittel	0,4039
95 % Konfidenzintervall	0,3082 to 0,4996
Standardabweichung	+/-0,6072
Unteres Limit	-0,7863
95 % Konfidenzintervall	-0,9502 to - 0,6223
Oberes Limit	1,5941
95 % Konfidenzintervall	1,4301 to 1,7580

In Übereinstimmung mit den vorstehenden Befunden zeigt das Diagramm eine sehr geringe Differenz der unterschiedlich ausgewerteten Ergebnisse der Methode Recipe bei niedrigen CDT %- Werten. Bei steigender CDT- Konzentration vergrößert sich die Differenz der beiden Auswertungsarten, wobei sich die Werte der kombinierten Integration (baseline und valley-to-valley) als höher erweisen.



**Abbildung 3.8.:** Bland und Altman Plot

x- Achse: Mittelwert aus CDT % Recipe kombinierte Auswertung baseline und valley-to-valley (bs/vtv) und CDT % Recipe baseline- Auswertung

y- Achse: Differenz aus CDT % Recipe bs/vtv und CDT % Recipe bs

**Tabelle 3.13.:** Zusammenfassende Darstellung der Untersuchungsergebnisse des Methodenvergleichs

r= Korrelationskoeffizient, y= Steigung der Regressionsgeraden nach Passing und Bablok,

P = Wahrscheinlichkeit ermittelt mit gepaartem t-Test,

Mittlere Differenz der Mittelwerte nach Bland und Altman

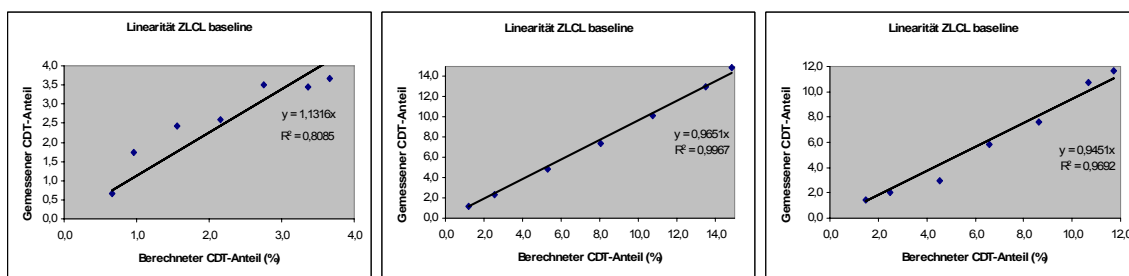
	Recipe baseline/ valley-to-valley	Recipe baseline
ZLCL baseline	r= 0,996 y= 1,21 x P< 0,0001 Mittlere Differenz= 0,6489	r= 0,997 y= 1,12 x P= 0,0014 Mittlere Differenz= 0,2483
Recipe baseline/ valley-to-valley		r= 0,998 y= 0,935 x P< 0,0001 Mittlere Differenz= - 0,4039

Es ist zusammenfassend zu sagen, dass zwischen der Methode ZLCL und der Methode Recipe signifikante Unterschiede in den ermittelten CDT %- Werten bestehen. Gleicht man die Auswertungsarten der beiden Methoden an und verwendet dazu die baseline- Auswertung, so werden die Unterschiede zwischen den Ergebnissen der Methoden deutlich geringer.

### 3.2. CDT- Bestimmung in seriell gemischten Proben

Um zu prüfen, ob sich bei vorgegebener Variation des CDT- Anteils aus den chromatographischen Ergebnissen Präferenzen für die Auswahl einer Integrationsmethode ableiten lassen, wurden seriell gemischte Proben mit beiden HPLC- Methoden untersucht.

#### 3.2.1. Methode ZLCL, Auswertung baseline



A) Mischung 1

B) Mischung 2

C) Mischung 3

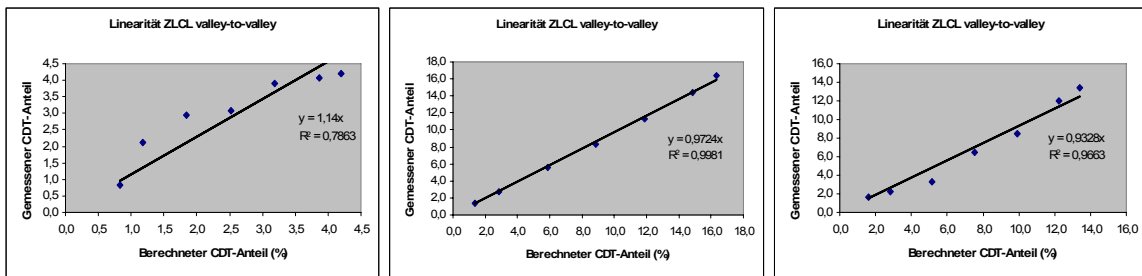
**Abbildung 3.9.:** Darstellung der in 3 Messreihen an seriell gemischten Proben mit der HPLC- Methode ZLCL erhaltenen CDT %- Ergebnisse nach Auswertung mit baseline- Integration. Einander gegenübergestellt wurde der aus dem Mischungsverhältnis berechnete CDT %- Gehalt auf der x- Achse und der gemessene CDT %- Gehalt auf der y- Achse im Windows Excel Programm. Eine Regressionslinie durch den Nullpunkt veranschaulicht die Übereinstimmung. Die Steigung der Geraden  $y$  und der Korrelationskoeffizient  $R^2$  sind angegeben.

A) Mischung 1: Serum 1: normale Probe + Serum 2: Probe mit leicht erhöhtem CDT (%)

B) Mischung 2: Serum 1: normale Probe + Serum 2: hochpathologische Probe

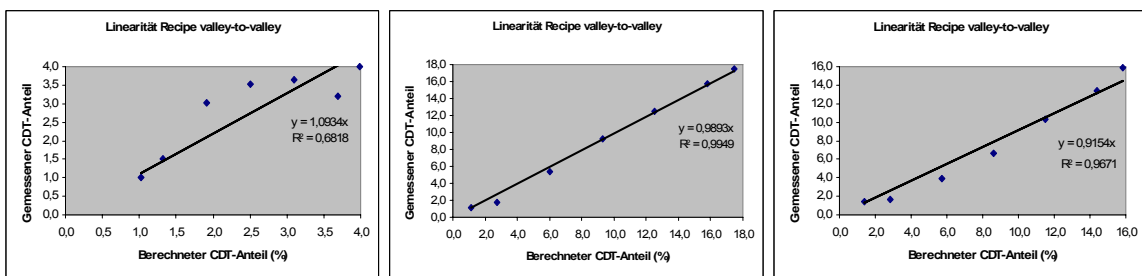
C) Mischung 3: Serum 1: normale Probe + Serum 2: pathologische Probe

### 3.2.2. Methode ZLCL, Auswertung valley-to-valley



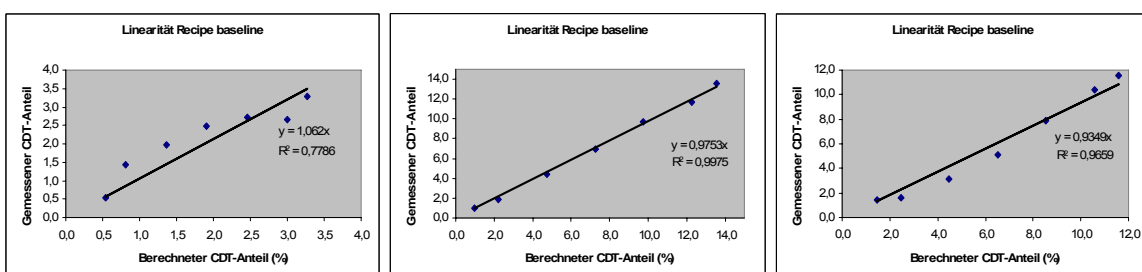
**Abbildung 3.10.:** Darstellung der an 3 seriell gemischten Proben mit der HPLC-Methode ZLCL erhaltenen CDT %- Ergebnisse nach Auswertung mit valley-to-valley- Integration. Erklärung siehe Abb. 3.9. (S.55)

### 3.2.3. Methode Recipe, Auswertung valley-to-valley



**Abbildung 3.11.:** Darstellung der an 3 seriell gemischten Proben mit der HPLC-Methode Recipe erhaltenen CDT %- Ergebnisse nach Auswertung mit valley-to-valley- Integration. Erklärung siehe Abb. 3.9. (S.55)

### 3.2.4. Methode Recipe, Auswertung baseline



**Abbildung 3.12.:** Darstellung der an 3 seriell gemischten Proben mit der HPLC-Methode Recipe erhaltenen CDT %- Ergebnisse nach Auswertung mit baseline-Integration. Erklärung siehe Abb. 3.9. (S.55)

**Tabelle 3.14.:** Vergleiche der Steigung  $y$  der Regressionsgeraden und der Korrelationskoeffizienten  $R^2$  der einzelnen Methoden

Mischung 1: Serum 1: normale Probe + Serum 2: Probe mit leicht erhöhtem CDT (%)

Mischung 2: Serum 1: normale Probe + Serum 2: hochpathologische Probe

Mischung 3: Serum 1: normale Probe + Serum 2: pathologische Probe

Mittl. Diff: Mittlere Differenz aus dem errechneten CDT %- Wert und dem gemessenen CDT %- Wert

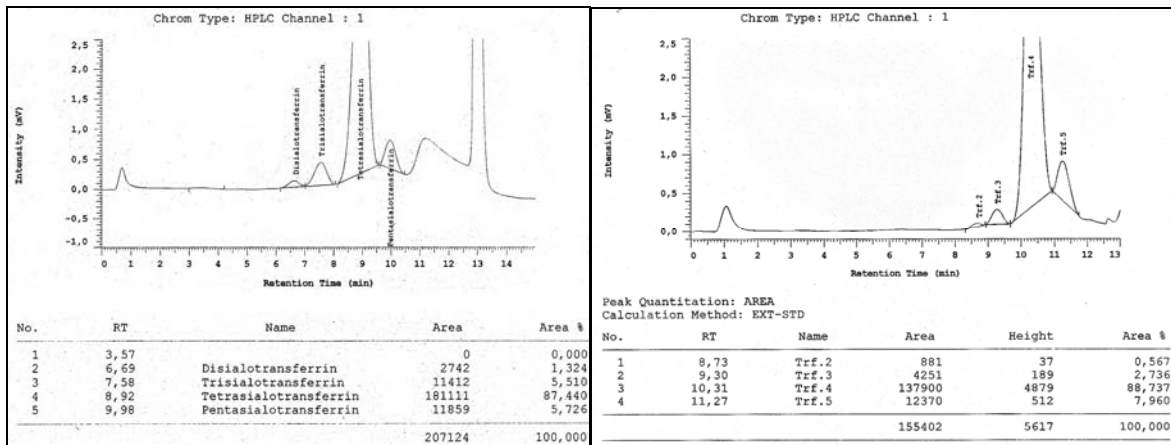
	ZLCL baseline	ZLCL valley-to-valley	Recipe baseline	Recipe valley-to-valley
Mischung 1	$y = 1,1316 x$ $R^2 = 0,8085$ mittl. Diff: -0,41	$y = 1,14 x$ $R^2 = 0,7863$ mittl. Diff: -0,5	$y = 1,062 x$ $R^2 = 0,7786$ mittl. Diff: -0,24	$y = 1,0934 x$ $R^2 = 0,6818$ mittl. Diff: -0,34
Mischung 2	$y = 0,9651 x$ $R^2 = 0,9967$ mittl. Diff: 0,35	$y = 0,9724 x$ $R^2 = 0,9981$ mittl. Diff: 0,29	$y = 0,9753 x$ $R^2 = 0,9975$ mittl. Diff: 0,24	$y = 0,9893 x$ $R^2 = 0,9949$ mittl. Diff: 0,26
Mischung 3	$y = 0,9451 x$ $R^2 = 0,9692$ mittl. Diff: 0,55	$y = 0,9328 x$ $R^2 = 0,9663$ mittl. Diff: 0,73	$y = 0,9349 x$ $R^2 = 0,9659$ mittl. Diff: 0,65	$y = 0,9154 x$ $R^2 = 0,9671$ mittl. Diff: 1,05

Die Ergebnisse der Korrelationsanalyse lassen weder bezüglich des Korrelationskoeffizienten noch bezüglich der Steigung der Regressionsgeraden eine der beiden Integrationsmethoden eindeutig favorisieren. Hinsichtlich der mittleren Differenz zeigen die baseline- Auswertungen bessere Ergebnisse.

### 3.3. Verifizierung der Untersuchungsergebnisse durch einen erneuten HPLC-Methodenvergleich unter Einschluss einer weiteren kommerziellen Methode (Fa. Chromsystems)

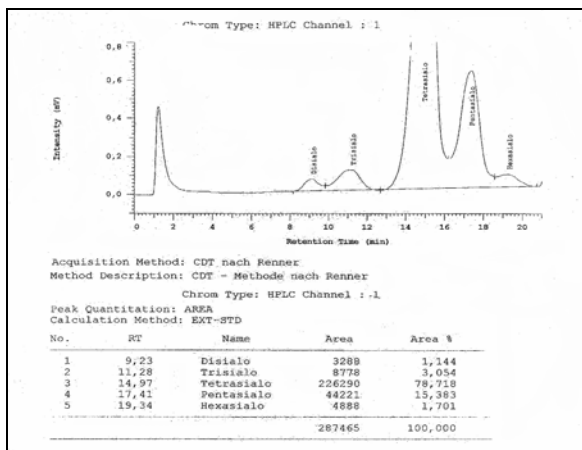
Um den Befund zu bestätigen, dass die Art der Integration wesentlich zu den methodenabhängigen Unterschieden zwischen den Ergebnissen verschiedener HPLC- Methoden zur CDT- Bestimmung beiträgt, wurde ein weiterer Methodenvergleich an 51 Patientenseren unter Einschluss einer zwischenzeitlich auf den Markt gekommenen HPLC- Methode der Fa. Chromsystems durchgeführt. Alle drei HPLC- Methoden wurden mit den gängigen Integrationsverfahren baseline, baseline/valley-to-valley und zusätzlich mit einer durchgehenden valley-to-valley-Integration aller Peaks des Chromatogramms ausgewertet.

3.3.1. Chromatogramme der verschiedenen Methoden



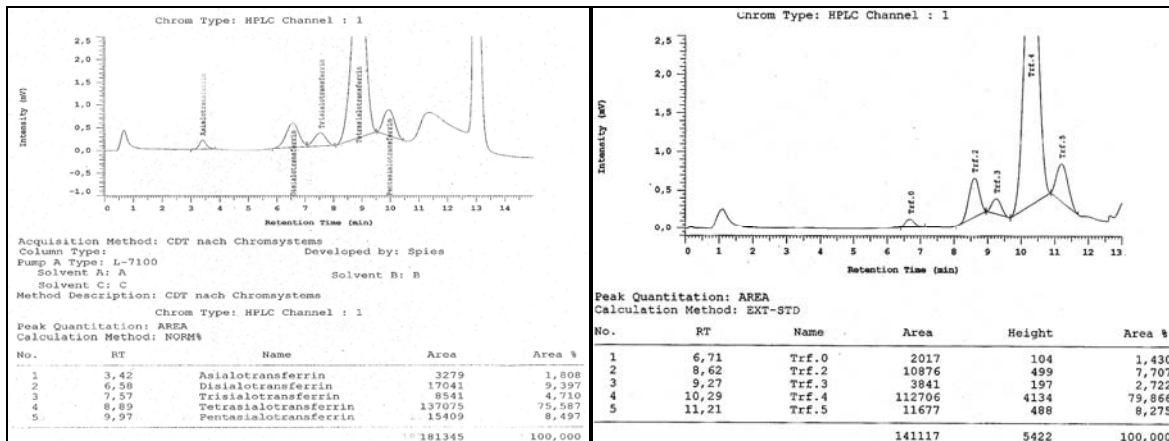
A

B



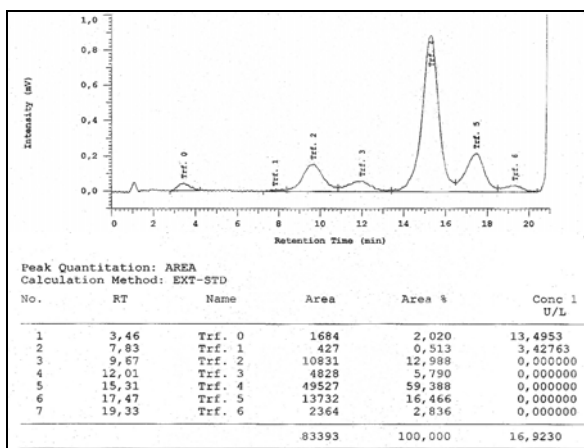
C

Abbildung 3.13.: Chromatogramme einer physiologischen Probe  
 A Methode Chromsystems, B Methode Recipe, C Methode ZLCL



A

B



C

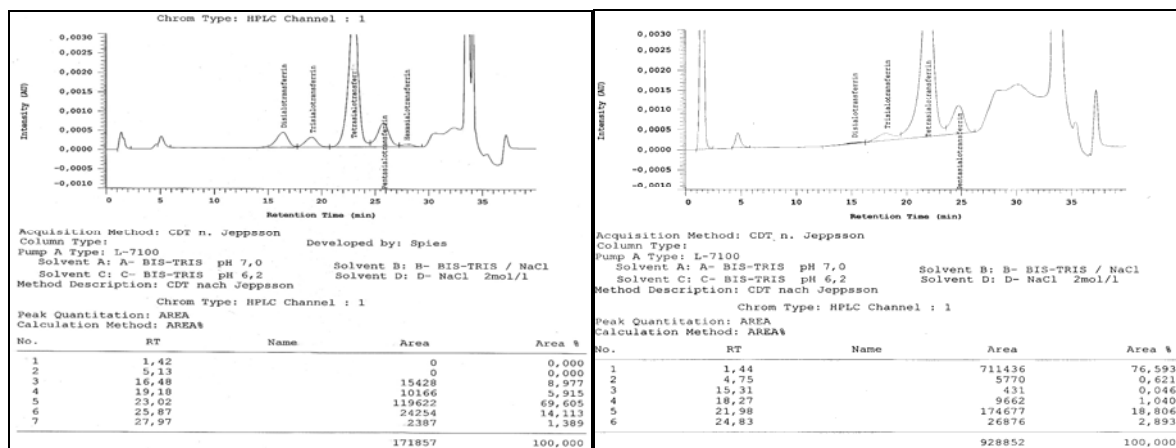
**Abbildung 3.14.:** Chromatogramme einer pathologischen Probe gemessen mit A Methode Chromsystems, B Methode Recipe, C Methode ZLCL

Als etablierte und gut untersuchte wissenschaftliche Methode mit kommerziell erhältlichem Säulenmaterial sollte die optimierte HPLC- Methode nach Helander et al. [33] in den Vergleich einbezogen werden.

### 3.3.2. HPLC- Methode Helander et al. [33]

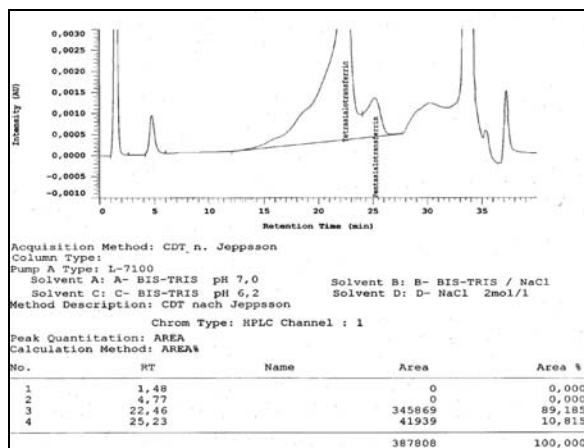
Zunächst konnte die Helander et al.- Methode für einige Probedurchgänge problemlos auf dem HPLC- Systems des Zentrallabors durchgeführt werden. Die Chromatogramme ergaben sehr zufrieden stellende Ergebnisse bezüglich der Auftrennung der Transferrin- Isoformen, so dass diese Methode sicher in den Methodenvergleich mit einbezogen werden sollte. Jedoch zeigte sich beim letzten Probelauf sowie bei der Messung der 51 Serumproben ein zuvor nicht

aufgetretenes Problem. Das Asialotransferrin verschwand im Chromatogrammverlauf, die einzelnen Peaks zogen sich in die Breite und eluierten ineinander. Auch nach mehreren neuen Ansätzen der Methode mit frischen Puffern, mit langem Spülen des Systems, Spülen und Reinigen der Säule und mit frischen Proben ließ sich das Problem nicht mehr beheben, so dass wir im Methodenvergleich auf das Verfahren nach Helander et al. verzichten mussten.



A

B



C

**Abbildung 3.15.:** Chromatogramme einer pathologischen Probe gemessen mit

A Methode Helander et al.

B Chromatogramm Methode Helander et al.: Beginnendes Zusammenlaufen der Peaks

C Chromatogramm Methode Helander et al.: Zusammenlaufen der Peaks

### 3.3.3. Statistik des Methodenvergleichs

Die einzelnen Methoden und ihre Auswertungsverfahren wurden verglichen durch eine Regressionsanalyse nach Passing und Bablok, einem Bland-Altman- Plot zum Vergleich der Differenzen der Mittelwerte und einem gepaarten t- Test zur Signifikanzbestimmung. Es werden die Versuchsergebnisse aus allen Analysen in den folgenden Tabellen einander gegenüber gestellt.

**Tabelle 3.15.:** Darstellung der deskriptiven Statistik des Methoden- und Auswertungsvergleichs (ZLCL, Recipe, Chromsystems)

MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung, V= Varianz , VK= Variationskoeffizient

	MW	SD	V	VK	Wertebereich
Chromsystems valley-to-valley	3,517	+/-5,018	25,180	142,66	0,641-25,535
Chromsystems baseline	3,252	+/-4,755	22,607	146,20	0,594- 24,669
Chromsystems baseline/ valley-to-valley	3,523	+/-5,037	25,369	142,97	0,641- 25,536
Recipe valley-to-valley	2,780	+/-4,572	20,903	164,46	0,203- 24,385
Recipe baseline	3,256	+/-4,697	22,059	144,25	0,500- 24,358
Recipe baseline/ valley-to-valley	3,902	+/-5,380	28,947	137,90	0,619- 26,660
ZLCL valley-to-valley	3,090	+/-4,446	19,764	143,89	0,637- 23,256
ZLCL baseline	3,295	+/-4,389	19,262	133,21	0,785- 22,555
ZLCL baseline/ valley-to-valley	3,756	+/-4,839	23,416	128,83	0,9522- 23,997

**Tabelle 3.16.:** Zusammenfassende Darstellung der Untersuchungsergebnisse des Methodenvergleiches Recipe versus ZLCL in den verschiedenen Auswertungsarten

r= Korrelationskoeffizient, y= Steigung der Regressionsgeraden nach Passing und Bablok,

P = Wahrscheinlichkeit ermittelt mit gepaartem t-Test

Mittlere Differenz der Mittelwerte nach Bland und Altman

x-Achse: Methode im Vergleich auf der x-Achse stehend

y-Achse: Methode im Vergleich auf der y-Achse stehend

y-Achse ► x-Achse ▼	ZLCL valley-to-valley	ZLCL baseline	ZLCL baseline/ valley-to-valley
Recipe valley-to-valley	r= 0,997 y= 1,01 x P< 0,0001 Mittlere Differenz= -0,3097	r= 0,991 y= 1,04 x P< 0,0001 Mittlere Differenz= -0,5148	r= 0,989 y= 1,19 x P= 0,0014 Mittlere Differenz= -0,9762
Recipe baseline	r= 0,999 y= 0,94 x P= 0,0011 Mittlere Differenz= 0,1663	r= 0,998 y= 0,96 x P= 0,5325 Mittlere Differenz= -0,0387	r= 0,996 y= 1,10 x P< 0,0001 Mittlere Differenz= -0,5001
Recipe baseline/ valley-to-valley	r= 0,997 y= 0,78 x P< 0,0001 Mittlere Differenz= 0,8119	r= 0,996 y= 1,10 x P= 0,0002 Mittlere Differenz= 0,6489	r= 0,997 y= 0,91 x P= 0,1331 Mittlere Differenz= 0,1455
ZLCL valley-to-valley		r= 0,998 y= 1,02 x P< 0,0001 Mittlere Differenz= -0,2051	r= 0,996 y= 1,16 x P< 0,0001 Mittlere Differenz= -0,6664
ZLCL baseline			r= 0,999 y= 1,13 x P< 0,0001 Mittlere Differenz= -0,4614

**Tabelle 3.17.:** Zusammenfassende Darstellung der Untersuchungsergebnisse des Methodenvergleiches Chromsystems versus Recipe in den verschiedenen Auswertungsarten

r= Korrelationskoeffizient, y= Steigung der Regressionsgeraden nach Passing und Bablok,

P = Wahrscheinlichkeit ermittelt mit gepaartem t- Test

Mittlere Differenz der Mittelwerte nach Bland und Altman

x-Achse: Methode im Vergleich auf der x-Achse stehend

y-Achse: Methode im Vergleich auf der y-Achse stehend

y-Achse ► x-Achse ▼	Recipe valley-to-valley	Recipe baseline	Recipe baseline/ valley-to-valley
Chromsystems valley-to-valley	r= 0,995 y= 0,85 x P< 0,0001 Mittlere Differenz= -0,7374	r= 0,998 y= 0,94 x P= 0,0001 Mittlere Differenz= 0,2613	r= 0,998 y= 1,10 x P= 0,0014 Mittlere Differenz= -0,3843
Chromsystems baseline	r= 0,996 y= 0,93 x P< 0,0001 Mittlere Differenz= 0,4723	r= 0,999 y= 0,99 x P= 0,9022 Mittlere Differenz= -0,0037	r= 0,996 y= 1,20 x P< 0,0001 Mittlere Differenz= -0,6494
Chromsystems baseline/ valley-to- valley	r= 0,995 y= 0,85 x P< 0,0001 Mittlere Differenz= 0,7430	r= 0,999 y= 0,92 x P< 0,0001 Mittlere Differenz= 0,2670	r= 0,998 y= 1,10 x P< 0,0001 Mittlere Differenz= -0,3787
Recipe valley-to-valley		r= 0,995 y= 1,09 x P< 0,0001 Mittlere Differenz= -0,4761	r= 0,995 y= 1,29 x P< 0,0001 Mittlere Differenz= -1,1217
Recipe baseline			r= 0,997 y= 1,19 x P< 0,0001 Mittlere Differenz= -0,6456

**Tabelle 3.18.:** Zusammenfassende Darstellung der Untersuchungsergebnisse des Methodenvergleiches Chromsystems versus ZLCL in den verschiedenen Auswertungsarten

r= Korrelationskoeffizient, y= Steigung der Regressionsgeraden nach Passing und Bablok,

P = Wahrscheinlichkeit ermittelt mit gepaartem t-Test

Mittlere Differenz der Mittelwerte nach Bland und Altman

x-Achse: Methode im Vergleich auf der x-Achse stehend

y-Achse: Methode im Vergleich auf der y-Achse stehend

y-Achse ► x-Achse ▼	ZLCL valley-to-valley	ZLCL baseline	ZLCL baseline/ valley-to-valley	Chromsystems baseline	Chromsystems baseline/ valley-to-valley
Chromsystems valley-to-valley	r= 0,999 y= 0,87 x P< 0,0001 Mittlere Differenz= 0,4276	r= 0,996 y= 0,89 x P= 0,0374 Mittlere Differenz= 0,2226	r= 0,996 y= 1,00 x P= 0,0006 Mittlere Differenz= -0,2388	r= 0,999 y= 0,93 x P< 0,0001 Mittlere Differenz= 0,2651	r= 1,0 y= 1 x P= 0,7984 Mittlere Differenz= -0,0056
Chromsystems baseline	r= 0,999 y= 0,94 x P= 0,0032 Mittlere Differenz= 0,1626	r= 0,997 y= 0,97 x P= 0,5632 Mittlere Differenz= -0,0425	r= 0,995 y= 1,11 x P< 0,0001 Mittlere Differenz= -0,5038		r= 1,0 y= 1,08 x P< 0,0001 Mittlere Differenz= -0,2707
Chromsystems baseline/ valley-to-valley	r= 0,999 y= 0,87 x P< 0,0001 Mittlere Differenz= 0,4333	r= 0,997 y= 0,89 x P= 0,0306 Mittlere Differenz= 0,2282	r= 0,997 y= 1,01x P= 0,0003 Mittlere Differenz= -0,2331		

Bezogen auf Tabelle 3.15. (S. 61) ist zu sagen, dass die niedrigsten CDT- Anteile von der Methode Recipe mit der Auswertung valley-to-valley erlangt werden. Gleichzeitig erreicht Recipe mit der kombinierten Auswertung baseline/valley-to-valley die höchsten Werte sowie auch die größte Varianz. Die Methode Chromsystems mit den Integrationsverfahren valley-to-valley und baseline/valley-to-valley ergibt annähernd die gleichen Ergebnisse, während in der baseline Auswertung die Werte deutlich niedriger liegen. ZLCL gelangt zu hohen Ergebnissen in der gemischten Auswertung, die niedrigsten in der valley-to-valley

Integration. Auffallend ist eine Angleichung der Mittelwerte aller drei Methoden bei einer einheitlichen baseline- Auswertung. Alle Methoden erhalten eine höhere Varianz bei einer gemischten baseline/valley-to-valley- Integration.

Betrachtet man die Tabellen 3.16.- 3.18. (S. 62-64) so kann man zusammenfassen, dass die Korrelationskoeffizienten aller Methoden annähernd gleich 1 sind, d.h. die Methoden besitzen einen fast vollständig positiven linearen Zusammenhang.

Bezüglich der Wahrscheinlichkeit P eines signifikanten Unterschiedes der Mittelwerte zeigen sich bis auf einige Ausnahmen die Methoden als höchst signifikant unterschiedlich. Werden die Methoden jedoch in ihrer baseline- Auswertung miteinander verglichen, so weisen sie alle einen P- Wert auf, der sie als nicht signifikant unterschiedlich identifiziert. Dies gilt insbesondere für Recipe baseline und Chromsystems baseline ( $P= 0,9022$ ). Einen ebenfalls hohen P- Wert erhalten wir bei dem Vergleich Chromsystems valley-to-valley und Chromsystems baseline/valley-to-valley ( $P= 0,7984$ ). Auch Recipe und ZLCL in der gemischten Integration erhalten einen nicht signifikant unterschiedlichen P- Wert ( $P= 0,1331$ ).

Die Ergebnisse belegen neben anderen methodenabhängigen Unterschieden den deutlichen Einfluss der Integration der Chromatogramme auf das Resultat der CDT- Bestimmung mittels HPLC.

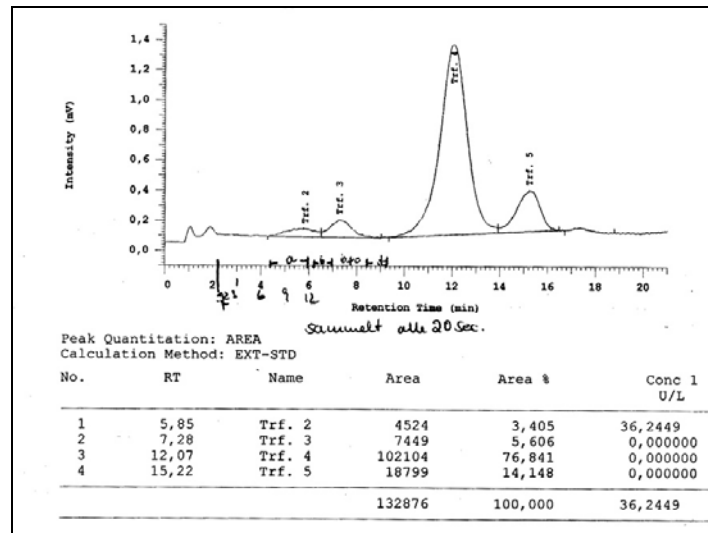
### **3.4. Modifizierung einer etablierten HPLC- Methode zur präparativen Isolierung der Ladungsisoformen des Transferrins**

#### 3.4.1. Bestimmung der Elutionszeiten der Ladungsisoformen des Transferrins in der präparativen HPLC

Im Unterschied zu den analytischen Applikationen mussten beim präparativen Einsatz der HPLC zur Isolierung einzelner Transferrin- Isoformen zunächst die Elutionszeiten der Fraktionen an der eingesetzten HPLC- Anlage bestimmt werden, d.h. die Zeit zwischen dem Erscheinen des Substanzpeaks im Detektor und der Elution der Fraktion im Fraktionensammler.

Während der Analytik eines pathologischen Serums wurde deshalb alle 20 Sekunden bei einem Fluss von 1,0 ml/min jeweils ein Röhrchen mit der aus dem Auslaufschlauch austretenden Flüssigkeit befüllt.

Anhand des Chromatogramms dieser Probe wurden die Retentionszeiten der einzelnen Formen abgelesen.



**Abbildung 3.16.:** Chromatogramm einer pathologischen Probe gemessen mit der Methode ZLCL. Bestimmung der Retentionszeiten der einzelnen Isoformen.

Anhand des Chromatogramms konnten den einzelnen Isoformen folgende Retentionszeiten zugeordnet werden:

Disialotransferrin- Peak: 4,23 min- 6,27 min

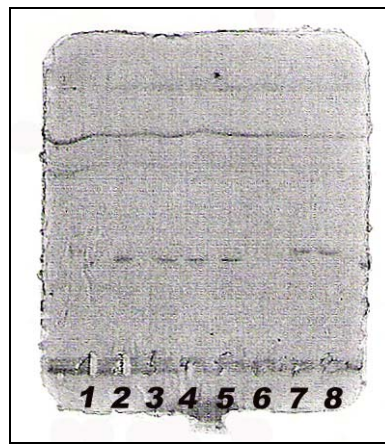
Trisialotransferrin- Peak: 6,27 min- 9 min

Tetrasialotransferrin- Peak: 9 min- 14 min

### 3.4.2. Überprüfung der aufgefangenen Flüssigkeit auf ihren Transferrin-Isoformengehalt in der Isoelektrischen Fokussierung

IEF-Gele (pH 4,5-6) wurden mit je 8 Proben bestückt. Die Durchführung fand analog 2.4.3. mit einer Silberfärbung (Tabelle 2.13., S.40) statt.

Die Isoelektrische Fokussierung zeigte, wie schwierig die zeitliche Festlegung der Isoformen am Verlauf des Chromatogramms ist.



**Abbildung 3.17.:** Isoelektrische Fokussierung (Kap. 2.4.3., S.38) der gesammelten Fraktionen aus der Auftrennung nach Abbildung 3.16.

Im Gel von links nach rechts durchnummeriert mit 1 bis 8, entsprechend der unten aufgeführten Zeiten (alle 20 Sekunden wurde eine Fraktion aufgefangen):

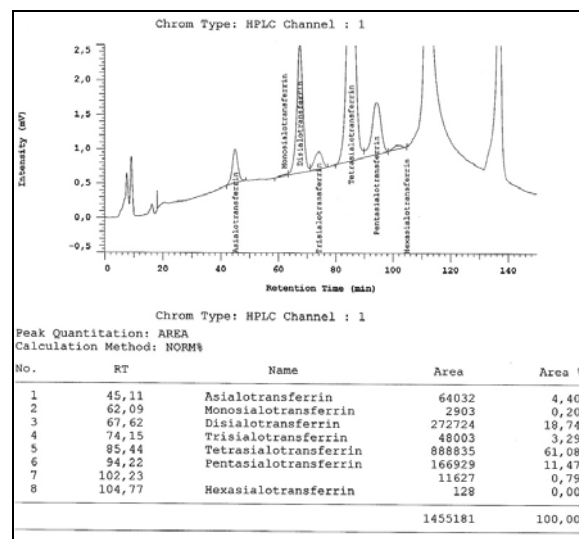
Probe	1	2	3	4	5	6	7	8
Zeit (min)	4.2-4.4	4.4-5	5-5.2	5.2-5.4	5.4-6	6-6.2	6.2-6.4	6.4-7
		Disialo	Disialo	Disialo	Disialo		Trisialo	Trisialo

Jedoch lässt sich anhand des ersten Auftretens des Disialotransferrins letztlich eine Zeit von 17 Sekunden bestimmen, die das Transferrin nach Auftreten des Peaks bzw. Absorption im VIS-Detektor bis zu seinem Nachweis in den Röhren benötigt. Der Disialotransferrin- Peak beginnt bei 4 Minuten und 23 Sekunden, die Isoform ist bei 4 Minuten und 40 Sekunden in der IEF nachweisbar.

Daraus resultierte eine wahrscheinliche Durchlaufzeit vom Detektor bis zum Ende des Auslaufschlauchs von den genannten 17 Sekunden, die in nachfolgenden Sammlungen verifiziert wurden und sich bestätigen ließen.

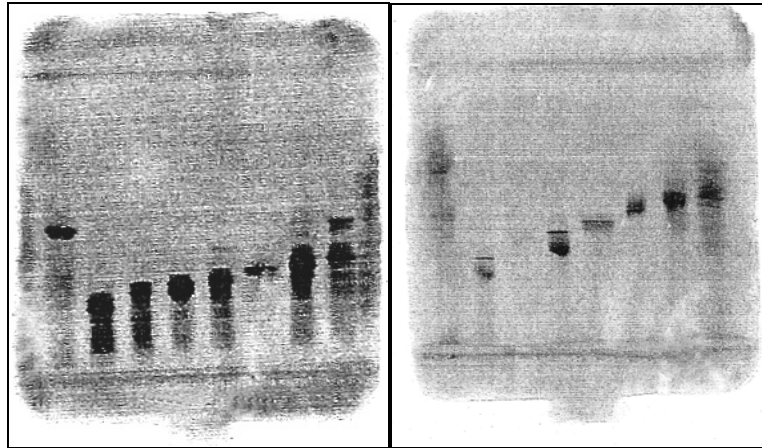
Mit Hilfe dieser Zeit war es möglich, einen Fraktionensammler so zu programmieren, dass die einzelnen Transferrinisoformen getrennt voneinander aufgefangen werden konnten. Es war lediglich nötig, den Chromatogrammverlauf zu überwachen und bei eventuellen Änderungen der Elutionszeiten der Transferrinisoformen (z.B. bei steigender Proteinbeladung der Säule) die Sammelzeiten der Fraktionen anzupassen.

### 3.4.3. Präparative Isolierung der Transferrinisoformen nach der für große Probenvolumina modifizierten HPLC- Methode nach Helander et al. (Kap. 2.4.2., S. 37)



**Abbildung 3.18.:** Chromatogrammverlauf Methode Helander et al. mit größerer Säule (Bettvolumen 14 ml) SOURCE 15Q PE 4.6/100, verlängertem Gradienten und erhöhter Probenaufgabe (Kap. 2.4.2., S.37).

3.4.4. Nachweis der isolierten Transferrinformen mit der Isoelektrischen Fokussierung (Kap. 2.4.3.,S. 38)



**Abbildung 3.19.:** Reinheitsnachweis der getrennten Fraktionen mit der Isoelektrischen Fokussierung (Kap. 2.4.3.,S. 38 ).

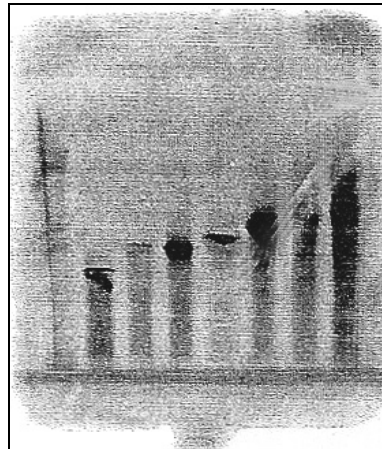
Gel 1: Bande 1 bis 8, von links nach rechts:

Ursprungsserum (Mischung 1:200), Asialotransferrin, Monosialotransferrin, Disialotransferrin, Trisialotransferrin, Tetrisialotransferrin (1:10 verdünnt), Pentasialotransferrin und Hexasialotransferrin

Gel 2: Zur übersichtlicheren Darstellung wurden die getrennten Fraktionen für die IEF verdünnt: Bande 1 bis 8, von links nach rechts:

Ursprungsserum (Verdünnung 1:200), Asialotransferrin (1:3), Monosialotransferrin (1:2), Disialotransferrin (1:6), Trisialotransferrin (1:3), Tetrisialotransferrin (1:20), Pentasialotransferrin (1:3) und Hexasialotransferrin (1:2)

3.4.5. Konzentrierung der Proben durch Membranfiltration und abschließender Nachweis der Isoferritine in der IEF



**Abbildung 3.20.:** Isoelektrische Fokussierung (Kap. 2.4.3., S. 38) der isolierten Transferrinisoformen eines hochpathologischen Serums nach Konzentrierung. Bande 1 bis 8, von links nach rechts: Ursprungsserum (Verdünnung 1:200), Asialotransferrin, Monosialotransferrin, Disialotransferrin, Trisialotransferrin, Tetrasialotransferrin, Pentasialotransferrin und Hexasialotransferrin

Die präparative Isolierung von Transferrinisoformen aus dem menschlichen Serum ist durch Modifizierung einer etablierten HPLC- Methode in effektiver Weise gelungen. Ein Nachweis konnte durch die Isoelektrische Fokussierung erbracht werden.

## 4. Diskussion

Trotz aktueller Schlagzeilen über den sinkenden Bierkonsum der Deutschen im Jahr 2007 [78] (laut Statistischem Bundesamt sei der Bierkonsum um 2,7% zum Vorjahr gefallen [72]), bleibt der Alkoholkonsum im Allgemeinen weiterhin auf hohem Niveau (10,1 Liter reiner Alkohol pro Kopf im Jahr 2006 [73]). Damit sei Deutschland in der europäischen Rangliste laut einem Zeitungsbericht der Rheinischen Post („Das Land der Dichter und Trinker“ vom 15.11.2007 [77]) im Jahr 2007 sogar auf Platz 1 gerutscht (Statistik für 2007 vom DHS noch nicht veröffentlicht [73]). Ein zunehmendes Problem ist auch der steigende und oft exzessive Alkoholkonsum bei Jugendlichen, wie die Fallzahlen der Krankenhäuser beweisen (laut dem Abendblatt sei die Zahl der wegen Alkoholvergiftung behandelten Jugendlichen im Zeitraum 2000 bis 2006 um 105 % gestiegen [66]). Somit bleibt Alkohol ein wichtiges wirtschaftliches und gesellschaftliches Thema in unserem Land. Durch die aufgeführten hohen Zahlen an riskantem Alkoholkonsum und Abhängigkeitssyndromen in Deutschland (Kap. 1.1., S.1) ist die Nachfrage nach einem geeigneten Laborparameter und dessen Nachweisverfahren aus klinischer und forensischer Sicht zeitlos aktuell.

Das CDT (*Carbohydrate deficient transferrin*) wird als der derzeit spezifischste Parameter in der Labordiagnostik des chronischen Alkoholmissbrauchs beschrieben [6,14,35,45], dem bisher kein allgemein akzeptiertes Referenz-Nachweisverfahren zugeordnet werden konnte [32,36,74]. Die *International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (IFCC)* beauftragte 2005 eine Arbeitsgruppe mit der Klärung der Frage nach dem Referenzverfahren [36,74].

Bis dahin wird die Hochleistungs- Flüssigkeitschromatographie, welche sich als besonders zuverlässiges Verfahren zur Bestimmung des CDT- Anteils in der labordiagnostischen Routineanalytik zur Diagnose und Verlaufskontrolle des chronisch erhöhten Alkoholkonsums erwiesen hat, vorwiegend eingesetzt [6,13,33,36]. Alle routinemäßig eingesetzten HPLC- Verfahren basieren auf dem gleichen Prinzip der Anionenaustausch- Chromatographie [37]. Während aber bei

laboreigenen Entwicklungen die Methode und ihre Details frei zugänglich sind [18, 33,49], ist dies bei kommerziellen Verfahren in der Regel nicht der Fall [71,76]. Um die Frage zu klären, ob verschiedene Modifikationen der Anionenaustausch-HPLC zur Bestimmung der CDT- Fraktion übereinstimmende oder signifikant differente Ergebnisse liefern, wurden verschiedene Methoden miteinander verglichen.

Auch die Frage der Herstellung von Referenzmaterial für die CDT- Messung mittels HPLC wurde bisher nicht geklärt und gehört ebenfalls zu dem Aufgabengebiet der Arbeitsgruppe der *IFCC* [36,74].

In der eigenen Arbeit wurde für eine laboreigene Herstellung geeigneter Standards und Qualitätskontrollproben für die HPLC- Analytik des CDT im Zentrallabor die HPLC- Methode nach Helander et al. [33] dahingehend modifiziert, dass eine präparative Isolierung der einzelnen Isoformen des Transferrins möglich wurde.

#### **4.1. HPLC- Methodenvergleich zur Bestimmung des CDT im menschlichen Serum**

##### 4.1.1. Vergleich einer kommerziellen (Fa. Recipe) und der laboreigenen HPLC- Methode (Zentrallabor UK S-H Campus Lübeck) zur Bestimmung des CDT

##### 4.1.2. Vergleich zweier kommerzieller Methoden (Fa. Recipe, Fa. Chromsystems) und der laboreigenen Methode (ZLCL) zur Bestimmung des CDT

##### Stellenwert der signifikanten Unterschiede zwischen den Ergebnissen dieser Methoden in der CDT- Bestimmung

Der Methodenvergleich zwischen dem kommerziellen Verfahren der Fa. Recipe [76] und der eigenen HPLC- Methode (ZLCL) [18,49] zeigte signifikante Unterschiede zwischen den an 141 Serumproben ermittelten CDT- Ergebnissen (s. Kap. 3.1., 3.1.3., S. 44/ S. 46).

Ebenso lieferte der Methodenvergleich zwischen den Verfahren von Recipe [76], von Chromsystems [71] und der eigenen Methode [18,49] signifikante

Unterschiede in den ermittelten CDT %- Ergebnissen von 51 Serumproben (s. Kap. 3.3., 3.3.3., S. 57/S. 61).

Um genauere Informationen über die Gründe dieser Unterschiede zu erlangen, wurden die Methoden in ihrer Durchführung begutachtet. Zudem wurde die Hypothese untersucht, ob die Art der Auswertung der Chromatogramme ein Grund für die Ergebnisunterschiede sei.

Die laboreigene HPLC- Methode trennt das menschliche Serumtransferrin in maximal sieben Isoformen auf (Asialotransferrin bis Hexasialotransferrin, Abb. 3.2. - 3.3., S. 48). Zu Beginn eines jeden Chromatogramms (Retentionszeit ca. 1 min) findet sich ein Injektionspeak, der nicht retentierte, bei 460 nm absorbierende Matrixbestandteile enthält. Asialotransferrin eluiert rasch von der Säule (Retentionsfaktor ca. 2.6), ist aber ausschließlich in pathologischen Proben zu finden. Monosialotransferrin (Retentionsfaktor ca. 7.2) tritt nur sehr selten in nachweisbaren Mengen auf und eluiert dann kurz vor der Disialotransferrin-Fraktion. Es folgen Disialotransferrin (Retentionsfaktor ca. 8.5) und Trisialotransferrin (Retentionsfaktor ca. 9.7), deren Peaks nicht völlig basisliniengetrennt werden, d.h. hier laufen kurzzeitig beide Fraktionen zusammen. Tetrasialotransferrin (Retentionsfaktor ca. 14.5) stellt den Peak mit der größten Fläche, gefolgt von Pentasialotransferrin (Retentionsfaktor ca. 16.0); auch diese beiden Peaks werden in der Regel nicht vollständig getrennt. Ein meist niedriger Hexasialotransferrin- Peak (Retentionsfaktor ca. 18.2) schließt das Spektrum der Isoformen ab, gefolgt von einem starken Anstieg der Absorption nach ca. 21 min, der durch den integrierten Spülschritt und die hierbei von der Säule eluierenden Substanzen verursacht wird. Bei Gesunden summieren sich die Peakflächen auf Werte um die 80 000 - 100 000 AU (absorbance units), was einer normalen Gesamttransferrin- Konzentration im Serum entspricht. Die Auswertung des Chromatogramms erfolgt mit der baseline- Integration nach der Flächenprozentmethode. Ein physiologischer CDT- Wert (Nichttrinker und soziale Trinker) wird bei diesem Verfahren mit <2,4 % angegeben, gefolgt von einem Graubereich bis 3,0 %. Darüber liegende Werte werden als Indiz für einen chronisch erhöhten Alkoholkonsum und damit als pathologisch bezeichnet.

Die Applikation der Recipe- Methode auf dem HPLC- System des Zentrallabors trennt Asialotransferrin bis Pentasialotransferrin, in manchen Proben auch Hexasialotransferrin auf (Abb. 3.2. - 3.3., S. 48). Der komplette Chromatographielauf einschließlich Spülschritt dauert etwa 13 Minuten. Die einzelnen Isotransferrine eluieren bei dieser schnellen Methode rasch hintereinander. Asialotransferrin wird länger auf der Säule retentiert als bei der Methode des ZLCL (Retentionsfaktor ca. 4.1) und eluiert erst kurz vor den übrigen Isoformen (Retentionsfaktoren Monosialotransferrin ca. 4.7 bis Hexasialotransferrin ca. 8.5). Eine Basislinientrennung der einzelnen Peaks und vor allem zwischen Disialo- und Trisialotransferrin wird auch hier nicht erreicht; dies wird mit steigendem CDT- Anteil deutlicher. Die Peakflächen ergeben Werte um die 40 000 - 50 000 AU. Die Auswertung erfolgt baseline für Asialo- bis Trisialotransferrin und valley-to-valley für Tetrasialo- und Pentasialotransferrin nach der Flächenprozentmethode. In der Testanleitung wird die obere Grenze des Normalbereichs mit 1,75 % CDT angegeben, gefolgt von einem kontrollpflichtigen Graubereich bis 2,5 % CDT. Darüber liegende Werte werden als pathologisch bezeichnet.

Die Applikation der Chromsystems- Methode [71] auf dem HPLC- System des Zentrallabors trennt Asialotransferrin bis Pentasialotransferrin, in einigen Proben zusätzlich Hexasialotransferrin auf (Abb. 3.13.-3.14., S. 58-59). Die Dauer des kompletten Chromatographielaufs einschließlich Spülschritt beträgt etwa 20 Minuten. Asialotransferrin wird mit einer Retentionszeit von ca. 3,4 Minuten von der Säule eluiert. Die Auftrennung insbesondere von Di- und Trisialotransferrin ist bei dieser Methode gut gelungen, die Peaks reichen zwischen den Isoformen fast bis auf die Basislinie (Retentionsfaktor ca. 6.6 und ca. 7.6). Eine vollständigere Auftrennung von Tetra- und Pentasialotransferrin hingegen wird auch mit der Chromsystems- Methode nicht erreicht (Retentionsfaktor ca. 9.9 und ca. 10.0). Bei dieser Methode tritt nach dem Pentasialotransferrin und kurz vor dem Beginn des Spülschrittes ein weiterer Peak auf. Der zusätzliche Peak eluiert ab ca. 10,5 Minuten von der Säule bei Proben mit hohem Transferringesamtgehalt. Bei Proben mit niedrigerem Transferringesamtgehalt findet man den Peak gegen Ende der 11. Minute mit einer geringen Gesamtfläche. Die Peakflächen (normale Proben) ergeben Werte um die 80 000 - 210 000 AU. Die Chromatogramme

wurden nach Vorschrift mit einer gemischten baseline/valley-to-valley- Auswertung nach der Flächenprozentmethode ausgewertet. CDT %- Werte unter 1,2 % gelten als physiologisch, zwischen 1,2 % und 2,6 % existiert ein Graubereich und Werte über 2,6 % werden als pathologisch bezeichnet.

Allein die Beschreibung der Methoden anhand der Chromatogramme zeigt erste Unterschiede auf. Sie betreffen die Frage, was überhaupt aufgetrennt wird (wird Hexasialotransferrin integriert oder nicht), wann die Isoformen von der Säule eluiert werden (Retentionszeiten), wie das Chromatogramm integriert wird (baseline/valley-to-valley oder baseline) und ab welchen CDT- Werten eine Pathologie definiert wird. Allen Methoden gleich ist die Schwierigkeit in der exakten Auftrennung von Disialo- und Trisialotransferrin (bei Chromsystems besser gelungen) sowie Tetrasialo- und Pentasialotransferrin.

In der Durchführung der Methoden (Kap. 2.4.1.1., 2.4.1.2., 2.4.1.3., S. 30/S. 31/ S. 34) kann man erkennen, dass Unterschiede vor allem in der Probenvorbereitung (Tab. 2.1., Tab. 2.3., S.30, S.32) existieren. Die Aufarbeitung des Serums geschieht bei der Methode Recipe mit fertigen Lösungen und mittels einer in den HPLC- Lauf integrierten Vorsäule. Dies bedeutet einen Organisationsvorteil gegenüber der manuellen Vorbereitung der Proben bei der ZLCL- und Chromsystems- Methode. Die Dauer der chromatographischen Trennung ist bei der Methode Recipe mit 13 Minuten deutlich kürzer als bei Chromsystems mit 20 Minuten und bei der ZLCL- Methode mit 32 Minuten. Dies ist für einen hohen Probendurchsatz einer Routinemethode von Vorteil [76]. Jedoch kommt es aufgrund der kurzen Analysezeit bei Recipe auch zu einem komprimierten Chromatogramm, die einzelnen Isoformen werden kurz hintereinander von der Säule gespült. Dies birgt die potentielle Gefahr einer schlechteren Auftrennung im Sinne des Zusammenlaufens verschiedener Transferrinformen. Den Analyseverlauf und das Chromatogramm betrachtend, erreicht Chromsystems bei einer relativ kurzen Methodendauer von 20 Minuten eine sehr gute Auftrennung von Di- und Trisialotransferrin im Chromatogramm fast bis zur Basislinie, zeigt aber im weiteren Verlauf keine bessere Trennung der Isoformen als andere Methoden.

Bei der Auftrennung der Transferrinvarianten mit dieser Methode ist ein zusätzlicher unbekannter Peak vorhanden, der sich in der Zeit des Auftretens abhängig von der Transferrinkonzentration zeigt. Je höher der Gehalt an Gesamttransferrin ist, desto näher befindet sich dieser Peak am davor verlaufenden Pentasialotransferrin- Peak, je kleiner der Gesamttransferringehalt, desto weiter weg verläuft der Peak vom Chromatogramm und desto näher gelangt er dem Spülschritt. Dieser Peak wird nicht in der Integration erfasst.

Die Präzisionsmessung mit dem Verfahren nach ZLCL und nach Recipe (Tab. 3.1., Tab. 3.3., S. 44/S. 45) zeigt deutlich, dass beide Methoden im physiologischen Serum (CDT- Anteil im unteren Konzentrationsbereich) mit VK-Werten über 10 % relativ unpräzise messen, während die Messung der pathologischen Probe mit beiden Methoden gute Präzisionen (Recipe VK < 5 %, ZLCL VK < 4 %) zeigt. Recipe gelangt zu einem kleineren Variationskoeffizient (12,7 %, bzw. 2,3 %) bei der Impräzision in der Serie (Tab. 3.1., S. 38) als ZLCL (15,8 %, bzw. 2,5 %), dies führen wir auf die unterschiedliche Probenbereitung zurück, die bei der Methode Recipe einen Organisationsvorteil durch die teilmechanisierte Handhabung bedeutet. Dank dieser vereinfachten Probenvorbereitung für die Bestimmung des CDT ist die Präzision der Ergebnisse der Recipe- Methode offenbar besser als die der ZLCL- Methode.

Bei der Betrachtung der deskriptiven Statistik des Methodenvergleichs Recipe und ZLCL (Tab. 3.4., S. 46) wird deutlich, dass die höchsten CDT %- Werte (Mittelwert 5,68 %) mit der Methode von Recipe und der im Protokoll geforderten gemischten Auswertung (baseline/valley-to-valley) erzielt werden. Bei genauerer Durchsicht der Zahlen ist dies besonders bei pathologischen CDT- Werten der Fall. Dies ist durch die unterschiedliche Auswertungsart der Methoden zu erklären. Beide Verfahren werten nach der Flächenprozentmethode aus. Jedoch ist bei einer durchgehenden baseline- Integration die Gesamtfläche aller Transferrinfraktionen, zu der der CDT- Anteil in Bezug gesetzt wird, größer als bei der gemischten baseline/valley-to-valley- Auswertung. Umgekehrt wird bei einer baseline/valley-to-valley- Integration eine kleinere Gesamtfläche durch Aussparen von Chromatogramm- Anteilen in Bezug zum CDT- Anteil gesetzt, bei dem durch baseline- Integration die vollständigen Peakflächen einbezogen werden. Dadurch

erklären sich die niedrigeren CDT %- Ergebnisse bei einer vollständigen baseline-Integration und die hohen Werte bei einer gemischten Auswertung vor allem im pathologischen Bereich.

Uns erscheint es nicht sinnvoll, einen Teil der gemessenen Absorption in der Auswertung des Chromatogramms auszusparen.

Dies wirkt sich auf die Untersuchungsergebnisse aus. In gleichen Proben liefern die unterschiedlichen HPLC- Verfahren statistisch signifikant unterschiedliche Ergebnisse, ermittelt mit dem Wilcoxon- Verfahren für gepaarte Proben (Tab. 3.2., S. 44).

Die Standardabweichung ( $\pm 7,234$ ) ist bei dem Recipe- Verfahren in der gemischten Auswertung ebenfalls am größten.

Die niedrigsten Werte werden mit der ZLCL- Methode ermittelt (Mittelwert 5,03 %), bei einer ebenfalls niedrigeren Standardabweichung ( $\pm 5,9865$ ). Nach Angleichung der Integrationsweise der Chromatogramme der Methode Recipe mit durchgehend baseline- Auswertung werden die erzielten CDT- Werte (Mittelwert 5,28 %; Tab. 3.6., S. 47) besonders im pathologischen Bereich deutlich geringer.

Die Ergebnisse zwischen den Methoden nähern sich nach Angleichung der Auswertungsart deutlich an.

Die Art der Integration der Chromatogramme scheint ein wichtiger Grund für die Ergebnisunterschiede zwischen den Methoden zu sein.

Nach statistischer Auswertung des Methodenvergleichs Recipe und ZLCL (Tab. 3.13., S. 54) mit dem Regressionsverfahren nach Passing und Bablok zeigt sich eine durchweg gute Korrelation der Methoden. Die Steigung der Regressionsgeraden nähert sich der Einheitslinie bei Angleichung der Auswertungsarten beider Methoden (baseline- Auswertung) von  $y = 1,21$  auf  $y = 1,12$  deutlich an. Es kommt zu einer Verringerung der Ergebnisunterschiede zwischen den Methoden. Dies sieht man auch an der Mittleren Differenz zwischen den Methoden, ermittelt mit dem Bland und Altman- Verfahren, die sich bei Angleichung der Auswertungsart von 0,6489 auf 0,2483 verkleinert. Allerdings zeigt der gepaarte t- Test auch nach Angleichung der Auswertungsart signifikante Unterschiede zwischen den Methoden (Tab.3.7., S.49). Dies spricht für einen weiteren relevanten Unterschied zwischen den Methoden, der nicht von der Auswertungsart abhängt und wahrscheinlich methodenspezifisch ist, d.h. hier

spielen Faktoren wie die Serumaufarbeitung, die nicht durchgehende Integration des Hexasialotransferrins in die Auftrennung, die verschiedenen Puffer und der Versuchsaufbau (Pufferlaufzeiten, Säule, Vorsäule, Spülung) eine Rolle.

Betrachtet man die deskriptive Statistik des Methodenvergleichs Recipe, Chromsystems und ZLCL (Tab. 3.15., S. 61), so zeigt sich, dass die absolute Differenz zwischen höchstem und niedrigstem Mittelwert der Methoden 1,12 % beträgt. Sowohl der höchste als auch der niedrigste Mittelwert wurden mit der gleichen Methode (Recipe) ermittelt, die mit den unterschiedlichen Auswertungsarten (baseline/valley-to-valley und valley-to-valley) bestimmt wurden. Hier ist allein die Integrationsweise für den deutlichen Ergebnisunterschied schon innerhalb einer Methode verantwortlich. Auffallend ist auch, dass die Mittelwerte aller Methoden bei einer baseline- Auswertung angeglichen werden.

Die Bedeutung der Integration des Chromatogramms als Grund für die Ergebnisunterschiede wird bestätigt durch die Betrachtung der Wahrscheinlichkeiten P im Methodenvergleich Recipe, Chromsystems, ZLCL (Tab. 3.16., 3.17., 3.18., S. 62-64), die in allen Vergleichen bei Auswertung der Methoden mit baseline- Integration einen hohen Wert (nicht signifikant unterschiedlich) erzielen. Dies bedeutet, dass die Differenz der Mittelwerte hier mit hoher Wahrscheinlichkeit gegen Null geht. Die Methoden werden bei Auswertung des Chromatogramms mit baseline- Integration deutlich angenähert, in den anderen Vergleichen wird fast durchgehend eine signifikante Unterschiedlichkeit der Ergebnisse ermittelt.

**Die Art der Integration des Chromatogramms wird als wichtigster Grund für die Ergebnisunterschiede zwischen den Methoden erkannt.**

Auch die Methode der Fa. Chromsystems, ausgewertet mit valley-to-valley und baseline/valley-to-valley zeigt einen hohen P- Wert im Vergleich. Dies ist durch den Chromatogrammverlauf zu erklären, der bei einer guten Auftrennung von Di- und Trisialotransferrin (Trennung bis fast auf die Basislinie) auch in der valley-to-valley- Integration automatisch im vorderen Chromatogrammbereich baseline

integriert wird und damit fast identische Ergebnisse ermittelt werden. Recipe und ZLCL in der gemischten Auswertung erfahren auch eine geringfügige Angleichung. Bei den anderen Methoden kann dies bei gemischter Auswertung nicht beobachtet werden.

Die Varianzen nehmen bei der gemischten Auswertungsart (baseline/valley-to-valley) in allen Methoden größere Werte an. Dies zeigt eine zunehmende Ungenauigkeit bei Verwendung dieser Auswertungsart.

Alle Verfahren erzielen mit der gemischten Auswertungsart die höchsten CDT %-Werte. Dieses Phänomen ist wiederum zu erklären durch Betrachtung der Chromatogramme mit den verschiedenen Auswertungsarten (Abb. 3.2., 3.3., S. 48; Abb. 3.13., 3.14., S. 58-59). Integriert man die für CDT relevanten Peaks baseline und den Rest des Chromatogramms valley-to-valley, so erhält man einen hohen Wert für CDT durch die baseline- Integration der CDT- Peaks bei niedriger Gesamtfläche des Transferrins. Nach der Flächenprozentmethode errechnet sich so ein hoher Wert. Die niedrigsten Werte erhält man methodenabhängig sowohl mit der valley-to-valley- als auch mit der baseline- Auswertung. Hier spielt sowohl der allgemeine Verlauf der Basislinie, die manuelle Bearbeitung am Computer bei valley-to-valley- Integration und die Genauigkeit der Methoden eine Rolle. Im Allgemeinen errechnet aber die durchgehende valley-to-valley- Integration bei kleinsten Flächen (CDT- Flächen und Transferrin- Gesamtfläche) die niedrigsten Ergebnisse.

Die Korrelationskoeffizienten aller Methoden sind im Vergleich sehr ähnlich, es existiert ein fast vollständig positiver linearer Zusammenhang. Die Auswertung der Ergebnisse der HPLC- Methode Recipe mit der valley-to-valley- Integration ergibt hier den niedrigsten Korrelationskoeffizienten, auch im errechneten Mittelwert scheint diese Methode im Vergleich mit einem auffallend niedrigen Wert besonders schlecht abzuschneiden. Bei dem kurzen Analyseverlauf (Stauchung des Chromatogramms) werden mit dieser Auswertungsart die Ergebnisse abweichend klein und damit sehr ungenau gemessen. Hier kann auch eine Rolle spielen, dass die valley-to-valley- Integration manuell am Computer nach individueller Einschätzung eine weitere Fehlerquelle birgt. Eine durchgehende Basislinie zu ziehen scheint weniger problematisch, hier spielen individuelle Unterschiede des Auswertens am Computer weniger eine Rolle.

Die Steigung der Regressionsgeraden ergibt besonders schlechte Ergebnisse beim Vergleich von Recipe valley-to-valley mit Recipe baseline/valley-to-valley (Tab. 3.17., S. 63), wie schon oben erwähnt sind dies die beiden Verfahren mit den höchsten und niedrigsten Werten. Auch der Vergleich von Recipe in der gemischten Auswertung mit ZLCL valley-to-valley erhält bei den ersichtlichen großen Ergebnisunterschieden einen schlechten Wert der Regressionsgeraden (Tab. 3.16., S. 62).

Vergleicht man die gleichen Methoden unterschiedlich ausgewertet miteinander, so ergeben sich signifikant unterschiedliche Ergebnisse. Auch dies unterstreicht den großen Einfluss der Auswertung auf die Ergebnisse.

Die Methode Recipe und die Methode Chromsystems fordern in ihren Arbeitsanleitungen die Auswertung der Chromatogramme nach der gemischten Methode. Wie oben bereits aufgeführt, erhält man mit dieser Auswertungsart die größte Varianz und die höchsten CDT %- Werte. Nach unseren Erkenntnissen ist diese Auswertungsart nicht optimal.

Bei Betrachtung aller Ergebnisse lässt sich folgendes zusammenfassend schlussfolgern:

CDT- Konzentrationen unterscheiden sich, wenn sie mit unterschiedlichen HPLC-Verfahren ermittelt werden. Die Integrationsweise des Chromatogramms in der Auswertung konnte als der Faktor erkannt werden, der in unseren Versuchsreihen die wichtigste Ursache für Ergebnisunterschiede darstellt. Es spielt eine wesentliche Rolle, ob das Chromatogramm „baseline“ oder „baseline/valley-to-valley“ ausgewertet wird.

Aber auch andere methodenabhängige Unterschiede erschweren die Vergleichbarkeit der Verfahren. Es zeigt sich, dass alle Methoden CDT % zwar erfahrungsgemäß zuverlässig bestimmen, aber die Verfahren an sich durchaus Punkte aufweisen, die verbesserungswürdig sind. Dazu zählt zum Beispiel die optimale Auftrennung der einzelnen Isoformen, die sich in allen untersuchten Methoden noch verbesserungswürdig zeigt. Auch sollten bei den Methoden die Fehlerquellen in der manuellen Serumaufarbeitung, sowie in der manuellen Auswertung des Chromatogramms am Computer minimiert werden. Hexasialotransferrin sollte in allen Methoden aufgetrennt werden und in die

Auswertung mit einbezogen werden. Die Methode der Fa. Chromsystems sollte den zusätzlich auftretenden Peak identifizieren und ggf. aus dem Chromatogramm eliminieren.

Damit wird aufgezeigt, wie bedeutend die Arbeit an einer Standardisierung der CDT- Messverfahren ist, da es immer wieder Vergleiche zwischen den Verfahren gibt [6,13,30], aber weder eine Festlegung auf eine Referenzmethode [36,74], noch eine einheitliche Handhabung zwischen den gleichen Methoden bisher stattgefunden hat (Kap. 2.4., S. 29).

Um die Harmonisierung der CDT- Analytik zu fördern und die methodenabhängige Variation der CDT- Konzentrationen bei unterschiedlichen HPLC- Methoden zu verringern, wird Bezug nehmend zu unseren gewonnenen Ergebnissen eine Standardisierung der Integrationsart empfohlen. Es sollte sich auf ein Integrationsverfahren geeinigt werden, da dies einen großen Beitrag zu einer Vereinheitlichung und Vergleichbarkeit der Methoden darstellt. Welches Verfahren hierzu gewählt werden sollte, beantworten die Untersuchungsergebnisse von selbst: Bei einer baseline- Auswertung gleichen sich alle Ergebnisse so an, dass keine signifikante Unterschiedlichkeit mehr besteht. Zudem ist die baseline- Auswertung die einfachste Auswertung, sie minimiert mögliche Fehler bei der manuellen Integration des Chromatogramms und falls es jemals die optimale Methode mit genauer Basislinienauftrennung aller Isoformen geben sollte, bleibt baseline die einzige Möglichkeit der Integration. Es ist fraglich, warum Chromatogrammanteile, die eindeutig photometrisch nachgewiesen wurden, aus der Wertung herausgenommen werden sollten, so wie das bei valley-to-valley- Integration der Fall ist. All dies sind eindeutige Gründe, um bei der Auswahl des Integrationsverfahrens für eine baseline- Auswertung zu plädieren. Der Vorschlag einer einheitlichen Auswertung der HPLC- Chromatogramme mittels Basislinien- Integration wurde auf einem Treffen mit Diagnostika- Herstellern 2005 am Rande der Medica in Düsseldorf diskutiert [82].

#### 4.1.3.CDT- Bestimmung mit seriell gemischten Proben zur Überprüfung, ob sich Präferenzen für eine Integrationsmethode ableiten lassen

Aufgrund der Feststellung in der Versuchsreihe 3.1. wurde in einem weiteren Versuch untersucht, inwieweit die Integration das Ergebnis der CDT %-Bestimmung beeinflusst. Dazu wurden jeweils zwei Proben mit bekanntem CDT %-Gehalt seriell gemischt und CDT % mit beiden Methoden bestimmt. Das daraus gemessene CDT % wurde dem aus dem Mischungsverhältnis der beiden Proben errechneten CDT % gegenübergestellt.

In einer Korrelationsanalyse ergab sich kein hinweisender Ergebnisunterschied bezüglich der Integrationsweise der Chromatogramme. Sowohl die Steigung der Regressionsgeraden als auch der Korrelationskoeffizient sind bei allen Auswertungsverfahren ähnlich und zeigen keine Tendenz hinsichtlich besserer Werte einer Integrationsart. Die mittlere Differenz aus den errechneten und den gemessenen CDT %-Werten zeigt geringere Werte bei der baseline- Auswertung, d.h. dass mit dieser Integrationsart besser der errechnete Sollwert erreicht wird (Tab. 3.15., S. 51). Dies spricht für eine Favorisierung der baseline- Integration, wobei hier sicherlich nur eine Tendenz ausgedrückt werden darf, da dieses Ergebnis auf wenigen Messungen mit 3 Serumgemischen beruht.

#### **4.2. Modifizierung einer etablierten HPLC- Methode zur präparativen Isolierung der Ladungsisoformen des Transferrins**

Eine einfache aber effiziente präparative Isolierung der einzelnen Transferrinfraktionen sollte zum einen für die Herstellung laboreigener Standards und Qualitätskontrollproben, zum anderen aufgrund einer externen Anfrage für Zwecke der Herstellung von Aglykan- spezifischen Antiseren [22] entwickelt werden.

Hierzu bot es sich an, auf eine etablierte HPLC- Methode zur Transferrinauftrennung zurückzugreifen. Es wurde die Methode nach Helander et al. [33] dazu ausgewählt, da bei dieser bewährten Methode das Säulenmaterial in loser Form kommerziell erhältlich ist und so in größere Säulen gefüllt werden kann. Eine Erweiterung des Verfahrens fand in zweierlei Hinsicht statt. Zunächst

wurde eine größere Säule verwendet, um möglichst viel Serum in einem Durchlauf auftrennen zu können. Dies gelang durch die Anpassung der Probenvorbereitung an die erhöhte Probenmenge und die Verlängerung der Pufferlaufzeiten und Spülzeiten (Kap. 2.4.2., S. 37). Im nächsten Schritt wurde ein Fraktionensammler verwendet, der nach genauer Programmierung unter Berücksichtigung der Schlauchdurchlaufzeit eingesetzt wurde, um zeitgenau die aufgetrennten Isoformen aufzufangen. Mit Hilfe der Isoelektrischen Fokussierung konnte die Reinheit der einzelnen Formen von Asialo- bis Hexasialotransferrin nachgewiesen werden (Kap. 2.4.3., S. 38). Eine anschließende Konzentrierung der Fraktionen durch wiederholte Membranfiltration unter Zentrifugation sorgte für ein Bereitstehen der Isoformen in ausreichender Konzentration (Kap. 2.1.2., S. 25).

Wie in der Isoelektrischen Fokussierung dargestellt, konnte das Transferrin aus dem menschlichen Serum eines alkoholabhängigen Patienten durch einfache aber effiziente Weiterentwicklung einer etablierten HPLC- Methode in reine Isoformen aufgetrennt und aufgefangen werden. Dazu konnten Transferrinfraktionen im Konzentrationsbereich von 400-700 µg gewonnen werden bei einer Reinheit von 95 % [22]. Aliquote der isolierten Ladungsisoformen des Transferrins wurden einem Diagnostika- Hersteller zur Verfügung gestellt. Die isolierten Isotransferrine wurden zur Austestung Aglykan- spezifischer Antiseren verwendet [22].

Die durch diese erweiterte HPLC- Methode gewonnenen Fraktionen können nun beispielsweise auch in einer weiteren Arbeit als Standards in der Qualitätskontrolle eingesetzt werden.

Somit ist die Weiterentwicklung einer etablierten Methode gelungen, die es ermöglicht, größere Mengen Transferrin in seine Isoformen zu trennen und gleichzeitig die getrennten Formen aufzufangen.

## 5. Zusammenfassung

In der Labordiagnostik und Therapiekontrolle des chronisch erhöhten Alkoholkonsums ist das Kohlenhydrat-defiziente Transferrin (CDT) eine etablierte Messgröße. Die Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC) an Anionenaustauscher-Säulen galt lange als Referenzmethode der CDT-Analytik, wird heute aber zunehmend auch in der Routineanalytik eingesetzt. Um die Frage zu klären, ob es signifikante Unterschiede zwischen den Ergebnissen verschiedener, in der Laborroutine verwendeter HPLC-Applikationen zur CDT-Bestimmung gibt und, falls ja, ob Möglichkeiten zur Harmonisierung dieser Analytik bestehen, wurden drei HPLC-Methoden (Fa. Chromsystems, Fa. Recipe und eine Eigenentwicklung) an großen Serenkollektiven mit unauffälligen und pathologischen CDT-Werten verglichen. Die Ergebnisse dieser Methodenvergleiche zeigten signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen HPLC-Verfahren, die sich auf Unterschiede in der Probenvorbereitung (manuell oder in den HPLC-Lauf integriert), vor allem aber auf die unterschiedliche Auswertung der Chromatogramme zurückführen ließen. Zwei Verfahren verlangen die Integration nach einem gemischten Verfahren, bei dem Asialo- bis Disialotransferrin baseline integriert werden, während die restlichen Transferrinfraktionen valley-to-valley ausgewertet werden; die 3. Methode verwendet durchgehend eine baseline-Auswertung. Wurden alle Chromatogramme einheitlich baseline integriert, ergab die statistische Auswertung eine deutlich bessere Übereinstimmung zwischen den Methoden. Nach unseren Erfahrungen würde eine einheitliche baseline-Integration wesentlich zur Harmonisierung der HPLC-basierten CDT-Analytik beitragen.

Zur Herstellung geeigneter Standards für die HPLC-Analytik des CDT wurde eine HPLC-Methode zur präparativen Isolierung der Isotransferrine aufgebaut. Asialo- bis Hexasialotransferrin wurden anhand des Chromatogramms fraktioniert aufgefangen, mittels isoelektrischer Fokussierung auf ihre Reinheit überprüft, durch Membranfiltration konzentriert und in mehr als 95 % reiner Form gewonnen. Ein Teil der aufgetrennten Isotransferrine wurde einem Hersteller von Labordiagnostika zur Austestung Glykan-spezifischer Transferrin-Antisera zur Verfügung gestellt.

Zusammenfassend wurden Möglichkeiten zur Harmonisierung der HPLC-Analytik des CDT geschaffen durch Identifizierung methodenabhängiger Unterschiede und der Herstellung isolierter, für Kontrollzwecke geeigneter Isotransferrine.

## 6. Literaturverzeichnis

- [1] Alkoholkonsum und alkoholbedingte Störungen in Deutschland.  
Schriftenreihe des Bundesministerium für Gesundheit Band 128, Nomos  
Verlag 2000
- [2] Anton RF, Dominick C, Bigelow M, Westby C: Comparison of Bio-Rad %CDT  
TIA and CDTEct as Laboratory Markers of Heavy Alcohol Use and their  
Relationships with  $\gamma$ -Glutamyltransferase. Clin Chem 47: 1769-1775 (2001)
- [3] Anttila P, Järvi K, Latvala J, Niemelä O: Method-dependent Characteristics of  
Carbohydrate-deficient transferrin measurements in the follow-up of  
alcoholics. Alcohol Alcohol 39: 59-63 (2004)
- [4] Aradottir S, Asanovska G, Gjerss S, Hansson P, Alling C:  
Phosphatidylethanol concentrations in blood are correlated to reported  
alcohol intake in alcohol- dependent patients.  
Alcohol Alcohol 41: 431-437 (2006)
- [5] Aradottir S, Olsson BL: Methodological modifications on quantification of  
phosphatidylethanol in blood from humans abusing alcohol, using high-  
performance liquid chromatography and evaporative light scattering  
detection. BMC Biochem 6: 18 (2005)
- [6] Arndt T: Carbohydrate-deficient-Transferrin as a Marker of Chronic Alcohol  
Abuse: A critical Review of Preanalysis, Analysis and Interpretation.  
Clin Chem 47: 113-27 (2001)
- [7] Arndt T: Asialotransferrin- an alternative to carbohydrate-deficient transferrin?  
Clin Chem 49: 1022-1023 (2003)
- [8] Arndt T, Gressner M, Kropf J: Labordiagnostik und Kontrolle des  
Alkoholabusus- ein Plädoyer für das CDT. Med Welt 45: 247-257 (1994)
- [9] Arndt T, Hackler R, Kleine TO, Gressner AM: Validation by isoelectric  
Focusing of the anion-exchange isotransferrin fractionation Step involved in  
determination of carbohydrate-deficient-transferrin by CDTEct assay.  
Clin Chem 44: 27-34 (1998)

- [10] Bergström JP, Helander A: Influence of alcohol use, ethnicity, age, gender, BMI and smoking on the serum transferrin glycoform pattern: Implications for use of carbohydrate-deficient transferrin (CDT) as alcohol biomarker. *Clin Chim Acta.* 388: 59-67 (2008)
- [11] Bicker W, Lämmerhofer M, Keller T, Schuhmacher R, Krska R, Lindner W: Validated method for the determination of the ethanol consumption markers Ethyl glucuronide, ethyl phosphate, and ethyl sulphate in human urine by reversed-phase/ weak anion exchange liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Chem* 78: 5884-92 (2006)
- [12] Bortolotti F, De Paoli G, Pascali JP, Tagliaro F: Fully automated analysis of Carbohydrate-deficient transferrin (CDT) by using a multicapillary Electrophoresis system. *Clin Chim Acta* 380: 4-7 (2007)
- [13] Bortolotti F, De Paoli G, Pascali JP, Trevisan MT, Floreani M, Tagliaro F: Analysis of Carbohydrate-deficient transferrin: Comparative Evaluation of Turbidimetric Immunoassay, Capillary Zone Electrophoresis and HPLC. *Clin Chem* 51: 2368-2371(2005)
- [14] Bortolotti F, De Paoli G, Tagliaro F: Carbohydrate-deficient transferrin as marker of alcohol abuse: A critical review of the literature 2001-2005. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 841: 96-109 (2006)
- [15] Borucki K, Schreiner R, Dierkes J, Jachau K, Krause D, Westphal S, Wurst FM, Luley C, Schmidt-Gayk H: Detection of recent ethanol intake with new markers: comparison of fatty acid ethyl esters in serum and of ethyl glucuronide and the ratio of 5-hydroxytryptophol to 5-hydroxyindole acetic acid in urine. *Alcohol Clin Exp Res.* 29: 781-7 (2005)
- [16] de Jong G, van Dijk JP, van Eijk HG: The biology of transferrin. *Clin Chim Acta* 190: 1-46 (1990)
- [17] Delanghe JR, Helander A, Wielders JP, Pekelharing JM, Roth HJ, Schellenberg F, Born C, Yagmur E, Gentzer W, Althaus H: Development and multicenter evaluation of the N latex CDT direct immunonephelometric assay for serum carbohydrate-deficient transferrin. *Clin Chem* 53: 1115-21 (2007)
- [18] Dibbelt L: Does trisialo transferrin provide valuable information for the laboratory diagnosis of chronically increased alcohol consumption by determination of carbohydrate-deficient transferrin? *Clin Chem* 46: 1203-1205 (2000)

- [19] Dilling H, Mombour W, Schmidt M H, Schulte-Markwort E: Internationale Klassifikation psychischer Störungen- ICD-10 Kapitel V (F) Forschungskriterien. Verlag Hans Huber, Bern-Göttingen-Toronto-Seattle 1994
- [20] Dresen S, Weinmann W, Wurst FM: Forensic confirmatory analysis of ethyl sulfate- a new marker for alcohol consumption- by liquid- chromatography/ electrospray ionization/ tandem mass spectrometry. J Am Soc Mass Spectrom 15: 1644-8 (2004)
- [21] Eriksson CJ, Fukunaga T: Human blood acetaldehyde. Alcohol Alcohol Suppl. 2: 9-25 (1993)
- [22] Göpfert: persönl. Mitteilung; Herstellung von Antipeptid- Antikörpern gegen Asialo- Transferrin bzw. gegen Disialo- Transferrin. Biodiagnostics GmbH (2006)
- [23] Golka K, Sondermann R, Reich SE, Wiese A: Carbohydrate-deficient transferrin (CDT) as a biomarker in persons suspected of alcohol abuse. Toxicol Lett 151: 235-41(2004)
- [24] Greiling H, Gessner AM: Lehrbuch der klinischen Chemie und Pathobiochemie. 3. Auflage, 588-590, Schattauer-Verlag, Stuttgart, New York 1995
- [25] Hackler R, Arndt T, Helwig-Rolig A, Kropf J, Steinmetz A, Schaefer J R: Investigation by isoelectric focusing of the initial carbohydrate-deficient-transferrin (CDT) and non-CDT transferrin isoform fractionation step involved in determination of CDT by the ChronAlcol.D. assay. Clin Chem 46:483-492 (2000)
- [26] Hanke, M. und John, U.: Tabak- oder alkohol-attributable stationäre Behandlungen. Deutsche Medizinische Wochenschrift, 128: 1387-90 (2003)
- [27] Hartmann S, Aradottir S, Graf M, Wiesbeck G, Lesch O, Ramskogler K, Wolfersdorf M, Alling C, Wurst FM: Phosphatidylethanol as a sensitive and specific biomarker: comparison with gamma-glutamyl transpeptidase, mean corpuscular volume and carbohydrate-deficient transferrin. Addict Biol 12: 81-84 (2007)

- [28] Heegard NH, Hagerup M, Thomson C, Heegard PMH:  
Concavalin A crossed affinity immunoelectrophoresis and image analysis for semiquantitative evaluation of microheterogeneity profiles of human serum transferrin from alcoholics and normal individuals.  
Electrophoresis 10: 836-840 (1989)
- [29] Helander A, Beck O: Ethyl sulfate: a metabolite of ethanol in humans and potential biomarker of acute alcohol intake. J Anal Toxicol 29: 270-4 (2005)
- [30] Helander A, Bergström J P: Determination of carbohydrate-deficient transferrin in human serum using the Bio-Rad % CDT by HPLC test.  
Clin Chim Acta 371: 187-90 (2006)
- [31] Helander A, Eriksson G, Stibler H, Jeppsson JO: Interference of Transferrin Isoform Types with Carbohydrate-deficient Transferrin Quantification in the Identification of Alcohol Abuse. Clin Chem 47: 1225-1233 (2001)
- [32] Helander A, Fors M, Zakrisson B: Study of Axis Shield new % CDT Immunoassay for Quantification of Carbohydrate-Deficient Transferrin (CDT) in Serum. Alcohol Alcohol 36: 406-412 (2001)
- [33] Helander A, Husa A, Jeppsson JO: Improved HPLC method for carbohydrate-deficient transferrin in serum. Clin Chem 49: 1881-1890 (2003)
- [34] Herold G und Mitarbeiter: Innere Medizin. Chronische Pankreatitis. 423-425, Ausgabe 2004, Köln  
Akute Pankreatitis. In: Gerd Herold und Mitarbeiter: Innere Medizin. 419-423, Ausgabe 2004, Köln  
Leberzirrhose. In: Gerd Herold und Mitarbeiter: Innere Medizin. 463-465, Ausgabe 2004, Köln  
Ösophaguskarzinom. In: Gerd Herold und Mitarbeiter: Innere Medizin. 366-368, Ausgabe 2004, Köln
- [35] Hock B, Schwarz M, Domke I, Grunert VP, Wuertemberger M, Schiemann U, Horster S, Limmer C, Stecker G, Soyka M: Validity of carbohydrate-deficient transferrin ( % CDT), gamma-glutamyltransferase ( gamma-GT) and mean corpuscular erythrocyte volume (MCV) as biomarkers for chronic alcohol abuse: a study in patients with alcohol dependence and liver disorders of non-alcoholic and alcoholic origin. Addiction 100: 1477-86 (2005)

- [36] Jeppsson JO, Arndt T, Schellenberg F, Wielders JP, Anton RF, Whitfield JB, Helander A: Toward standardization of carbohydrate-deficient transferrin (CDT) measurements: I. Analyte definition and proposal of a candidate reference method. *Clin Chem Lab Med* 45: 558-62 (2007)
- [37] Jeppsson JO, Kristensson H, Fimiani C: Carbohydrate-deficient transferrin quantified by HPLC to determine heavy consumption of alcohol. *Clin Chem* 39: 2115-2120 (1993)
- [38] Kaphalia BS, Cai P, Khan MF, Okorodudu AO, Ansari GA: Fatty acid ethyl esters: markers of alcohol abuse and alcoholism. *Alcohol* 34:151-8. (2004)
- [39] Keating J, Cheung C, Peters T J, Sherwood R A: Carbohydrate-deficient transferrin in the assessment of alcohol misuse: Absolute or relative measurements? A comparison of two methods with regard to total transferrin concentration. *Clin Chim Acta* 272: 159-169 (1998)
- [40] Kozutsumi D, Arita M, Kawashima A, Adachi M, Takami M: An improved method for acetaldehyde determination in blood by high- performance liquid chromatography and solid-phase extraction. *J Chromatogr Sci* 40: 477-82 (2002)
- [41] Le Go PM : Le depistage precoce de l'alcoolisme. *Presse Med* 76 :578-80 (1968)
- Le Go PM : Le Depistage Precoce et Systematique du Buveur Excessif. Paris : Departement d'Alcologie Therapeutique de Rion-Laboratories 1976
- [42] Legros F J, Nuyens V, Minet E, Emonts P, Boudjeltia K Z, Courbe A, Ruelle J L, Colicis J, de Escaille F, Henry J P: Carbohydrate-deficient transferrin isoforms measured by capillary zone electrophoresis for detection of alcohol abuse. *Clin Chem* 48: 2177-2186 (2002)
- [43] Lipkowski M, Dibbelt L, Seyfarth M: Is there an analytical or diagnostic advantage from including trisialo transferrin into the fraction of carbohydrate-deficient transferrin? Lessons from a comparison of two commercial turbidimetric immunoassays with carbohydrate-deficient transferrin determination by high-performance liquid chromatography. *Clin Biochem* 33: 635-41 (2000)
- [44] McCarver-May DG, Durisin L: An accurate, automated, simultaneous gas chromatographic headspace measurement of whole blood ethanol and acetaldehyde for human in vivo studies. *J Anal Toxicol* 21: 134-41 (1997)

- [45] Niemelä O: Biomarkers in alcoholism. *Clin Chim Acta* 377: 39-49 (2007)
- [46] Passing H, Bablok W: A new Biometrical Procedure for Testing the Equality of Measurements from two Different Analytical Methods. *J Clin Chem Clin Biochem* 21: 709-720 (1993)
- [47] Passing H, Bablok W: Comparison of Several Regression Procedures for Method Comparison Studies and Determination of Sample Sizes. *J Clin Chem Clin Biochem* 22: 431-445 (1984)
- [48] Pschyrembel: Klinisches Wörterbuch. Alkoholabusus, Alkoholismus, Alkoholkrankheit. Ausgabe 258, 40-41, Walter de Gruyter, Berlin 1998
- [49] Renner F, Kanitz RD: Quantification of carbohydrate-deficient transferrin by ion-exchange chromatography with an enzymatically prepared calibrator. *Clin Chem* 43:485-490 (1997)
- [50] Rinck D, Frieling H, Freitag A, Hillemacher T, Bayerlein K, Kornhuber J, Bleich S: Combinations of carbohydrate-deficient transferrin, mean corpuscular erythrocyte volume, gamma-glutamyltransferase, homocysteine and folate oncrease the significance of biological markers in alcohol dependent patients. *Drug Alcohol Depend* 89: 60-5 (2007)
- [51] Salaspuro M: Carbohydrate-deficient-transferrin as compared to other markers of alcoholism: a systematic review. *Alcohol* 19: 261-271 (1999)
- [52] Saß H, Wittchen H-U, Zaudig M: Diagnostisches und Statistisches Manual Psychischer Störungen DSM-IV. Hogrefe, Göttingen-Bern-Toronto-Seattle-1998
- [53] Schellenberg F, Girre C, Nalpas B, Plat A, Tome A, Pages JC: Analytical evaluation of a new capillary electrophoresis method for carbohydrate-deficient transferrin measurement. *Clin Chim Acta* 382: 48-53 (2007)
- [54] Schwan R, Loiseaux MN, Schellenberg F, Albuissou E, Favre JD, Riquaud A Llorca PM, Gillet C, Reynaud M: Multicenter Validation Study of the % CDT TIA Kit in Alcohol Abuse and Alcohol Dependence. *Alcohol Clin Exp Res* 28: 1331-1337 (2004)
- [55] Sharpe PC: Biochemical detection and monitoring of alcohol abuse and abstinence. From the Department of Clinical Biochemistry, Craigavon Area Hospital, Craigavon BT63 5QQ, UK

- [56] Soyka M, Koller G: Klassifikation von Missbrauch und Abhängigkeit: Diagnostik aus psychiatrischer Sicht. In: Soyka M: Klinische Alkoholismusdiagnostik. 52-79, Darmstadt: Steinkopff Verlag 1999
- Wetterling T: Wertigkeit von Fragebogentests und biologischen Markern in der Alkoholismusdiagnostik. In: Soyka M: Klinische Alkoholismusdiagnostik. 40-51, Darmstadt: Steinkopff Verlag 1999
- [57] Stibler H: Carbohydrate-deficient transferrin in serum: a new marker of potentially harmful alcohol consumption reviewed. Clin Chem 37: 2029-2037 (1991)
- [58] Strahler JR, Rosenblum BB, Hanash S, Butkunas R: Separation of Transferrin Types in Human Plasma by Anion-Exchange High-Performance Liquid. Chromatography. J Chromatogr 266: 281-291 (1983)
- [59] Walter H, Hertling I, Benda N, König B: Sensitivity and specificity of carbohydrate-deficient transferrin in drinking experiments and different patients. Alcohol 25: 189-194 (2001)
- [60] Wurst FM, Metzger J: The ethanol conjugate ethyl glucuronide is a useful marker of recent alcohol consumption. Alcohol Clin Exp Res 26: 1114-9 (2002)
- [61] Wuyts B, Delanghe J R: The Analysis of Carbohydrate-Deficient Transferrin, Marker of Chronic Alcoholism, Using Capillary Electrophoresis. Clin Chem Lab Med 41: 739-746 (2003)
- [62] Wuyts, Delanghe JR, Kasavosve I, Gordeuk VR, Gangaidzo IT, Gomo ZA: Carbohydrate-deficient transferrin and chronic alcohol ingestion in subjects with transferrin CD- variants. Clin Chem Lab Med 39: 937-43 (2001)
- [63] Xin J, Lasker JM, Lieber CS: Serum carbohydrate-deficient transferrin mechanism of increase after alcohol intake. Hepatology 22: 1462-1468 (1995)
- [64] Yoshikawa K, Umetsu K, Shinzawa H , Yuasa I, Maruyama K, Ohkura T, Yamashita K, Suzuki T: Determination of carbohydrate-deficient transferrin separated by lectin affinity chromatography for detecting chronic alcohol abuse. FEBS Letters 458 112-116 (1999)
- [65] Zink M, Tröger HD, Zink P: Über den Einfluß der Ethanolabbau-Kinetik (nullte Ordnung oder Michaelis-Menten) auf den Verlauf der Blutalkoholkurve. Blutalkohol 34: 413-426 (1997)

**Internetrecherche:**

- [66] [www.abendblatt.de/daten/2008/01/30/841981.html](http://www.abendblatt.de/daten/2008/01/30/841981.html) (letzter Tag des Zugriffs 31.01.2008)
- [67] [www.alkoholsucht.btonline.de](http://www.alkoholsucht.btonline.de) (letzter Tag des Zugriffs 30.12.2007)
- [68] [www.arbeit-und-gesundheit.de/files/4/spezial5\\_02.pdf](http://www.arbeit-und-gesundheit.de/files/4/spezial5_02.pdf)  
[www.drogen-aufklaerung.de/texte/sachtext/sucht05\\_kn.htm](http://www.drogen-aufklaerung.de/texte/sachtext/sucht05_kn.htm) (letzter Tag des Zugriffs 17.11.2007)
- [69] [www.axis-shield.com/product/94/productdetailpage](http://www.axis-shield.com/product/94/productdetailpage) (letzter Tag des Zugriffs 29.06.2007)
- [70] [www.biorad.com](http://www.biorad.com) (letzter Tag des Zugriffs 27.06.2007)
- [71] [www.chromsystems.de](http://www.chromsystems.de) (letzter Tag des Zugriffs 27.06.2007)
- [72] [www.destatis.de](http://www.destatis.de), Statistisches Bundesamt Deutschland (letzter Tag des Zugriffs 30.01.2008)
- [73] [www.dhs.de](http://www.dhs.de), „PDF-Datei Jahrbuch Sucht 2008“, „Empfehlung des wissenschaftlichen Kuratoriums der DHS zu Grenzwerten für den Konsum alkoholischer Getränke“ (letzter Tag des Zugriffs 01.06.2008)
- [74] [www.ifcc.org](http://www.ifcc.org)  
[www.ifcc.org/index.php?option=com\\_content&task=view&id=367&Itemid=196](http://www.ifcc.org/index.php?option=com_content&task=view&id=367&Itemid=196)  
(letzter Tag des Zugriffs 30.03.2008)
- [75] [www.pharmchem.tu-bs.de](http://www.pharmchem.tu-bs.de) (letzter Tag des Zugriffs 27.10.2007)
- [76] [www.recipe.de/rep\\_d.htm](http://www.recipe.de/rep_d.htm)  
[www.recipe.de/p21100.htm](http://www.recipe.de/p21100.htm) (letzter Tag des Zugriffs 27.03.2008)
- [77] [www.rp-online.de/public/article/aktuelles/wissen/gesundheit/499684](http://www.rp-online.de/public/article/aktuelles/wissen/gesundheit/499684) (letzter Tag des Zugriffs 01.02.2008)
- [78] [www.spiegel.de/wirtschaft/0,1518,531696,00.html](http://www.spiegel.de/wirtschaft/0,1518,531696,00.html) (letzter Tag des Zugriffs 01.02.2008)
- [79] [www.uni-heidelberg.de](http://www.uni-heidelberg.de) (letzter Tag des Zugriffs 15.10.2007)
- [80] [www.wikipedia.org/wiki/Isoeletrische\\_Fokussierung](http://www.wikipedia.org/wiki/Isoeletrische_Fokussierung) (letzter Tag des Zugriffs 10.02.2008)
- [81] [www.wissen.de](http://www.wissen.de) (letzter Tag des Zugriffs 01.10.2008)
- [82] Medica, Medizinmesse in Düsseldorf, 16.11.- 19.11. 2005

## 7. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1. :	Mikroheterogenität des menschlichen Transferrins.....	16
Abb. 1.2. :	Typische Glykankettenstrukturen des Transferrins.....	17
Abb. 1.3. :	Vereinfachte Darstellung des Transferrins mit distinkten Glykanstrukturen und unterschiedlicher Eisenbeladung.....	18
Abb. 1.4. :	HPLC- Isotransferrin- Muster bei Abstinenz und bei chronisch erhöhtem Alkoholkonsum.....	21
Abb. 2.1.:	Analyseverlauf der HPLC- Methode Recipe.....	33
Abb. 3.1.:	Passing und Bablok Regressionsanalyse.....	46
Abb. 3. 2.:	Vergleich der Integrationsmethoden am Chromatogramm einer normalen Serumprobe.....	48
Abb. 3.3.:	Chromatogramme und Ergebnisse der normalen Serumprobe aus Abb.3.2. nach gleicher Auswertung beider Verfahren (baseline- Integration).....	48
Abb. 3.4.:	Passing Bablok Regressionsanalyse ZLCL und Recipe mit gleicher Integrationsweise.....	49
Abb 3.5.:	Passing Bablok Regressionsanalyse Recipe in unterschiedlichen Auswertungen.....	50
Abb. 3.6.:	Bland- Altman Plot Methoden ZLCL und Recipe.....	52
Abb. 3.7.:	Bland- Altman Plot Methoden ZLCL und Recipe nach einheitlicher Auswertung.....	53
Abb. 3.8.:	Bland- Altman Plot Methode Recipe in unterschiedlichen Auswertungen.....	54
Abb.3.9.:	Darstellung der in 3 Messreihen an seriell gemischten Proben mit der HPLC- Methode ZLCL erhaltenen CDT %- Ergebnisse..	55
Abb. 3.10.:	Darstellung der in 3 Messreihen an seriell gemischten Proben mit der HPLC- Methode ZLCL vtv erhaltenen CDT %- Ergebnisse.....	56
Abb. 3.11.:	Darstellung der in 3 Messreihen an seriell gemischten Proben mit der HPLC- Methode Recipe vtv erhaltenen CDT %-	

	Ergebnisse.....	56
Abb. 3.12.:	Darstellung der in 3 Messreihen an seriell gemischten Proben mit der HPLC- Methode Recipe bs erhaltenen CDT %- Ergebnisse.....	56
Abb. 3.13.:	Chromatogramme einer physiologischen Probe (Chromsystems, Recipe, ZLCL).....	58
Abb. 3.14.:	Chromatogramme einer pathologischen Probe (Chromsystems, Recipe, ZLCL).....	59
Abb. 3.15.:	Chromatogramme einer pathologischen Probe (Methode Helander).....	60
Abb. 3.16.:	Chromatogramm einer pathologischen Probe Methode ZLCL, Retentionszeiten- Bestimmung.....	66
Abb. 3.17.:	Isoelektrische Fokussierung, Fraktionen aus der Auftrennung...	67
Abb. 3.18.:	Chromatogrammverlauf modifizierte Methode Helander.....	68
Abb. 3.19.:	Reinheitsnachweis der getrennten Fraktionen mit der Isoelektrischen Fokussierung.....	69
Abb. 3.20.:	Isoelektrische Fokussierung der isolierten Transferrinisoformen	70

## 8. Tabellenverzeichnis

Tab. 1.1.:	Kriterien für Alkoholabhängigkeit nach DSM-IV und ICD- 10.....	10
Tab. 2.1.:	Serumaufarbeitung der HPLC- Methode nach ZLCL.....	30
Tab. 2.2.:	Pump Table HPLC- Methode ZLCL.....	31
Tab. 2.3.:	Serumaufarbeitung der HPLC- Methode Recipe.....	32
Tab. 2.4.:	Pump Table HPLC- Methode Recipe.....	32
Tab. 2.5.:	Serumaufarbeitung der HPLC- Methode nach Chromsystems.....	34
Tab. 2.6.:	Pump Table HPLC- Methode Chromsystems.....	35
Tab. 2.7.:	Serumaufarbeitung der HPLC- Methode nach Helander.....	36
Tab. 2.8.:	Pump Table HPLC- Methode Helander.....	36
Tab. 2.9.:	Serumaufarbeitung der HPLC- Methode nach Helander modifiziert.....	37
Tab. 2.10.:	Pump Table HPLC- Methode Helander modifiziert.....	38
Tab. 2.11.:	Serumaufarbeitung für die Isoelektrischen Fokussierung.....	38
Tab. 2.12.:	Methode der Isoelektrischen Fokussierung.....	39
Tab. 2.13.:	Silberfärbung Methode „Sensitive Silver Staining.....	40
Tab. 2.14.:	Mischungsverhältnis Methodenvergleich.....	42
Tab. 3.1.:	Impräzision in der Serie.....	44
Tab. 3.2.:	Impräzision in der Serie, Wilcoxon- Test.....	44
Tab. 3.3.:	Impräzision von Lauf zu Lauf.....	45
Tab. 3.4.:	Deskriptive Statistik des Methodenvergleiches.....	46
Tab. 3.5.:	Gepaarter t- Test Ergebnisse Methoden ZLCL und Recipe.....	47
Tab. 3.6.:	Deskriptive Statistik des Methodenvergleiches nach einheitlicher baseline- Auswertung.....	47
Tab. 3.7.:	Gepaarter t- Test der Ergebnisse Methoden ZLCL und Recipe nach einheitlicher Auswertung.....	49
Tab. 3.8.:	Deskriptive Statistik des Methodenvergleiches.....	50
Tab. 3.9.:	Gepaarter t- Test Ergebnisse Methode Recipe in unterschiedlicher Auswertung.....	51

Tab. 3.10.:	Statistische Kennzahlen des Vergleichs Methode ZLCL und Recipe.....	51
Tab. 3.11.:	Statistische Kennzahlen des Vergleichs Methode ZLCL und Recipe nach einheitlicher Auswertung.....	52
Tab. 3.12.:	Statistische Kennzahlen des Vergleichs Methode Recipe in unterschiedlicher Auswertung.....	53
Tab. 3.13.:	Zusammenfassende Darstellung der Untersuchungsergebnisse des Methodenvergleichs.....	54
Tab. 3.14.:	Vergleiche der Steigung $y$ der Regressionsgeraden und der Korrelationskoeffizienten $R^2$ der einzelnen Methoden.....	57
Tab. 3.15.:	Darstellung der deskriptiven Statistik des Methoden- und Auswertungsvergleichs (ZLCL, Recipe, Chromsystems).....	61
Tab. 3.16.:	Zusammenfassende Darstellung der Untersuchungsergebnisse des Methodenvergleiches Recipe versus ZLCL (alle Auswertungsarten).....	62
Tab. 3.17.:	Zusammenfassende Darstellung der Untersuchungsergebnisse des Methodenvergleiches Chromsystems versus Recipe.....	63
Tab. 3.18.:	Zusammenfassende Darstellung der Untersuchungsergebnisse des Methodenvergleiches Chromsystems versus ZLCL.....	64

## 9. Anhang

Tabelle: CDT %- Messergebnisse aus dem Methodenvergleich ZLCL versus Recipe an 141 Serumproben,  
Vergleich der CDT %- Ergebnisse ermittelt mit dem Recipe- Verfahren nach unterschiedlicher  
Integration (bs, bs/vtv) an 157 Serumproben

Probe N= 141	CDT % ZLCL baseline (bs)	CDT % Recipe baseline/valley-to-valley (bs/vtv)	CDT % Recipe baseline (bs)
1	1,163	1,277	1,43
2	1,37	1,127	1,16
3	0,917	0,528	0,89
4	1,019	1,082	0,98
5	1,239	0,754	1,03
6	1,254	1,044	1,04
7	1,276	0,858	1,19
8	1,419	1,29	1,36
9	0,802	0,451	0,54
10	1,382	1,1	1,3
11	1,531	0,999	1,28
12	1,339	1,208	1,19
13	1,342	1,041	1,08
14	2,437	2,139	2,24
15	1,161	1,149	1,34
16	1,094	0,974	1,28
17	3,223	3,392	3,65
18	1,235	0,694	1,05
19	1,114	0,781	0,94
20	1,016	0,669	0,85
21	1,115	1,082	0,91
22	0,93	0,761	0,72
23	0,863	0,671	1,06
24	1,377	1,164	1,16
25	0,368	0,66	0,23
26	1,155	0,792	0,74
27	1,621	1,435	1,34
28	1,977	1,424	1,33
29	1,019	1,058	0,98
30	1,955	1,953	1,93
31	1,416	1,512	1,11
32	1,608	1,609	1,17
33	1,01	0,982	0,76
34	1,276	0,857	0,58
35	1,901	1,792	1,82
36	1,199	0,283	0,55
37	1,417	1,374	1,14
38	1,233	0,874	0,71
39	1,458	0,733	0,78
40	1,01	0,613	0,7
41	1,406	0,916	0,81
42	1,271	0,585	0,56
43	7,759	9,604	8,37
44	1,388	1,052	1
45	5,881	6,181	5,59
46	16,293	19,842	18,12
47	6,271	6,867	6,53
48	0,933	0,587	0,42

49	0,729	0,846	0,59
50	0,217	0,337	0,19
51	1,041	0,937	0,63
52	3,482	6,582	3,32
53	27,483	31,596	30,04
54	0,655	1,386	0,57
55	0,869	1,725	0,69
56	3,539	4,683	2,47
57	0,942	0,783	0,65
58	1,144	0,38	0,28
59	2,037	1,309	1,24
60	1,319	1,049	1
61	1,258	0,729	0,68
62	1,472	0,777	0,71
63	1,611	1,236	1,21
64	0,986	1,249	1,08
65	1,127	1,251	1,15
66	1,307	1,095	0,98
67	1,782	1,651	1,57
68	1,123	1,14	1,09
69	1,335	1,055	0,98
70	1,241	0,967	0,96
71	1,196	0,962	0,89
72	1,214	0,746	0,7
73	1,25	1,314	1,19
74	1,282	0,97	1,02
75	2,694	2,57	2,45
76	1,95	1,73	1,85
77	1,065	0,941	0,9
78	1,317	1,155	1,08
79	0,949	1,078	0,97
80	1,195	0,675	0,47
81	1,263	1,246	1,15
82	1,758	1,716	1,64
83	1,231	1,365	1,41
84	7,787	9,494	8,9
85	9,088	11,006	10,47
86	1,208	1,142	1,02
87	0,946	1,049	0,85
88	1,5	1,182	1,06
89	6,379	9,055	8,65
90	7,61	8,713	7,05
91	12,678	16,59	14,54
92	9,193	10,815	10,27
93	23,981	28,027	26,55
94	19,834	22,865	20,84
95	7,977	8,206	7,93
96	21,047	24,904	23,32
97	14,189	15,906	14,98
98	10,923	12,142	11,46
99	8,49	9,918	9,42
100	0,0	0,0	0,0
101	15,1	17,283	15,87
102	6,42	7,899	7,4
103	7,428	6,838	6,79
104	13,539	15,063	14,16
105	10,226	12,198	11,46
106	11,019	13,292	12,46
107	15,712	19,173	17,99
108	11,951	13,657	12,67
109	10,996	11,95	10,95
110	4,557	5,831	5,4
111	15,521	18,128	17,02
112	23,114	26,623	25,35

113	11,289	13,421	12,44
114	19,256	23,773	21,38
115	11,84	15,24	14,18
116	10,23	11,983	11,4
117	17,623	21,393	20,25
118	6,327	6,917	6,47
119	7,216	8,239	7,68
120	10,951	11,881	10,92
121	7,069	8,698	8,03
122	8,629	11,143	10,36
123	10,904	12,109	11,35
124	21,157	24,713	23,11
125	13,58	15,608	14,65
126	11,687	14,43	13,65
127	14,687	20,199	18,95
128	10,315	11,114	10,73
129	7,207	8,238	8,22
130	0,881	1,076	0,8
131	1,14	0,93	0,85
132	1,024	0,666	0,63
133	0,0	0,0	0,0
134	1,411	1,155	1,09
135	1,482	2,065	1,85
136	2,44	2,415	2,18
137	1,165	0,384	0,45
138	1,179	1,253	1,18
139	1,402	0,624	1,03
140	11,277	13,937	12,49
141	8,29	9,47	8,7
142		1,259	1,46
143		6,09	5,61
144		8,313	7,45
145		8,307	7,57
146		1,123	0,74
147		6,559	5,97
148		7,217	6,65
149		0,756	0,68
150		5,378	5,96
151		1,03	0,95
152		6,879	6,02
153		8,738	7,98
154		8,33	7,59
155		7,858	7,41
156		7,041	6,55
157		7,951	7,31

Tabelle: CDT- %- Messergebnisse aus dem Methodenvergleich mit  
seriell gemischten Proben

Mischung 1 Serum 1	Serum 2	CDT % ZLCL bs gemessen	CDT % ZLCL bs errechnet	CDT % ZLCL bs/vtv gemessen	CDT % ZLCL bs/vtv errechnet
100 %	0 %	3,66	3,66	4,198	4,20
90 %	10 %	3,45	3,36	4,072	3,86
70 %	30 %	3,49	2,76	3,912	3,19
50 %	50 %	2,61	2,16	3,071	2,52
30 %	70 %	2,42	1,56	2,929	1,84
10 %	90 %	1,73	0,96	2,127	1,17
0 %	100 %	0,66	0,66	0,835	0,84
Mischung 2 Serum 3	Serum 4				
100 %	0 %	1,20	1,20	1,382	1,38
90 %	10 %	2,35	2,57	2,727	2,88
70 %	30 %	4,89	5,30	5,612	5,88
50 %	50 %	7,41	8,03	8,352	8,87
30 %	70 %	10,10	10,76	11,285	11,87
10 %	90 %	13,00	13,49	14,375	14,86
0 %	100 %	14,86	14,86	16,362	16,36
Mischung 3 Serum 5	Serum 6				
100 %	0 %	1,48	1,48	1,626	1,63
90 %	10 %	2,00	2,50	2,199	2,81
70 %	30 %	2,97	4,54	3,277	5,17
50 %	50 %	5,80	6,59	6,503	7,53
30 %	70 %	7,62	8,63	8,51	9,88
10 %	90 %	10,72	10,68	12,056	12,24
0 %	100 %	11,70	11,70	13,424	13,42

Tabelle: Fortsetzung CDT- %- Messergebnisse aus dem Methodenvergleich mit seriell gemischten Proben

Mischung 1 Serum 1	Serum2	CDT % Recipe bs gemessen	CDT % Recipe bs errechnet	CDT % Recipe bs/vtv gemessen	CDT % Recipe bs/vtv errechnet
100 %	0 %	3,28	3,28	3,986	3,986
90 %	10 %	2,65	3,00	3,191	3,690
70 %	30 %	2,73	2,46	3,655	3,097
50 %	50 %	2,47	1,91	3,523	2,504
30 %	70 %	1,96	1,36	3,037	1,911
10 %	90 %	1,44	0,82	1,504	1,318
0 %	100 %	0,54	0,54	1,022	1,022
Mischung 2 Serum 3	Serum 4				
100 %	0 %	0,98	0,98	1,123	1,123
90 %	10 %	1,90	2,23	1,804	2,7549
70 %	30 %	4,40	4,74	5,33	6,0187
50 %	50 %	6,92	7,26	9,205	9,2825
30 %	70 %	9,66	9,77	12,524	12,5463
10 %	90 %	11,72	12,28	15,731	15,8101
0 %	100 %	13,53	13,53	17,442	17,442
Mischung 3 Serum 5	Serum 6				
100 %	0 %	1,44	1,44	1,409	1,409
90 %	10 %	1,62	2,46	1,614	2,8517
70 %	30 %	3,10	4,49	3,852	5,7371
50 %	50 %	5,06	6,51	6,611	8,6225
30 %	70 %	7,92	8,54	10,293	11,5079
10 %	90 %	10,35	10,57	13,408	14,3933
0 %	100 %	11,58	11,58	15,836	15,836

Tabelle: CDT %- Messergebnisse aus dem Methodenvergleich ZLCL versus Recipe versus Chromsystems an 51 Serumproben

Probe N= 51	CDT % ZLCL bs	CDT % ZLCL bs/vtv	CDT % ZLCL vtv	CDT % Recipe bs	CDT % Recipe bs/vtv	CDT % Recipe vtv	CDT % Chrom- systems bs	CDT % Chrom- systems bs/vtv	CDT % Chrom- systems vtv
1	1,62	2,039	1,57	1,635	2,206	1,214	1,297	1,55	1,61
2	3,5	4,251	3,12	3,395	4,505	2,882	3,274	3,87	4,17
3	1,259	1,481	0,97	1,074	1,245	0,745	1,075	1,19	1,249
4	0,82	0,989	0,97	0,788	0,979	0,751	0,828	0,98	0,89
5	1,216	1,355	0,94	1,015	1,163	0,652	0,923	0,97	0,97
6	1,805	2,068	1,11	1,15	1,346	0,522	1,493	1,61	1,61
7	0,882	1,017	0,72	0,781	0,969	0,506	0,769	0,85	0,851
8	1,276	1,444	1,30	1,327	1,553	1,223	1,407	1,52	1,523
9	1,115	1,283	0,97	1,031	1,263	0,711	1,012	1,11	1,114
10	1,107	1,263	0,83	0,863	1,056	0,488	0,893	0,97	0,969
11	1,385	1,712	1,33	1,291	1,681	0,974	1,42	1,62	1,617
12	1,17	1,474	1,11	0,749	0,882	0,538	0,807	0,94	0,978
13	0,864	1,083	0,66	0,954	1,273	0,75	0,89	1,03	1,033
14	0,99	1,129	0,78	0,867	1,035	0,534	0,938	1,01	1,011
15	1,144	1,293	0,87	0,951	1,162	0,567	0,862	0,94	0,936
16	1,01	1,222	0,70	0,863	1,067	0,299	0,756	0,86	0,857
17	1,214	1,428	0,83	0,986	1,279	0,457	0,963	1,07	1,066
18	1,023	1,161	0,67	0,607	0,728	0,282	0,602	0,64	0,641
19	1,203	1,393	0,98	1,009	1,239	0,62	1,101	1,19	1,193
20	1,61	1,902	1,35	1,512	1,933	0,79	1,44	1,57	1,594
21	1,172	1,32	0,84	0,863	1,041	0,43	0,864	0,93	0,926
22	1,09	1,262	0,88	0,818	1,042	0,466	0,937	1,03	1,026
23	1,12	1,321	0,77	0,944	1,182	0,411	0,922	1,02	1,017
24	0,828	1,118	0,77	0,909	1,24	0,535	0,931	1,17	1,163
25	1,046	1,188	0,86	0,899	1,084	0,49	0,812	0,88	0,889
26	1,44	1,669	1,37	1,27	1,595	1,04	1,295	1,42	1,417
27	2,121	2,425	1,73	1,995	2,452	1,269	1,8	1,99	1,993
28	0,92	1,058	0,69	0,68	0,815	0,329	0,614	0,67	0,669
29	1,794	2,034	1,45	1,644	1,936	0,953	1,52	1,64	1,635
30	0,82	0,957	0,64	0,603	0,737	0,42	0,678	0,74	0,742
31	0,82	0,952	0,64	0,5	0,619	0,203	0,594	0,64	0,645
32	1,128	1,287	1,04	1,021	1,25	0,702	1,001	1,10	1,105
33	1,124	1,259	0,78	0,804	0,957	0,419	0,918	0,99	0,986
34	1,79	2,031	1,48	1,576	1,954	1,02	1,584	1,72	1,724
35	5,521	6,38	5,31	5,504	6,391	4,761	5,917	6,16	6,162
36	1,273	1,634	1,33	1,507	1,991	1,065	0,988	1,20	1,198
37	0,895	1,094	0,81	1,009	1,224	0,574	0,627	0,74	0,739
38	0,785	0,991	0,92	0,846	1,044	0,808	0,851	0,95	0,954
39	3,362	3,694	2,95	3,221	3,735	2,425	3,102	3,33	3,335
40	5,937	6,809	5,97	6,316	7,47	5,6	6,596	7,13	7,134
41	10,884	12,198	11,22	12,812	14,406	10,963	12,856	13,55	13,553
42	1,959	2,225	1,26	1,337	1,557	0,773	1,226	1,32	1,324
43	2,135	2,368	1,59	1,855	2,083	0,888	1,152	1,22	1,216
44	7,331	8,282	7,07	7,617	8,853	6,383	7,695	8,33	8,335
45	12,511	14,44	12,34	12,741	15,111	11,838	12,888	14,03	14,38
46	11,711	13,341	10,90	11,819	14,37	10,575	11,574	12,54	12,541
47	12,052	13,744	11,69	11,989	14,371	11,108	12,079	13,22	13,225
48	10,532	11,851	9,76	10,274	12,461	9,137	10,39	11,45	10,477
49	22,555	23,997	23,26	24,358	26,66	24,385	24,669	25,54	25,535
50	4,534	5,582	5,48	4,816	8,07	6,744	5,52	6,03	6,145
51	10,629	12,07	10,03	10,661	12,719	9,558	10,515	11,50	11,312

## 10. Danksagung

Ich möchte Professor Dr. M. Seyfarth, Leiter des Zentrallabors des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Lübeck, ganz herzlich für die Überlassung des Dissertationsthemas, den Arbeitsplatz im Labor und alle verwendeten und großzügig zur Verfügung gestellten Materialien danken. Mein Dank gilt auch seiner freundlichen Betreuung und der Möglichkeit, dass ich meine Arbeit als Poster auf dem Euregio- Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine- Aachen 2003 präsentieren konnte.

Ich möchte Dr. L. Dibbelt für seine kompetente und immer herzliche Betreuung danken, für seine Geduld, seine Hilfsbereitschaft und für sein immer offenes Ohr. Für seine Ideen und Hilfestellungen bei auftretenden Problemen. Für die Durchsicht meiner Arbeit und allen Mühen, die er sich gemacht hat: Danke!

Ich möchte Frau Spies, MTA im Zentrallabor, von ganzem Herzen für Ihre Unterstützung und Hilfe danken, für Ihre unendliche Geduld und Ihre Hilfsbereitschaft, für Ihre Zeit und Ihr immer herzliches Wesen.

Ich möchte auch allen anderen MTAs im Zentrallabor danken für die immer freundliche Unterstützung bei allen Fragestellungen.

Ich möchte meinen Eltern, Jörg und Dorothee Schmitz, von ganzem Herzen danken für die seelische und finanzielle Unterstützung meines Studiums, für den Glauben an mich selbst, in dem sie mich großgezogen haben.

Voller Dankbarkeit widme ich Ihnen diese Arbeit.

Ich danke Daniel Gutmacher, für den seelischen Beistand, für die Ermunterung und Unterstützung und für seine Hilfe in allen den Computer betreffenden Fragen. Ich danke ihm und seiner Schwester Bess Gutmacher bei der Hilfe zur Erarbeitung der Statistik.

# CURRICULUM VITAE

## **Persönliche Daten:**

Vor- und Zuname: Ulrike Schmitz  
Geburtstag: 06.12.1978  
Geburtsort: Neuss am Rhein

## **Schulbildung:**

09/1989 - 05/1998 Schule Marienberg  
Erzbischöfliches Gymnasium für Mädchen, Neuss  
Abschluss: Abitur

1996 – 1997 Schulsprecherin der Schule Marienberg

## **Studium /Beruf:**

10/1998 - 07/2000 Studium der Medizin,  
Medizinische Fakultät  
Otto-von-Guericke- Universität, Magdeburg  
Abschluss: Physikum

10/2000 - 07/2005 Studium der Medizin,  
Medizinische Fakultät Universität zu Lübeck

14/06/2005 3.Staatsexamen

12/2005- 08/2006 Teilzeitbeschäftigung als Assistenzärztin in der  
Gynäkologie/Geburtshilfe der  
Helios Klinik Titisee-Neustadt

09/2006- 10/2007 Assistentenstelle in der Gynäkologie/Geburtshilfe  
des St. Elisabethenkrankenhauses, Lörrach  
Perinatalzentrum Level I

11/2007- heute Assistentenstelle in der Gynäkologie/Geburtshilfe  
des Kreiskrankenhauses Emmendingen  
Zentrum für Brustkrankungen Südbaden

## **Dissertation:**

2002 – 2005 Experimentelle Doktorarbeit im Zentrallabor des  
Universitätsklinikums Schleswig- Holstein,  
Campus Lübeck, Prof. Dr. M. Seyfarth

„Analyse des Kohlenhydrat- defizienten Transferrins  
im Serum des Menschen mittels Hochleistungs-  
Flüssigkeitschromatographie.  
Vergleich analytischer Methoden und Etablierung  
einer präparativen Methode“

2003

Posterpräsentation EUREGIO- Congress of Clinical  
Chemistry and Laboratory Medicine, Aachen

2005

Treffen mit den Vertretern der kommerziellen  
HPLC- Methoden am Rande der Medica 2005