

Aus der Klinik für Anästhesiologie und operative Intensivmedizin  
der Medizinischen Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin

## DISSERTATION

Prospektiv-randomisierte Doppelblindstudie zur Wirkung einer glutaminhaltigen  
parenteralen Ernährung auf Monozyten, Granulozyten und  
Infektionen nach distaler Ösophagusresektion

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité - Universitätsmedizin Berlin

von

Carsten Kietzmann  
aus Neubrandenburg

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. H. Gerlach  
2. Prof. Dr. med. H. Lochs  
3. Prof. Dr. med. habil. A. Heller

Datum der Promotion: 27. 03. 2009

# Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>Einleitung</b>	<b>Seite 6</b>
1.1.	Bedeutung parenteraler Ernährung	Seite 6
1.1.1.	<i>Physiologie des Postabsorptionsstoffwechsels</i>	Seite 6
1.1.2.	<i>Pathophysiologie des Postaggressionsstoffwechsels</i>	Seite 6
1.1.3.	<i>Entzündung und Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS)</i>	Seite 7
1.1.4.	<i>Ziele der parenteralen Nährstoffsubstitution</i>	Seite 8
1.2.	Glutamin in der parenteralen Ernährung	Seite 9
1.3.	Chemie und Biochemie der Aminosäure Glutamin	Seite 10
1.3.1.	<i>Chemische Grundstruktur und Funktionalität</i>	Seite 10
1.3.2.	<i>Biochemie und Funktionen im Intermediärstoffwechsel der Zelle</i>	Seite 10
1.3.3.	<i>Glutamin - ein Energiesubstrat</i>	Seite 11
1.3.4.	<i>Glutaminstoffwechsel in metabolischen Stresssituationen</i>	Seite 12
1.3.5.	<i>Glutamin - Darmmukosa und Leber</i>	Seite 13
1.3.6.	<i>Glutamin und Immunsystem</i>	Seite 14
1.4.	Klinische Fragestellung	Seite 16
<b>2.</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>Seite 18</b>
2.1.	Allgemeine Formalien	Seite 18
2.1.1.	<i>Bezeichnung der Studie</i>	Seite 18
2.1.2.	<i>Stichprobenumfang</i>	Seite 18
2.1.3.	<i>Einschlusskriterien</i>	Seite 18
2.1.4.	<i>Ausschlusskriterien</i>	Seite 18
2.1.5.	<i>Studiendurchführung</i>	Seite 18
2.1.6.	<i>Abbruchkriterien</i>	Seite 19
2.2.	Parenterale Ernährung	Seite 19
2.3.	Material	Seite 21
2.3.1.	<i>Materialgewinnung</i>	Seite 21
2.3.2.	<i>Routinelabor</i>	Seite 21
2.3.3.	<i>Mikrobiologische Materialgewinnung und Röntgenthorax</i>	Seite 22
2.3.4.	<i>Materialien für zusätzliche immunologische Untersuchungen</i>	Seite 22
2.4.	Spezielle immunologische Untersuchungen	Seite 23

2.4.1.	<i>Durchflusszytometrie</i>	Seite 23
2.4.1.1.	<i>Prinzip der Durchflusszytometrie</i>	Seite 23
2.4.1.2.	<i>Materialien und Protokolle für die FACS-Oberflächenmolekülanalyse</i>	Seite 24
2.4.1.3.	<i>Materialien und Protokolle für den Phagozytose-/oxidativen Burst-Test</i>	Seite 27
2.4.2.	<i>Immunoassays</i>	Seite 28
2.4.2.1.	<i>Prinzip der Immunoassays</i>	Seite 28
2.4.2.2.	<i>Materialien und Protokolle für die Immunoassays</i>	Seite 29
2.5.	Statistische Auswertung	Seite 30
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>Seite 32</b>
3.1.	Patientendaten	Seite 32
3.2.	Glutaminspiegel und Stickstoffbilanz	Seite 34
3.3.	Leukozyten	Seite 36
3.4.	Monozyten, Granulozyten und Adhäsion	Seite 38
3.5.	Phagozytose und oxidativer Burst	Seite 40
3.6.	Postoperative Immunsuppression	Seite 45
3.7.	Klinische Parameter und Infektionen	Seite 47
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>Seite 54</b>
4.1	Allgemeine Vorbetrachtung	Seite 54
4.2.	Leukozyten und deren Subpopulationen	Seite 56
4.3.	Makrophagen- und Granulozytenaktivierung und Funktion	Seite 57
4.3.1.	<i>Adhäsion und Aktivierung</i>	Seite 57
4.3.2.	<i>Phagozytose und oxidativer Burst</i>	Seite 60
4.4.	Postoperative Immunsuppression	Seite 62
4.5.	Klinische Parameter	Seite 65
4.5.1.	<i>Entzündungsparameter</i>	Seite 65
4.5.2.	<i>Infektionen und mikrobielle Besiedelung</i>	Seite 66
4.6.	Unbekannte Variablen und Störfaktoren	Seite 68
4.7.	Methodenkritik	Seite 70
4.7.1.	<i>Allgemeine Vorbetrachtung</i>	Seite 70
4.7.2.	<i>Glutaminapplikation, Dosierung und Zeitpunkt</i>	Seite 70

<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>Seite 74</b>
5.1.	Allgemeine Betrachtung der Ergebnisse	Seite 74
5.2.	Therapeutischer Stellenwert und Ausblick	Seite 75
<b>6.</b>	<b>Quellennachweis</b>	<b>Seite 77</b>
<b>7.</b>	<b>Appendix</b>	<b>Seite 89</b>
7.1.	Verzeichnis häufig benutzter Abkürzungen	Seite 89
7.2.	Lebenslauf	Seite 90
7.3.	Danksagung	Seite 91
7.4.	Erklärung über Selbständigkeit	Seite 92

# **1. Einleitung**

## **1.1. Bedeutung parenteraler Ernährung**

### **1.1.1. Physiologie des Postabsorptionsstoffwechsels**

In der klinischen Praxis kommt es immer wieder zu Situationen, in denen ein Patient keine Nahrung aufnehmen kann, darf oder möchte. Der Stoffwechsel ist gekennzeichnet durch eine fehlende Zufuhr an Kohlenhydraten jedweder Form, eine dadurch bedingte gesteigerte Glykogenolyse und eine Verarmung des Organismus an Glykogen sowie bei anhaltender Nahrungskarenz durch ein Überwiegen antiinsulinärer und katabol wirkender Hormone. Letztere führen zu einer gesteigerten Fettgewebslipolyse und zu einer gesteigerten Verwertung von Glycerinen und Fettsäuren durch Muskel- und Leberzellen. Bei der Oxidation der Fettsäuren entstehen massenhaft Ketonkörper sowie Glycerin, welches als Substrat ( $\alpha$ -Glycerolphosphat) der Glukoneogenese dient. Da die Glykogenvorräte rasch erschöpfen und die Fettgewebslipolyse nur ca. 15-20 % der benötigten Glukosemenge liefert, muss der Organismus dazu übergehen, glukoplastische Aminosäuren zu verstoffwechseln. Dieses bedingt eine Proteolyse körpereigener Proteine und eine negative Stickstoffbilanz [Cahill 1976, Felig et al. 1969, Owen et al. 1969].

### **1.1.2. Pathophysiologie des Postaggressionsstoffwechsels**

Jedes Trauma, welches mit einer Schädigung der körperlichen Integrität einhergeht, ist charakterisiert durch unterschiedlich schwere Veränderungen der Homöostase. Es kommt zu einer verstärkten Aktivität des autonomen Nervensystems verbunden mit einer erhöhten Sekretion von Katecholaminen, einer erhöhten Sekretion oder einem verstärkten Effekt von katabolen Hormonen, einer verminderten Sekretion oder einem verminderten Effekt anaboler Hormone, Hypermetabolismus und erhöhtem Herzminutenvolumen. Vermittelt durch die stressbedingte Sympathikusaktivierung und veränderte Regelkreise der Hypothalamus-Hypophysen-Achse ist die hypermetabolische Stoffwechselsituation (Postaggressions- oder Stressestoffwechsel) gekennzeichnet durch die Mobilisierung körpereigener Energie- und Proteinreserven in Verbindung mit Veränderungen des Wasser-, Elektrolyt- und Säure-Basen-Haushaltes [Douglas et al. 1989]. Sowohl beim Postabsorptions- als auch beim Postaggressionsstoffwechsel sind die Mechanismen und Stoffwechselforgänge identisch, Stell- und Regelgrößen unterliegen denselben Gesetzmäßigkeiten. Im Gegensatz zum Postabsorptionsstoffwechsel sind Glykogenolyse, Glukoneogenese, Lipolyse und Proteinolyse jedoch durch neuroendokrine und immunologische Mediatoren fixiert und durch eine exogene Substratzufuhr

nur bedingt modifizierbar [Lang 1992, McGuinness et al. 1993]. Eine zusätzliche Akzentuierung erfährt der Prozess häufig durch Einschränkungen pulmonaler Funktionen, Schmerzen, gastrointestinale Störungen wie Nausea und Ileus, Veränderungen des Gerinnungssystems mit Überwiegen prokoagulatorischer Faktoren, Verlust von Muskelgewebe und Immunsuppression [Kehlet 1997]. Daher ist der Stoffwechselumsatz bei postoperativen Patienten um mehr als 10 % erhöht [Kinney et al. 1970].

### **1.1.3. Entzündung und Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS)**

Über die oben beschriebenen Reaktionen hinaus existieren eine Reihe von Mechanismen, deren Ziel es ist, das schädigende Agens zu eliminieren oder aber zu isolieren und im Anschluss daran, den entstandenen Schaden so gut wie möglich zu reparieren. Die daran beteiligten Systeme, wie Nervensystem, Immunsystem, Gerinnungssystem, endokrines System oder aktives Mesenchym, sind dabei so aufeinander abgestimmt, dass der koordinierten und lokalen Freisetzung von Entzündungsmediatoren eine wichtige Bedeutung bei der „Wundheilung“ zukommt. Kommt es jedoch infolge einer massiven fokalen Schädigung oder ungünstiger Abwehrlage des Gesamtorganismus zu einer exzessiven lokalen Produktion von Entzündungsmediatoren, so erlangen diese „Botenstoffe“, die in niedrigen Konzentrationen allenfalls in der Lage sind parakrin zu wirken, systemische, quasi endokrine, den Gesamtorganismus betreffende Wirkung [Bauer et al. 1998]. Die in der Folge weitere Ausschüttung von proinflammatorischen Mediatoren durch das aktivierte Monozyten-Makrophagen-System trägt zu der systemischen Entzündungsreaktion (SIRS) bei [Wanner et al. 1996].

Nach einer Definition der American College of Chest Physicans und der American Society of Critical Care Medicine liegt ein SIRS vor, wenn mindestens zwei der folgenden Bedingungen vorliegen [Paterson et al. 2000]:

- Temperatur  $>38\text{ °C}$  oder  $<36\text{ °C}$ ,
- Tachykardie  $>90$  Schläge/Minute,
- Atemfrequenz  $>20$ /Minute oder  $\text{PaCO}_2 <4,3\text{ kPa}$ ,
- Leukozytenzahl  $>12 \times 10^9/l$  oder  $<4 \times 10^9/l$  oder  $>10\%$  stabkernige neutrophile Granulozyten.

Eine Reihe von Substanzen sind als mögliche Mediatoren bei der Entwicklung eines SIRS identifiziert worden: Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), Interleukine (IL-1b, IL-8, IL-6, IL-10, IL-4, IL-13), Interferon  $\gamma$  (INF- $\gamma$ ) [Koj 1996].

Im Rahmen einer derartigen generalisierten Entzündungsreaktion kommt es zu einer zunehmenden Schädigung verschiedener Organsysteme:

- das ARDS (Acute Respiratory Distress Syndrome) der Lungen, welches 60 % aller klinischen Zustände mit septischem Schock kompliziert [Kollef et al. 1995],
- die Kreislaufperipherie unterliegt komplexen Regulationsmechanismen, die letztendlich in einer stickstoffmonoxidvermittelten Hypotension und Organminderperfusion münden [Rees et al. 1995],
- das akute Nierenversagen, das in 50 % aller Fälle mit septischem Schock auftritt und häufiger Bestandteil des Multiorganversagens ist [Thijs et al. 1998],
- die Schädigung der Darmmukosa mit konsekutiver Translokation von gramnegativen Bakterien [Tremel et al. 1994, Sedman et al. 1994, Wang et al. 2004],
- die Veränderungen der Fließeigenschaften und Zusammensetzung des Blutes sowie die Aktivierung des Gerinnungssystems durch Monozyten und Endothelzellen bei Anwesenheit von IL-6 oder IL-8 [Neumann et al. 1997],
- die katabole Stoffwechselsituation des Postaggressionsstoffwechsels [Saito et al. 1987].

#### **1.1.4. Ziele der parenteralen Nährstoffsubstitution**

Der Zusammenhang zwischen präoperativem Gewichtsverlust und operativer Mortalität wurde erstmals durch Studley im Jahr 1936 beschrieben [Vinnars et al. 2003]. Daraus abgeleitet ergab sich die Erfordernis, eine bereits vorhandene klinisch manifeste Malnutrition zu beseitigen oder aber, bei länger dauernder Nahrungskarenz, diese zu verhindern. Verschiedene Studien zeigten, dass ca. 40 % aller chirurgischen und internistischen Patienten bei Krankenhausaufnahme mangelernährt sind [Giner et al. 1995, Ward 2003]. Neben der Substitution von Energieträgern (z.B. Fette und Kohlenhydrate) müssen dem menschlichen Organismus regelmäßig Baustoffe (z.B. Aminosäuren) zugeführt werden. Während in den ersten Jahrzehnten der klinischen Ernährungstherapie der Schwerpunkt auf der Verträglichkeit lag, rücken im Rahmen moderner Ernährungskonzepte, wie der Immunonutrition, solche Komponenten in den Mittelpunkt des Interesses, deren Bedarf unter bestimmten pathophysiologischen Bedingungen als essentiell anzusehen ist [Roth 1996], zum einen, weil sie einen entsprechenden Mangel beseitigen, zum anderen, weil durch sie bestimmte Organfunktionen beeinflussbar werden [Suchner et al. 2000]. In diesem Zusammenhang ist die Rolle der "konditionell essentiellen" Aminosäure Glutamin zu sehen [Roth et al. 1996].

## **1.2. Glutamin in der parenteralen Ernährung**

Ruft man mit Hilfe des Enzyms Glutaminase einen systemischen Glutaminmangel in Versuchstieren hervor, so kommt es zu einer verzögerten Immunantwort und die Tiere versterben an einer nekrotisierenden Enterokolitis [Baskerville et al. 1980, Kafkewitz et al. 1983]. Seit mehr als vierzig Jahren ist Glutamin Bestandteil von Nährlösungen in Zellkulturen [Eagle 1959]. Seit dieser Zeit sind auch vielfältige Stoffwechselwege und -funktionen der Aminosäure bekannt [Salzmann et al. 1958].

Für die Annahme, dass Glutamin mehr ist als eine einfache Aminosäure, sprechen eine Reihe von Untersuchungsergebnissen.

Erstens könnte Glutamin die Funktion eines Regulators der Proteinbiosynthese zukommen. Es wurde gezeigt, dass die Proteinbiosynthese der Zelle mit der intrazellulären Glutaminkonzentration korreliert [Rennie et al. 1986, Häussinger et al. 1993, Häussinger et al. 1994].

Zweitens wird durch die Gabe von Glutamin auch die Stickstoffbilanz signifikant verbessert [Hammerqvist et al. 1990, Ziegler et al. 1994].

Drittens stellt Glutamin ein Substrat für schnell proliferierende Gewebe und Zellen dar, wie Zellen der Darmmukosa und verschiedene immunkompetente Zellen [O’Riordain et al. 1994, Calder 1994, Newsholme et al. 1997].

Viertens ist Glutamin Substrat bzw. Vorläufersubstanz zahlreicher biochemischer Reaktionen und Substanzen [Nurjha et al. 1995, Young et al. 2000].

Glutamin ist als freie Aminosäure in wässriger Lösung schlecht löslich, nicht stabil und wird bei der Hitzesterilisation zerstört. Mit Hilfe neuerer biotechnologischer Verfahren werden für den klinischen Gebrauch Dipeptide hergestellt, die in wässriger Lösung stabil und sehr gut wasserlöslich sind sowie nach Infusion schnell hydrolysiert werden und Glutamin freisetzen können [Abumrad et al. 1989].

Die heute im klinischen Alltag gebräuchlichen Dipeptide sind Alanyl-Glutamin und Glycyl-Glutamin.

### 1.3. Chemie und Biochemie der Aminosäure Glutamin

#### 1.3.1. Chemische Grundstruktur und Funktionalität

Die Aminosäure Glutamin leitet sich, wie ihre Vorläufersubstanz Glutamat, formal vom  $\alpha$ -Ketoglutarat her (Abb. 1).

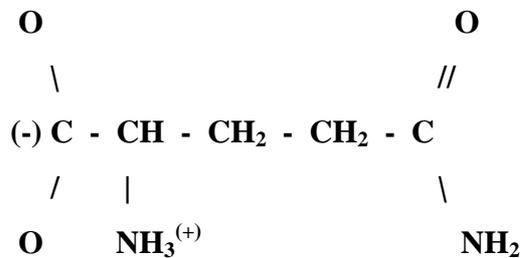


Abb. 1) Strukturformel von Glutamin.

Glutamin liegt bei physiologischem pH-Wert als neutrale Aminosäure vor. Der proteingebundene Anteil im menschlichen Organismus beträgt gerade einmal 6 % im Gegensatz zum freien Anteil im Zytoplasma der Muskelzellen beispielsweise mit 50 % [Roth et al. 1996].

#### 1.3.2. Biochemie und Funktionen im Intermediärstoffwechsel der Zelle

Ausgangspunkt der Synthese des Glutamins ist das 2-Oxoglutarat, welches aus dem Citratzyklus stammt. In einer Reaktion durch das mitochondriale Enzym L-Glutamat-Dehydrogenase entsteht die Aminosäure Glutamat:



Das Glutamin entsteht aus einer Reaktion des Glutamates und eines Stickstoffrestes mit Hilfe des Enzyms Glutaminsynthetase. Letztere findet sich in fast jedem Gewebe des menschlichen Körpers, insbesondere ist es aber in Leber, Niere, Muskelgewebe und Gehirn in hohen Konzentrationen nachweisbar:



Die Synthese des Glutamins ist dabei eng an den Ammoniakstoffwechsel der Leber gebunden. Die extrahepatischen Organe sind ähnlich wie die Leber in der Lage, mit Hilfe der

Glutamatdehydrogenase und Glutaminsynthetase Ammoniak zu binden. Dadurch ist die Ammoniakkonzentration im arteriellen Blut niedrig (20-60  $\mu\text{mol/l}$ ).

Ca. 60 % des Gesamtammoniaks entfallen auf Glutamin, davon 2/3 aus dem Amidstickstoff und 1/3 aus dem Aminostickstoff [Cooper und Meister 1972, Costa et al. 1986, Lehninger 1987].

Der Glutaminstickstoff ist bei einer Vielzahl von biosynthetischen Prozessen Substrat.

<b>Akzeptor</b>	<b>Produkt</b>	<b>Bedeutung</b>
Fructose-6-phosphat	Glucosamin-6-phosphat	Aminozucker
Desamido-NAD	NAD	NAD-Biosynthese
Phosphoribosyl-phosphat	5-Phosphoribosylamin	Biosynthese der Purine
Xanthosinmonophosphat	Guanosinmonophosphat	Biosynthese von GMP
Aspartat	Asparagin	Asparaginbiosynthese
Bikarbonat und ATP	Carbamyolphosphat	Pyrimidinbiosynthese

Tabelle 1) Glutamin als Aminogruppendonor bei Biosynthesen (Auswahl, entnommen, Löffler/Petrides; Physiologische Chemie, 1990).

Glutamin fungiert als Aminocarrier zwischen verschiedenen Organen wie der Leber, dem Hauptort der Ammoniakeliminierung, und der Niere als Ausscheidungsorgan für die meisten stickstoffhaltigen Verbindungen [Hankhard et al. 1995]. Diese Tatsache spiegeln auch die gefundenen Konzentrationswerte im Extra- und Intrazellulärraum wider, wobei das Glutamin mit 600 bis 800  $\mu\text{mol/l}$  die höchste Konzentration aller in diesen Kompartimenten nachweisbaren Aminosäuren aufweist [Felig et al. 1969].

### 1.3.3. Glutamin - ein Energiesubstrat

Bei Makrophagen und Lymphozyten ist der Energiegewinn am aeroben Stoffwechsel gering. Glukose wird nahezu vollständig in Laktat umgewandelt, wohingegen Glutamin zu Glutamat und Asparagin zu Aspartat verstoffwechselt wird. Die Umsatzrate für Glutamin ist dabei vierfach so hoch wie für Glukose. Der Anteil von Glutamin an der Gesamtenergiegewinnung beträgt ca. 21 %, der für Fettsäuren und Ketonkörper 40 % [Newsholme et al. 1989].

Der Prozess der Energiegewinnung aus Glutamin erfolgt unter Umgehung des kompletten Citratzyklus über Malat und wurde erstmals für Tumorzellen beschrieben [McKeehan 1982]. Dieser Stoffwechselweg wurde auch für andere, sogenannte schnell proliferierende "Mausergewebe" nachgewiesen. Charakteristisch ist ein hoher, nicht oxidativer Abbau von

Glutamin. Der Stoffwechselweg erlaubt die Bildung von Adenosintriphosphat (ATP) über einen Elektronentransfer im Citratzyklus von Ketoglutarat zu Oxalacetat (Abb. 2). Aus einem Mol Glutamin sind so 30 Mol ATP gewinnbar, was ähnlich hoch ist wie bei einem Mol Glucose (36 Mol ATP).

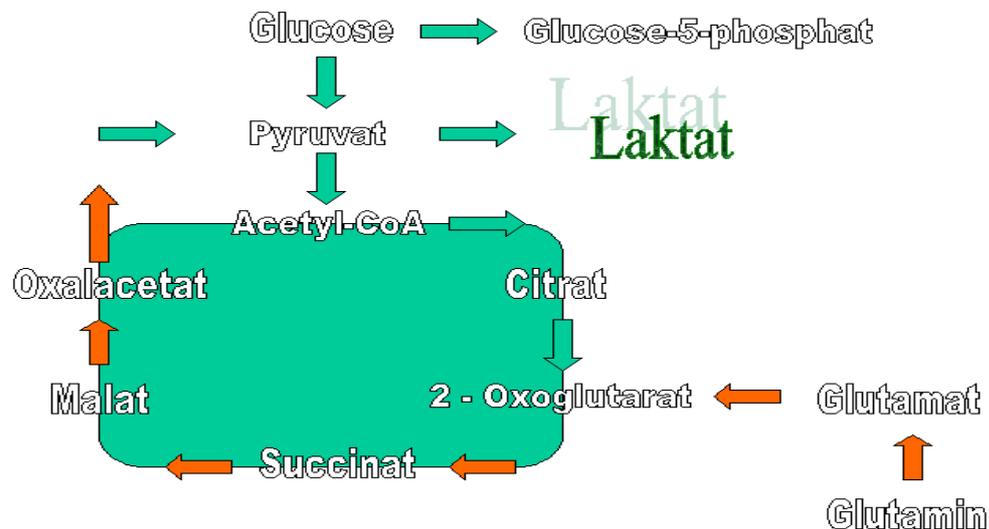


Abb. 2) Glutaminolyse und ihre Beziehungen zum Citratzyklus.

#### 1.3.4. Glutaminstoffwechsel in metabolischen Stresssituationen

Das maßgebliche Organ für die Synthese von Glutamin ist die Leber, der Hauptspeicher die quergestreifte Muskulatur. Unter physiologischen Bedingungen erfolgt der Glutaminfluss von der Leber zu den peripheren Organen.

Unter pathophysiologischen Bedingungen, konsekutiv metabolischem Stress kehren sich die Verhältnisse um. Die Glutaminsynthese in der Leber ist gestört, der größte Nettoproduzent an Glutamin wird nun zum Verbraucher und die einzige Quelle für Glutamin ist der quergestreifte Muskel, der zusehend an Glutamin verarmt [Stehle et al. 1989 und 1996]. Dabei wird exogen zugeführtes Glutamin nicht etwa durch den Muskel verstoffwechselt, sondern dient anderen Organen als Energiesubstrat und die "Eigenreserven" der Muskelzelle werden geschont [Palmer et al. 1996].

Klinische Studien bei chirurgischen Patienten haben gezeigt, dass eine rechtzeitige parenterale Glutaminzufuhr die präoperativ vorhandene Glutaminkonzentration im Skelettmuskel postoperativ erhalten kann [Blomqvist et al. 1995]. Die Verarmung an intrazellulärem, muskulärem Glutamin bei kritisch Kranken beträgt ca. 30 % gegenüber Gesunden und ist nicht

durch die Gabe von  $\alpha$ -Ketoglutarat zu beseitigen. Somit liegt keine prinzipielle Störung der Synthese von Glutamin vor [Mittendorfer et al. 1999].

### 1.3.5. Glutamin – Darmmukosa und Leber

Im Rahmen der cortico-adrenergen Stresssituation kommt es zu einer Perfusionsminderung im Splanchnikusgebiet und dadurch zu einer Minderung der basolateralen Substratversorgung sowie in solchen Situation häufig auch zu einer Drosselung der enteralen Nährstoffzufuhr. Dies kann bei längerer Dauer zu Störungen der funktionellen und strukturellen Integrität des Organs führen. Letzteres kann eine Translokation von Darmbakterien (Abb. 3) in die Blutbahn begünstigen und damit selbst Fokus eines septischen Prozesses sein [O'Boyle et al. 1997].

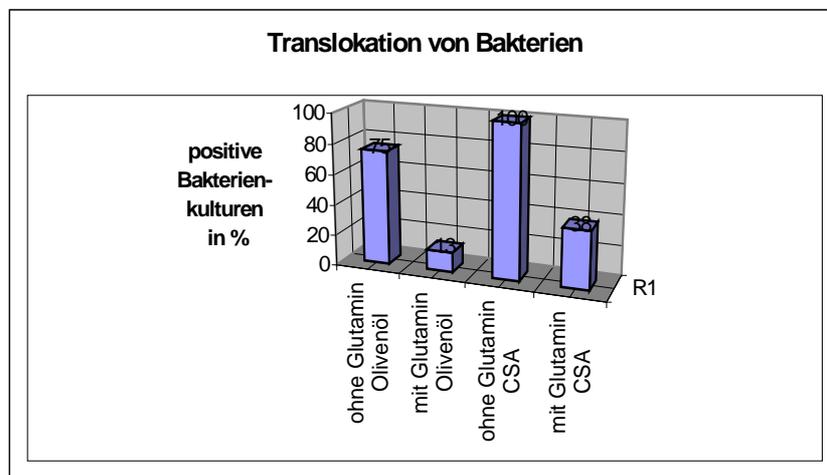


Abb. 3) Translokation von Bakterien über die Dünndarmmukosa bei Ratten unter Behandlung mit Cyclosporin A (CSA) und glutaminangereicherter Ernährung (nach Zhang et al. 1995).

Als Organ, welches dem Darm als nächstes nachgeschaltet ist, wird die Leber indirekt via Pfortadersystem durch Alterationen den Darm betreffend negativ beeinflusst. Der Leber kommt dabei eine entgiftende Funktion zu, u.a. durch die Klärung des Pfortaderblutes von Endotoxin und freien Radikalen [Teran et al. 1995]. Die Kompensationsbreite dieser Funktionen ist in Abhängigkeit der Verfügbarkeit von Glutamin am Beispiel des Glutathiongehalts bzw. der Lipidperoxidation in Abb. 4 dargestellt.

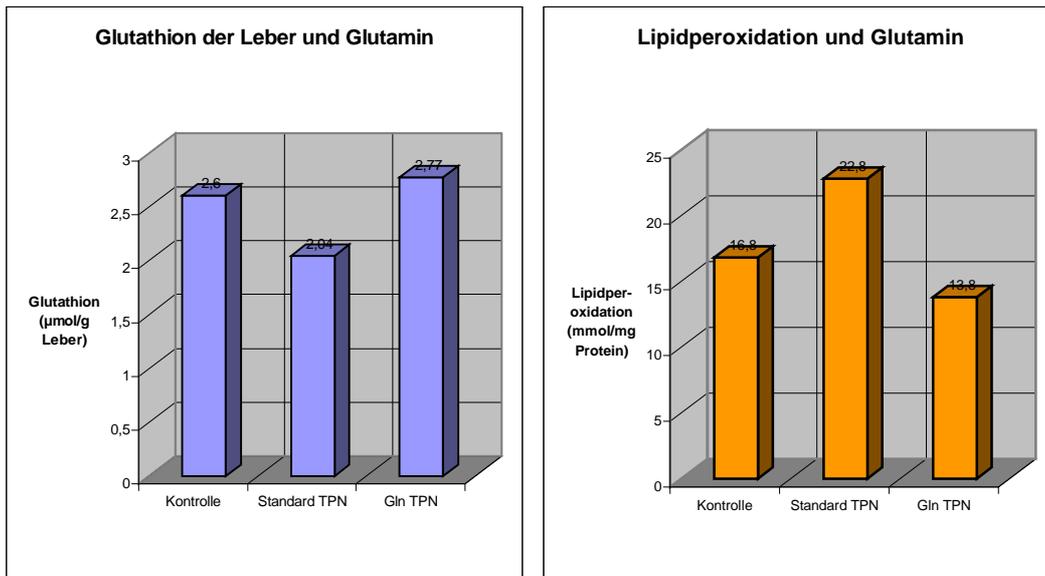


Abb. 4) Glutathion und Lipidperoxidation der Leber bei einer glutaminfreien totalen parenteralen Ernährung (Standard TPN) und einer glutaminhaltigen totalen parenteralen Ernährung (Gln TPN) (nach Matilla et al. 2000).

### 1.3.6. Glutamin und Immunsystem

Immunzellen müssen sich einerseits schnell an wechselnde Umgebungsbedingungen anpassen, haben eine hohe Absterberate und damit einen hohen Turnover, sind aber gleichzeitig produktive Zellen. Andererseits dringen sie in Regionen vor, in denen die Substrat- und Sauerstoffversorgung meist mangelhaft ist, wie beispielsweise in Entzündungsgebieten.

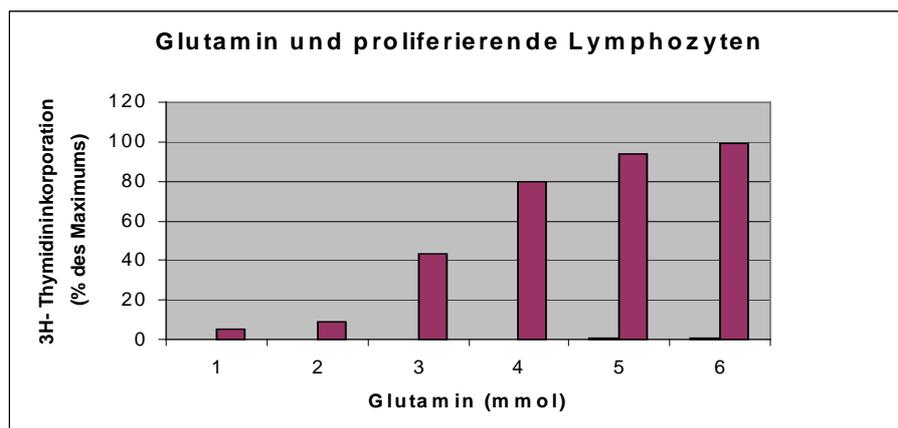


Abb. 5) Glutamin als notwendige Voraussetzung für die Proliferation von aktivierten menschlichen Lymphozyten in vitro (nach Calder 1994).

Die antigenstimulierte Proliferation von B- und T-Zellen ist glutaminabhängig (Abb. 5). Bei T-Lymphozyten steigt der Glutaminverbrauch nach der mitogenen Stimulation um 50 % an. In einem glutaminfreien Medium kommt die Proliferation ganz zum Erliegen. Entscheidend dabei ist, dass diese Funktion nicht durch Glukose oder andere Aminosäuren wie Glutamat und Ammoniak, Aspartat oder Asparagin ersetzt werden kann. Ebenso abhängig von der Glutaminkonzentration ist die Differenzierung von B-Zellen in Antikörper-produzierende Zellen und die Produktion von Immunglobulinen [Crawfort et al. 1985].

Die Transkription von Zytokinen und Zytokinrezeptoren, die sich für die frühe Aktivierung von Lymphozyten verantwortlich zeichnen (IL-2, IL-2R-p55, IL-4, IL-5, GM-CSF, CD 69), sind in ihrer Bildung nicht glutaminabhängig, da die mRNA in glutaminfreiem Medium in gleichem Maße gebildet wird. Für die frühe Zellaktivierung scheint der vorhandene Glutaminpool ausreichend zu sein. Anders verhält es sich bei der späten Zellaktivierung, den Aktivatoren wie CD 25, CD 71, CD 45RO, deren Verfügbarkeit von der Glutamin-Supplementation abhängig ist. Die mangelnde Expression des IL-2-Rezeptors verhindert ein Fortschreiten der Zellen von der G1-Phase in die S-Phase des Zellzyklus. Der Glutaminmangel führt über eine verminderte Signalübertragung (CD 45RO) zu einer behinderten Zellzyklusprogression. Weiterhin ist eine verminderte INF- $\gamma$ -Sekretion durch Lymphozyten in Abwesenheit von Glutamin zu verzeichnen, während TNF- $\alpha$  davon unbeeinflusst bleibt [Hörig et al. 1993]. Werden Lymphozyten in Anwesenheit von IL-2 mitogen stimuliert, so entstehen Lymphokin-aktivierte Killer-Zellen (LAK-Zellen). Die Bildung bleibt in einem glutamindefizitären Medium reduziert [Juretic et al. 1994].

Makrophagen und Granulozyten sind im Gegensatz zu Lymphozyten ausdifferenzierte Zellen, die ihre Teilungsfähigkeit verloren haben. Sie sind hochaktive Zellen mit einer bedeutenden Syntheserate von Makromolekülen, die für die Phagozytoseaktivität und für die Produktion von Zytokinen benötigt werden. Sowohl die Phagozytose von opsonierten Schafserthrozyten als auch die Synthese von RNA und IL-1 sind glutaminabhängig [Wallace et al. 1992]. Des Weiteren scheint auch die HLA-Expression (Human Leukocyte Antigen) in vitro von der vorherrschenden Glutaminkonzentration abhängig zu sein. Eine Verringerung der Glutaminkonzentration im Kulturmedium von 2 mmol/l auf 200  $\mu$ mol/l führt zu einer Verringerung der HLA-Expression auf Makrophagen um 40 %. Auch andere Oberflächenantigene werden bei verringertem Glutamingehalt des Kulturmediums vermindert exprimiert, wie das Adhäsionsmolekül ICAM-1/CD 54, der hoch affine Rezeptor für IgG (CD 64), die Komplementrezeptoren Typ 3 (CD 11b/CD 18) und Typ 4 (CD 11c/CD 18). Die Expression von

CD 14, CD 71 und CD 16 sind hingegen glutaminunabhängig. Die verringerte Expression von CD 64 ist mit einer verminderten Phagozytose von IgG-opsonierten Ochsenerythrozyten verbunden. Ebenfalls kommt es zu einer Verringerung der Phagozytose von komplementbeladenen Escherichia coli Bakterien [Spittler et al. 1995].

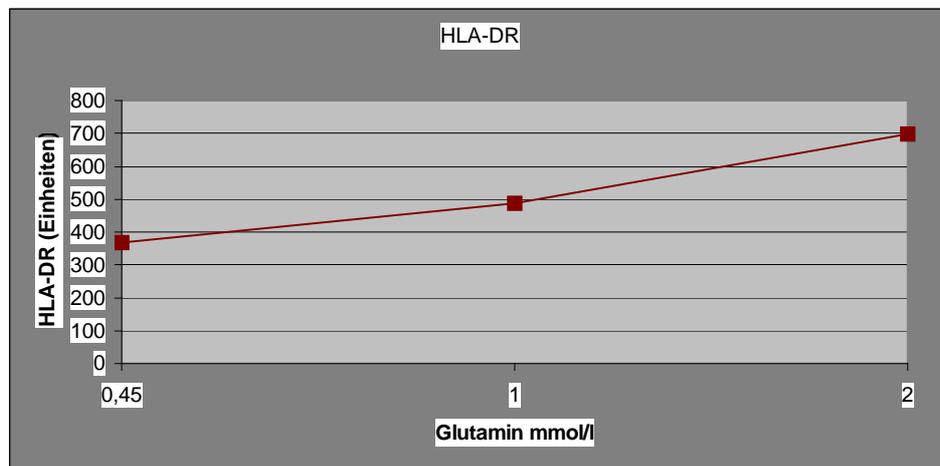


Abb. 6) Glutamin bewirkt in vitro bei Sepsispatienten eine höhere HLA-DR-Expression (nach Spittler et.al. 1997).

Insgesamt scheint es so zu sein, dass gerade jene Funktionen der Makrophagen bei vermindertem Glutaminangebot gestört sind, die eng an die Phagozytose und Antigenpräsentation gebunden sind (Abb. 6).

#### 1.4. Klinische Fragestellung

In der hier vorliegenden Arbeit soll an Patienten in katabolem Zustand, d.h. bei postoperativer Nahrungskarenz nach einer distalen Ösophagus-Resektion mit anschließendem Magenhochzug, überprüft werden, inwieweit sich eine Dauerinfusion einer glutaminhaltigen TPN-Lösung auf immunologische Parameter auswirkt. Eine Vergleichsgruppe wurde mit einer glutaminfreien standardmäßigen TPN ernährt.

Im Allgemeinen galt es die Frage zu klären, ob es Hinweise dafür gibt, dass Glutamin in einer frühen postoperativen Phase Einfluss auf das humorale und zelluläre Immunsystem sowie letztendlich auf klinisch erfassbare Laborparameter und die mikrobielle Besiedelung hat.

Im Einzelnen interessieren folgende Fragestellungen:

- a) Gibt es zwischen Studien- und Kontrollgruppe Unterschiede in der postoperativen Funktion von Makrophagen und Granulozyten?

Dies wurde anhand folgender Parameter überprüft:

- CD 11b, CD 62L und CD 64 auf Monozyten und polymorphkernigen Granulozyten,
- Phagozytose und oxidativer Burst von Monozyten und Granulozyten.

- b) Kommt es in beiden Gruppen zu einer vergleichbaren postoperativen Immunsuppression?

Dies wurde anhand folgender Parameter überprüft:

- IL-4,
- IL-10,
- HLA-DR-Expression auf Monozyten.

- c) Haben die immunologischen Veränderungen Auswirkungen auf klinisch erfassbare Parameter?

Dies wurde anhand folgender Parameter überprüft:

- CRP (C-reaktives Protein),
- PCT (Procalcitonin),
- röntgenologisch erfassbare Lungenveränderungen (entzündliche Infiltrate),
- mikrobielle Besiedelung des Wundgebietes, Urins und Trachealsekrets.

## **2. Material und Methoden**

### **2.1. Allgemeine Formalien**

#### **2.1.1. Bezeichnung der Studie**

Prospektive, kontrollierte, randomisierte Doppelblindstudie zu klinischen und labortechnischen Effekten einer glutaminhaltigen, total-parenteralen Ernährung (TPN) bei postoperativen Patienten in katabolem Zustand.

#### **2.1.2. Stichprobenumfang**

Insgesamt wurden 20 Patienten nach Ösophagus-Resektion in die Studie eingeschlossen. Eine Randomisierung entschied, ob die Patienten eine Standard- oder eine glutaminhaltige TPN erhielten.

#### **2.1.3. Einschlusskriterien**

- eine vorab unterzeichnete Einverständniserklärung der Patienten musste vorliegen,
- es wurden nur Personen über 18 Jahre eingeschlossen,
- kein Einschluss in andere Studien.

#### **2.1.4. Ausschlusskriterien**

- Gesamtüberlebensprognose von weniger als 8 Wochen,
- bei Frauen: Schwangerschaft,
- Einnahme von Steroiden,
- Einnahme von Immunsuppressiva (z.B. nach Transplantationen),
- hämatologisch-immunologische Erkrankungen (z.B. Leukämien).

#### **2.1.5. Studiendurchführung**

Im Rahmen der präoperativen Visite fand ein ausführliches Gespräch statt, in dem die Patienten über Form und Inhalt der Studie informiert wurden. Eine Genehmigung der Ethikkommission lag vor. In einer schriftlichen Erklärung äußerten die Patienten ihr Einverständnis zum Einschluss in die Studie. Bei Frauen im gebärfähigen Alter wurde im Zweifel mit Hilfe eines Stix-Testes eine eventuelle Schwangerschaft ausgeschlossen. Dann erfolgte die doppelblinde Randomisierung der Patienten in eine Gruppe, die eine glutaminhaltige (Studiengruppe) oder aber in eine zweite Gruppe, welche eine standardisierte parenterale Ernährung (Kontrollgruppe) erhielt.

### **2.1.6. Abbruchkriterien**

Die Teilnahme der Patienten an der Studie, inklusive der Entnahme der Blutproben, konnte von den behandelnden Ärzten und Patienten jederzeit abgebrochen werden. Gründe hierfür konnten sein, z.B. zeitliche Zusammenhänge von klinischen Veränderungen mit der Dauerinfusion, die auf eine Unverträglichkeit hinwiesen. Ferner konnte, auch bei Vorliegen einer vorab unterzeichneten schriftlichen Erklärung, auf eine weitere Teilnahme an der Studie verzichtet werden, wenn der Patient Einwände erhob.

### **2.2. Parenterale Ernährung**

Die postoperative Nährstoffzufuhr erfolgte krankheits- und operationsbedingt total parenteral. Aufgrund der hochosmolaren Nährstoffsubstrate erfolgte die Applikation über einen zentralvenösen Verweilkatheter.

Die Studiengruppe erhielt eine glutaminhaltige, die Kontrollgruppe eine glutaminfreie Ernährung. Die übrigen Nährstoffkomponenten (Kohlenhydrate, Fette und Aminosäuren) sowie der Energiegehalt beider Nährlösungen, unterschieden sich nur unwesentlich, um eine Vergleichbarkeit beider Gruppen zu gewährleisten.

Zum Einsatz kamen die kommerziell erhältlichen Aminosäurelösungen Glamin<sup>®</sup> (Baxter) mit dem Dipeptid Glycyl-Glutamin für die Studiengruppe sowie Vamin<sup>®</sup> (Fresenius), eine glutaminfreie Aminosäurelösung, für die Kontrollgruppe. Beide Gruppen erhielten weiterhin Kohlenhydrate, Fette, Vitamine und Spurenelemente in nahezu gleichem Umfang. Appliziert wurden Kaloplasma<sup>®</sup> (Fresenius Kabi), Lipofundin<sup>®</sup> MCT 20 % (Braun), Elotrace<sup>®</sup> (Fresenius Kabi), Soluvit<sup>®</sup> (Fresenius Kabi) und Vitalipid<sup>®</sup> (Fresenius Kabi).

Die einzelnen Komponenten der zwei unterschiedlichen TPN-Lösungen sind in Tabelle 2) separat aufgelistet.

	Tag 0	Tag 0	Tag 1	Tag 1	Tag 2	Tag 2	Tag 3	Tag 3	Tag 4	Tag 4	Tag 5-8	Tag 5-8
	SG	KG	SG	KG								
Glamin					357		535,7		535,7		535,7	
Vamin						444		665,8		665,8		665,8
Kaloplasma											750	750
Lipofundin 20%									375	375	500	500
Glucose 50%					320	320	400	400	400	400		
Elotrace					125	125	125	125	125	125	125	125
Vitalipid Adult									10	10	10	10
Soluvit					10	10	10	10	10	10	10	10
Aqua ad inj.					1188	1101	929	799,2	544,3	414,2	194,3	64,2
Volumen	2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000	2125	2125

Tabelle 2) Nährstoffkomponenten beider Gruppen (SG = Studiengruppe, KG = Kontrollgruppe) Angaben in ml bezogen auf 70 kg Körpergewicht.

Die Zusammensetzung und den Energiegehalt der TPN zeigt Tabelle 3).

	Tag 0	Tag 0	Tag 1	Tag 1	Tag 2	Tag 2	Tag 3	Tag 3	Tag 4	Tag 4	Tag 5-8	Tag 5-8
	SG	KG	SG	KG								
KH (g)	50	50	50	50	160	160	200	200	200	200	225	225
AS (g)					47,9	50,6	71,8	75,8	71,8	75,8	71,8	75,8
Stickstoff (g)					8	8	12	12	12	12	12	12
Lipide (g)									76	76	101	101
Energie (kcal)	200	200	200	200	831	842	1087	1103	1847	1863	2197	2213

Tabelle 3) Zusammensetzung und Energiegehalt der TPN, bezogen auf 70 kg Körpergewicht (AS = Aminosäuren, KH = Kohlenhydrate).

Die Infusionsgeschwindigkeit lag am Tag 1 bis Tag 4 bei 1,4 ml/min/kg Körpergewicht, am Tag 5 bis Tag 8 bei 1,5 ml/min/kg Körpergewicht.

Der Glutamingehalt der Infusionslösung variierte zwischen 0,10 g/kg Körpergewicht/d am Tag 2 und 0,15 g/kg Körpergewicht/d an den Tagen 3-8.

Ab Tag 8 wurden alle Patienten standardmäßig ohne Glutamin identisch weiter ernährt.

## 2.3. Material

### 2.3.1. Materialgewinnung

Neben den klinikinternen Routineparametern, wie die Kontrolle von Elektrolyten oder Entzündungsparametern, wurden separat Blutproben zur Untersuchung immunologischer Faktoren entnommen sowie Material zur mikrobiologischen Untersuchung asserviert (Wundabstriche, Katheterurin, Trachealsekret). Eine erneute Punktion oder getrennte Blutentnahmen waren in der Regel nicht notwendig. Des Weiteren wurden im Beobachtungszeitraum Röntgenkontrollen auf intrapulmonale Infiltrationen durchgeführt (Tabelle 4).

Tag	-1	0	1	2	3	4	5	6	7	8
Routinelabor	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
FACS/Immunoassay	0	0	0	X	0	X	0	X	X	0

Tabelle 4) Zeitpunkte der Materialgewinnung. Tag -1 = präoperativer Tag, Tag 0 = Operationstag, Tag 1 = postoperativer Tag, usw. (x = nicht erfolgte Messung).

Die Blutentnahmen wurden über zentral-venöse Katheter (Blue Flex Tip, Firma Arrow) im Bereich der Venae jugulares internae oder der Venae subclaviae mittels Adapter und Steckverbindungen des Monovetten<sup>®</sup>-Systems (Firma Saarestedt, Nümbrecht) durchgeführt. Dabei kamen drei- und vierlumige zentrale Venenkatheter mittels Seldinger-Technik zur Anwendung. Weitere Blutentnahmen erfolgten aus arteriellen Kathetern (Baxter Mod. 96B-020-5F G) der Arteriae radiales und femorales. Die Blutentnahme am Tag -1 erfolgte durch Punktion der Venae cubitalis.

### 2.3.2. Routinelabor

Die Routinelaboruntersuchungen wurden dem hauseigenen Institut für Klinische Chemie zugeführt und nach den dort üblichen Standards analysiert. Untersucht wurden zusätzlich Messdaten zur Berechnung der Stickstoffbilanz und des Serumglutaminspiegels.

Die Stickstoffbilanz wurde nach der folgenden Formel errechnet:

$$(1) \text{ UNP} = \text{UUN} + \text{BUN} \times \text{F} \times \text{kg Körpergewicht}$$

$$(2) \text{ N}_2\text{-Bilanz} = \text{Aminosäure-Zufuhr (g)} / 6,5 - \text{UNP (g)} \times 100 / 80 + 2 \text{ g bis } 6 \text{ g}$$

UNP = Harnstoff-N-Produktionsrate; UUN = Harnstoff-N-Konzentration/24h im Urin; BUN = Serumharnstoff; F = Körperwasserfaktor (Männer 0,6; Frauen 0,55).

### **2.3.3. Mikrobiologische Materialgewinnung und Röntgenthorax**

Die mikrobiologische Materialgewinnung erfolgte mit den auf der Station für operative Intensivmedizin standardmäßig verwendeten und für die Entnahme und Transport üblichen Medien. Die anschließende Weiterverarbeitung erfolgte im hauseigenen Institut für Mikrobiologie.

Im Einzelnen wurden Wundabstriche, Katheterurin und Trachealsekret gewonnen. Die radiologische Untersuchung der Lungen beinhaltete die Erfassung von Infiltrationen beider Lungen, im Sinne von radiologisch erfassbaren entzündlichen Verdichtungsbezirken. Zu diesem Zweck wurden die Lungen in je vier Quadranten unterteilt und der jeweilige Nachweis eines Infiltrats als Quadrantenbefall registriert.

### **2.3.4. Materialien für zusätzliche immunologische Untersuchungen**

Bei den zusätzlichen Blutentnahmen wurden entnommen (Angaben jeweils für vollständig gefüllte Blutröhrchen):

- 1) eine EDTA BB-Monovette<sup>®</sup> (Firma Saarestedt, Nürnberg)
- 2) eine Serum-Monovette<sup>®</sup> (Firma Saarestedt, Nürnberg)
- 3) mit einer 20 ml Spritze gewonnenes Vollblut
- 4) 1 ml Vollblut auf eine 2 ml Spritze mit 1 ml gekühlter Heparinverdünnung (1:500)
- 5) eine Heparin-Lithium Monovette<sup>®</sup>

Die weitere Bearbeitung der Blutproben beinhaltete:

Zu 1) siehe 2.4.1.2.

Zu 2) Zentrifugation

10 ml Vollblut bei 2000 rpm (rotations per minute) und 4 °C 10 min lang zu zentrifugieren, auf jeweils 1 ml in 10 Eppendorfgefäße zu verteilen, zu vortexen und bei -80 °C zu gefrieren.

- 2 ml Vollblut entsprechend den Patienten fortlaufend zu nummerieren und bei -80 °C zu lagern.

- (siehe unter 2.4.2.2.)

## 2.4. Spezielle immunologische Untersuchungen

### 2.4.1. Durchflusszytometrie

#### 2.4.1.1. Prinzip der Durchflusszytometrie

Um die zahlreichen Subpopulationen der Leukozyten differenzieren zu können bzw. um gewisse Funktionszustände von Zellen anhand ihrer Oberflächenmarker-Expression zu definieren, benutzt man Durchflusszytometer. Hierbei werden monoklonale Antikörper verwendet, die mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt sind. Auf diese Weise können Zellen einer bestimmten Population detektiert werden. Die so gekennzeichneten Zellen werden in einem großen Volumen mittels Pressluft durch eine Kanüle gedrückt, aus der sie in eine Probenkammer geschleust werden (Probenstrom). Ein Hüllstrom aus entgastem Wasser (sogenannter Sheath) bewirkt in der Kapillare mit dem Probenstrom eine laminare Strömung, in dem die Zellen nun, quasi im "Gänsemarsch", hintereinander perlschnurartig aufgereiht sind („beads on a string“). In der Probenkammer werden die Zellen nach dem Prinzip der hydrodynamischen Fokussierung durch einen Laserstrahl geführt und so zur Eigenfluoreszenz angeregt. Diese Signale werden von einem optischen Detektionssystem aus Photodioden und Photomultiplier Tubes (PMT) erfasst und in elektrische Impulse umgewandelt.

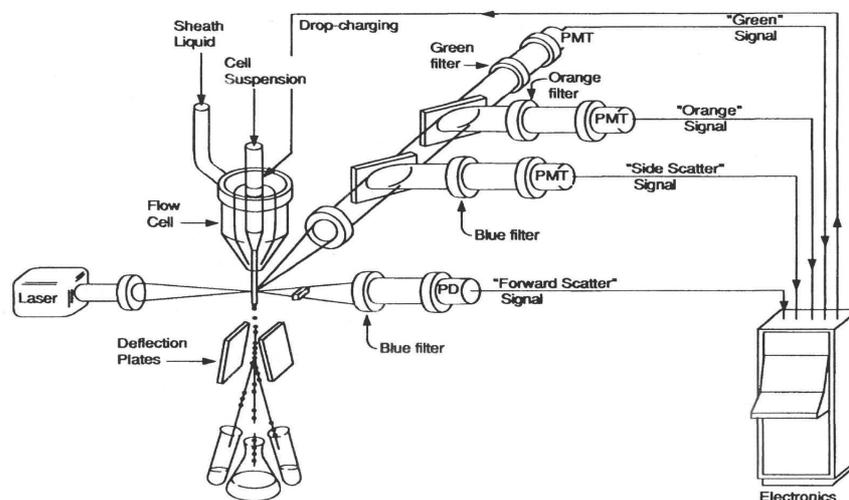


Abb. 7) Funktionsprinzip eines Durchflusszytometers. Der Laserstrahl wird in der Probenkammer an den vorbeigeführten Zellen in zwei Richtungen gebrochen: in Richtung des Lasers (FSC) und in eine Richtung orthogonal zum Laser und zum Flüssigkeitsstrom. Nach weiterer Fokussierung mittels Strahlteiler und Dicroitspiegel und dem Passieren eines Filters erreichen die Strahlen des FSC den FSC-Photodetektor und die Strahlen des SSC den SSC-PMT sowie die PMT der Fluoreszenzen. Im Anschluss werden die Signale digitalisiert, verstärkt und in Kanäle entsprechend ihrer Intensität eingeteilt. FSC = Forward Scatter; SSC = Sidescatter; PMT = Photomultiplier Tube (nach Givan A.L.; Flow Cytometry: First Principles, 2001) .

Nach einer zwischengeschalteten Signalverstärkung, welche sowohl logarithmisch als auch linear erfolgen kann, laufen die Signale durch einen A/D-Wandler, welcher eine Einteilung in bis zu 1024 Kanäle entsprechend der Impulsintensität ausführt. Auf diese Weise wird jeder Zelle eine bestimmte Kombination optischer Eigenschaften zugeordnet.

Die optischen Eigenschaften werden in zwei Kategorien unterteilt: Das Streulicht und die Fluoreszenz. Beim Streulicht handelt es sich um eine Lichtbrechung in Richtung des Laserstrahls (Forward-Scatter, FSC) sowie eine Brechung orthogonal zu dieser Richtung und auf die Richtung des Flüssigkeitsstroms (Side-Scatter, SSC). Die Vorwärtsstreuung wird über Photodioden gemessen und gibt Auskunft über die Zellgröße, während das Seitwärtsstreulicht über die PMT aufgenommen wird und Aussagen über die Granularität und Membranfaltung möglich macht. Der Bezeichnung FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting) ist eine geschützte Handelsmarke der Firma Becton & Dickinson.

Bei der zweiten optischen Eigenschaft, der Fluoreszenz, handelt es sich um Lichtenergie, die nach Strahlenabsorption durch ein Fluorochrom in Form von Emission wieder abgegeben wird. Diese Emission wird von der PMT gemessen und ist aufgrund des Stokes-Shift immer etwas langwelliger und energieärmer als die Absorptionsenergie. Da Absorption und Emission substanzspezifische Spektren aufweisen, kann durch unterschiedliche Fluorochrome mit einheitlichem Absorptionsspektrum - aber verschiedenen Emissionsspektren - mit einer einzigen Lichtquelle gearbeitet werden.

In dieser Studie wurden zwei unterschiedliche Fluorochrom-markierte Antikörper verwendet:

- FITC (Fluoresceinisothiocyanat) mit einem Absorptionsmaximum bei 495 nm und einem Emissionsmaximum bei 525 nm. Die Eigenfluoreszenz ist grün.
- PE (R-Phycoerythrin) mit zwei Absorptionsmaxima bei 488 nm und 565 nm, und einem Emissionsmaximum bei 578 nm. Die Eigenfluoreszenz ist orange bis rot.

#### **2.4.1.2. Materialien und Protokolle für die FACS-Oberflächenmolekülanalyse**

Das EDTA-Blut wurde unmittelbar nach der Blutentnahme weiter verarbeitet. Eine Messreihe beinhaltete jeweils drei Messwerte:

- Ein Messwert zum „Gating“ der Leukozytenklassen mittels Simultest™ LeucoGATE™ (Firma Becton & Dickinson, USA, Katalognummer 340040) - Leukozytenmarkierung mit einem CD 45FITC/CD 14PE Antikörpergemisch zur Abgrenzung der einzelnen Leukozyten-subpopulationen, um spezifische und unspezifische Bindungen der monoklonalen Antikörper an den einzelnen Subpopulationen oder anderweitigen Zellen oder Zellbestandteile zu beurteilen

und abgrenzen zu können. Dazu wurden 20 µl des Antikörpergemisches und 100 µl EDTA-Blut in ein Röhrchen (Falcon® tubes, Becton & Dickinson, Katalognummer 2058) verbracht.

- Eine Negativkontrolle mit einem unspezifischen IgG<sub>1</sub> FITC-markierten Mausantikörper (Becton & Dickinson, Katalognummer 349041), um unspezifische Reaktionen des monoklonalen Antikörpers herauszufiltern. Dazu wurden 20 µl des IgG<sub>1</sub> FITC-markierten Antikörpers mit 100 µl EDTA-Blut versetzt.

- Die eigentliche Messprobe mit dem jeweiligen zu untersuchenden humanen fluoreszenzmarkierten Antikörper (Tabelle 5). Dazu wurden 20 µl des Antikörpers mit jeweils 100 µl EDTA-Blut in ein Röhrchen (Falcon® tubes, Becton & Dickinson, Katalognummer 2058) verbracht.

Das Prozedere war für alle Antikörperuntersuchungen identisch und wurde zeitgleich und unter gleichen Bedingungen durchgeführt.

Nach Einbringen der Proben und Zusatz der Reagenzien wurde der Rand des Gefäßes gesäubert und der Inhalt durchmischt. Im Anschluss wurden die Proben zwanzig Minuten bei 4 °C lichtverschlossen gelagert.

Nach Ablauf der Zeit wurde jedes Röhrchen mit jeweils 2 ml FACS™ Lysing Solution (Becton & Dickinson, Katalognummer 349201) versehen, 3 Sekunden lang durchmischt und 10 Minuten bei Raumtemperatur und lichtverschlossen inkubiert.

Anschließend wurden die Proben bei 1200 rpm und 4 °C fünf Minuten lang zentrifugiert, der flüssige Überstand verworfen und mit jeweils 3 ml CellWASH-Lösung (Becton & Dickinson, Katalognummer 349524) versehen und durchmischt.

Danach folgte eine weitere Zentrifugation der Proben bei 1200 rpm bei 4 °C und fünf Minuten. Anschließend wurde der Überstand abermals verworfen und die im Röhrchen verbliebenen Zellpellets mit 0,5-1 ml CellWASH-Lösung, je nach initialer Zellzahl (Differentialblutbild), aufgeschwemmt und der FACS-Analyse zugeführt.

Zur Verwendung kam ein FACScan® Durchflusszytometer der Firma Becton & Dickinson, USA, Katalognummer 34001010.

Antikörper	Target	Fluorchrom	Hersteller	Katalog
CD 45/CD 14	Leukozyten, LeucoGATE®	FITC/PE	B&D, USA	340040
CD 14	Monozyten	PE	B&D, USA	555398
CD 11b	C3b-Rezeptor	PE	B&D, USA	555388
HLA-DR	MHC-Klasse-II-Molekül	FITC	B&D, USA	347363
CD 62L	L-Selektin-Rezeptor	FITC	B&D, USA	555543
CD 64	Fc $\gamma$ -Rezeptor-I	FITC	B&D, USA	555527

Tabelle 5) Verwendete Antikörper der Durchflusszytometrie in der Übersicht (B&D = Firma Becton & Dickinson, USA).

Die Analyse und Darstellung der Messwerte erfolgte mit dem Programm CELLQuest® (Firma Becton & Dickinson, USA). Die Darstellung der Messwerte geschah als Dot-Plot, einer Methode, in der jede signalgebende Zelle bzw. jedes signalgebende Material als Punkt in einem zweidimensionalen Koordinatensystem dargestellt wird.

Mit Hilfe der Forward- und Side-Scatter-Funktionen und des LeucoGate® konnten die einzelnen Populationen (Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten) getrennt werden (Abb. 8) und im anschließenden Gating hinsichtlich ihrer Oberflächenmolekülbeschaffenheit untersucht werden.

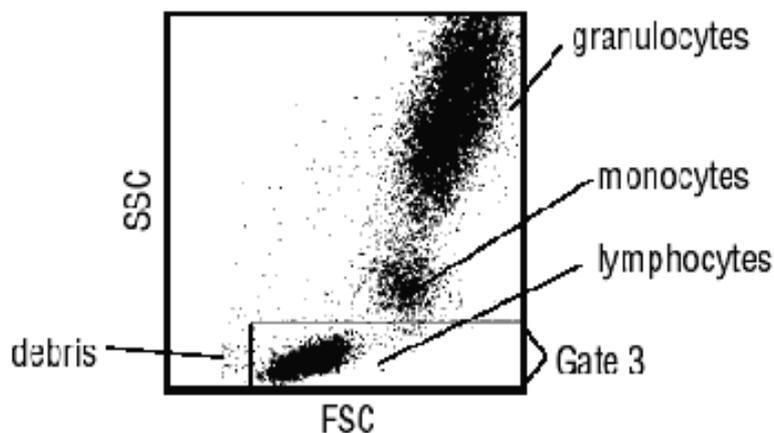


Abb. 8) Blutzellpopulationen in der Dot-Plot-Technik (SSC = Side Scatter, FSC = Forward-Scatter).

### **2.4.1.3. Materialien und Protokolle für den Phagozytose-/oxidativen Burst-Test**

Das Blut aus den Lithium-Heparinröhrchen wurde in zwei Gruppen aufgeteilt. In einer Messreihe wurde die Phagozytosefähigkeit von Makrophagen und Granulozyten (Phagozytostest) getestet, in einer zweiten Reihe die Produktion von freien Radikalen (oxidativer Burst-Test) durch dieselben Zellen.

Für den PHAGOTEST® (Firma OrPeGen, Deutschland; Katalognummer 10-0100) wurden 2x100 µl Lithium-Heparinblut mit jeweils 20 µl FITC-markierten Escherichia coli versetzt und gründlich durchmischt. Anschließend wurden die Proben fünfzehn Minuten lang auf Eis gekühlt. Ein Röhrchen verblieb im Anschluss auf dem Eis ((a) Kontrolle) die andere Probe wurde exakt zehn Minuten in einem Wasserbad von 37 °C geschüttelt (b).

Danach wurde diese Probe sofort in das Eisbad zurückgestellt und beiden Proben, methyleinblauhaltige QUENCHING SOLUTION unter Durchmischung hinzugefügt. Dadurch wurde zum einen der Prozess der Phagozytose gestoppt, und zum zweiten verloren nichtphagozytierte Escherichia coli ihre Fluoreszenz. Anschließend wurde der flüssige Überstand mittels Unterdruck abgesaugt und zweimal mit WASHING SOLUTION gewaschen und jeweils bei 1200 rpm bei 4 °C drei Minuten lang zentrifugiert.

Für den oxidativen Burst-Test (PHAGOBURST™ Firma OrPeGen, Deutschland; Katalognummer 10-0200) erfolgte ein getrennter Ansatz mit jeweils 4 Proben 100 µl Lithium-Heparinblut und (a) 20 µl WASHING SOLUTION (Kontrolle), (b) 20 µl nichtmarkierte Escherichia coli, (c ) 20 µl des chemotaktischen Peptids N-formyl-MetLeuPhe (fMLP) als niedrigen physiologischen Stimulus und (d) 20 µl des Proteinkinase C Liganden Phorbol 12-Myristat 13-Acetat (PMA) als starken Stimulus. Diese Proben wurden nach Durchmischung für zehn Minuten ebenfalls bei 37 °C in einem Wasserbad geschüttelt. Im Anschluss daran wurde den Proben 20 µl einer dihydrorhodaminehaltigen Substratlösung zugesetzt und anschließend wieder zehn Minuten in einem Wasserbad bei 37 °C inkubiert.

Nachfolgend wurden die Proben des Phagozytose- wie des Burst-Tests gemeinsam behandelt. Alle Ansätze wurden mit 2 ml Lysierlösung (FACS-Lyse) lysiert, durchmischt und zwanzig Minuten bei Raumtemperatur und in Dunkelheit inkubiert. Dann wurde der Überstand bei 1200 U/min und 4 °C fünf Minuten lang zentrifugiert, mit PBS gewaschen und abermals bei 1200 rpm und 4 °C drei Minuten lang zentrifugiert. Darauf folgend wurden alle Proben mit 100 µl einer propidiumjodidhaltigen DNA-Färbelösung versetzt und zehn Minuten bei 0 °C inkubiert. Die anschließende Messung am FACS-Gerät erfolgte in 500 µl PBS und innerhalb

von dreißig Minuten nach Färbung. Die Messung und Analyse der Werte erfolgte mit demselben Gerät und identischer Software wie unter 2.4.1.2..

Im Streulichtdiagramm (Abb. 8) wurden die Granulozytenpopulation, respektive die Monozytenpopulation eingegrenzt und deren Fluoreszenz im Punktediagramm dargestellt.

## **2.4.2. Immunoassays**

### **2.4.2.1. Prinzip der Immunoassays**

Bei den heute im Allgemeinen verbreiteten Immunoassays handelt es sich um so genannte Assays in Festphasentechnik und/oder ELISA- (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assays) Technik. Das sind immunologische Testverfahren, bei denen die Konzentration eines Analyten über die Aktivitätsbestimmung eines Markerenzym ermittelt wird. Die Analyten sind dabei häufig niedermolekulare, zumeist Proteinmoleküle in flüssiger Phase und diese werden als das zu untersuchende Antigen definiert. Im Gegensatz zu anderen Nachweismethoden wird das gesuchte Antigen jedoch nicht direkt nachgewiesen, sondern durch einen entsprechend korrespondierenden Antikörper.

Die kommerziell erhältlichen Testkits sind also aus einer festen Phase (meist ein Antikörper oder Antigen) und/oder einer flüssigen Phase (Antikörper oder Antigen) aufgebaut. In der einen Phase ist ein monoklonaler Antikörper eingebracht, der gegen das zu untersuchende Analyt gerichtet ist, dieses erkennt und bindet. Nachdem die kovalente Bindung erfolgt ist, wird in einem zweiten Schritt ein Antikörper derselben Spezifität im Überschuss hinzugefügt, der sich in einer flüssigen Phase befindet, aber an seiner konstanten Region mit einem radioaktivem Material (RIA) oder aber einem Enzym (ELISA), z.B. Peroxidasen, gekoppelt ist. Dieses Prinzip wird auch als Sandwichprinzip bezeichnet, da sich das zu untersuchende Analyt zwischen zwei Antikörpern befindet. In einem dritten Schritt wird dann die Nachweisreaktion durchgeführt, sei es als Messung radioaktiver Strahlung (RIA) oder oftmals als Extinktionsänderung einer chemischen Reaktion, katalysiert durch ein entsprechendes Enzym (ELISA).

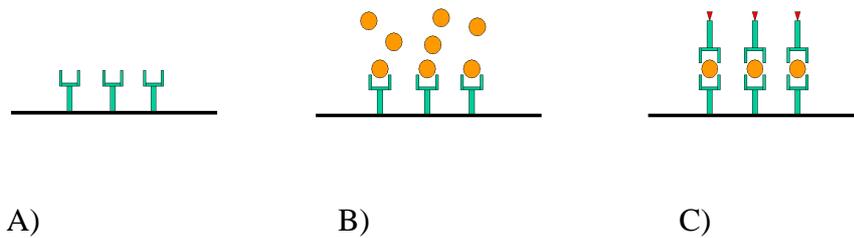


Abb. 9) Schematische Darstellung ELISA. A: festphasengebundener Antikörper; B: Antikörper-Antigen-Immunkomplex; C: "Sandwich" festphasengebundener Antikörper-Antigen-enzymmarkierter Antikörper.

Durch verschiedene Kombinationen der Reaktionspartner, seiner Konzentrationen und Reaktionsbedingungen sind vielerlei unterschiedliche Ansätze möglich. Daher existieren die ELISA in verschiedenen Varianten: kompetitiv-nichtkompetitiv, Antigen oder Antikörper an der Festphase gebunden, Verwendung polyklonaler Antiseren, gereinigt durch Absättigung oder Affinitätschromatographie bzw. nicht gereinigt oder der Verwendung monoklonaler Antikörper.

#### 2.4.2.2. Materialien und Protokolle für die Immunoassays

Die entsprechenden Serumproben zur Bestimmung freier Rezeptoren und Zytokine wurden aus in Serum-Monovetten<sup>®</sup> entnommenem Vollblut gewonnen, das Serum anschließend bei einer Temperatur von  $-80\text{ °C}$  bis zur weiteren Verarbeitung aufbewahrt. Zum Einsatz kamen kommerziell erhältliche ELISA-Testkits.

Test	Hersteller	Katalognummer
IL-4	R&D Systems	D4050
IL-10	R&D Systems	D1000B
ICAM-1	R&D Systems	BBE1B
e-Selektin	R&D Systems	BBE2B

Tabelle 6) ELISA Testkits (IL = Interleukin), R&D Systems Minneapolis; USA; PharMingen San Diego, USA.

Für die Bestimmung der Interleukine, e-Selektin und ICAM-1-Rezeptor kam die oben beschriebene quantitative Sandwich-Immunoassay-Technik zur Anwendung. Alle Messreihen wurden in doppelter Ausführung und nach den Anweisungen der jeweiligen Anbieter durchgeführt.

Die einzelnen Arbeitsschritte beinhalteten:

100 µl Assaylösung wurde in alle Vertiefungen der Testplatten verbracht und mit 100 µl Standardlösung (je nach Untersuchung) oder Probenmaterial pro Lochreihe versehen. Anschließend erfolgte die zweistündige Inkubation bei Raumtemperatur, bei der die Bindung der zu untersuchenden Substanz an die Antikörper der festen Phase erfolgte. Nach Ablauf der Zeit erfolgte die gründliche Reinigung der Mikrotiterplatte von Proben und Standardmaterial mittels 400 µl Pufferlösung sowie manuell das Abpipettieren der Restflüssigkeit. Danach fand die Zugabe des Enzym-gekoppelten Antikörpers für die jeweilige Messreihe statt. Daran schloss sich eine zweite, zwei Stunden dauernde Inkubationszeit an, in der die Bindung der markierten Antikörper am Substrat erfolgte. Vor der Färbung der Proben wurden diese erneut mit der Pufferlösung gespült, um etwaige Reste zu entfernen. Nach der Trocknung wurden 200 µl Farbreagenz hinzugefügt und die Proben für zwanzig Minuten inkubiert. In dieser Zeit erfolgte der Farbumschlag. Anschließend wurden 50 µl einer Stopplösung zugegeben, um die enzymkatalysierte Farbreaktion zu stoppen. Die photometrische Messung erfolgte mit einem Plattenlesegerät (Typ Dynatec MR 500) bei einer Wellenlänge von 450 nm. Mit Hilfe der Extinktionswerte der jeweiligen Standardlösungen, die parallel zur eigentlichen Messreihe durchgeführt worden waren, konnten Standardkurven ermittelt werden, anhand derer die Konzentration des zu untersuchenden Agens ermittelt wurde.

Die Bestimmung der Procalcitonin-Konzentration erfolgte mit dem LUMItest®PCT (Brahms Diagnostica, Berlin) und stellt einen Immunoluminometrischen Assay (ILMA) dar, der sich im wesentlichen von der ELISA-Technik dadurch unterscheidet, dass zwei spezifische monoklonale Antikörper im Überschuss hinzugefügt werden, wobei einer am Calcitonin-, der andere am Katalcalcinanteil des PCTs bindet, einer der beiden Antikörper ein lumineszenzmarkierter Tracer ist, der andere an der Innenseite des Probenröhrchens fixiert. Nach Applikation von lumineszierenden Substanzen kann in einem Luminometer das Lumineszenzsignal bestimmt werden und mittels Standardkurven die Konzentration des PCTs ermittelt werden.

## **2.5. Statistische Auswertung**

Bei den vorliegenden Daten handelt es sich um nicht repräsentative Stichproben, da die Auswahl der betreffenden Personen anhand ihrer Erkrankung erfolgte und die Gesamtzahl der Patienten mit jeweils zehn pro Gruppe relativ gering war. Es wurden daher nichtparametrische Analysemethoden angewandt.

Alter und Gewicht wurden als annähernd normalverteilte Daten angesehen, die Ergebnisse als Mittelwert mit entsprechenden Standardabweichungen angegeben. Die Prüfung auf Signifikanz erfolgte mit dem Mann-Whitney-U-Test (MWU). Die Unterschiede der Geschlechter in beiden Gruppen wurden mit dem Chi-Quadrat-Test analysiert.

Bei den immunologischen Daten wurden die Messwertreihen zunächst auf Veränderungen der jeweilig zu untersuchenden Messgröße pro Gruppe und Tag mit dem Wilcoxon-Test für abhängige Stichproben, im gesamten Verlauf mit dem Friedman-Test für abhängige Stichproben untersucht. Die Gruppenunterschiede pro Tag in Bezug auf den jeweiligen Messwert wurden mittels Mann-Whitney-U-Test (MWU) für unabhängige Stichproben analysiert. Die Auswertung der infektiologischen Daten (Röntgen-Thorax, Wundabstriche, Katheterurin und Trachealsekret) erfolgte im Gruppenvergleich mit dem Kruskal-Wallis-Test für ordinale, respektive nominale Daten. Da die infektbiologischen Daten Trends aufwiesen, wurden diese weiter mit dem exakten Test nach Fisher analysiert. Die Signifikanzgrenze wurde in allen Tests mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p < 0,05$  festgelegt.

Alle statistischen Analysen wurden mit dem Programm SPSS<sup>®</sup> (Statistical Package for the Social Science, Version 11.0, Chicago USA) durchgeführt.

### **3. Ergebnisse**

#### **3.1. Patientendaten**

Insgesamt wurden 20 Patienten in die Studie eingeschlossen, davon 4 Frauen und 16 Männer im Alter von 50 bis 79 Jahren (Frauen: Altersspanne 53 bis 78 Jahre; Median 65,5 Jahre; Mittelwert 65,5 Jahre; Männer: Altersspanne 50 bis 70 Jahre; Median 60,5 Jahre; Mittelwert 60,25 Jahre). Zwei Patienten starben während des stationären Aufenthaltes aber außerhalb des Beobachtungszeitraums.

In der Glutamingruppe wurden 9 Männer (Altersspanne 52-70 Jahre; Median 57 Jahre; Mittelwert 60,1 Jahre) und eine Frau (Alter 70 Jahre) randomisiert. Daraus ergeben sich für die Glutamingruppe folgende statistische Werte:

Männer:Frauen 9:1; Altersspanne 52-70 Jahre; Median 57 Jahre; Mittelwert 61,4 +/- 0,5 Jahre.

In der Kontrollgruppe wurden 7 Männer (Altersspanne 50-68 Jahre; Median 62 Jahre; Mittelwert 60,42 Jahre) und 3 Frauen (Altersspanne 53-78 Jahre; Median 61 Jahre; Mittelwert 64 Jahre) randomisiert. Daraus ergeben sich für die Kontrollgruppe (Standard-TPN) folgende statistischen Größen:

Männer:Frauen 7:3; Altersspanne 50-78 Jahre; Median 61 Jahre; Mittelwert 61,5 +/- 0,33 Jahre.

In beiden Gruppen konnten für das mittlere Alter ( $p=0,33$ ) und für das Geschlecht ( $p=0,26$ ) keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden.

Hinsichtlich der Gewichtsverteilung in der Glutamingruppe und der Kontrollgruppe, die eine Standardformel in der totalen parenteralen Ernährung ohne Zusatz von Glutamin erhielt, konnten ebenfalls keine signifikanten Unterschiede ermittelt werden, wie Abbildung 10 verdeutlicht.

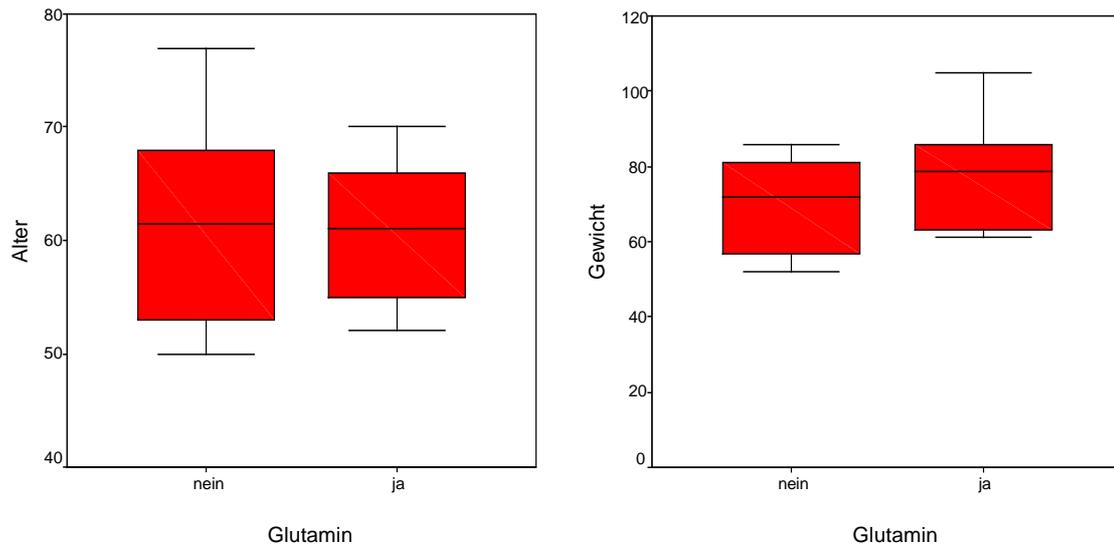


Abb. 10) Box-Plot Darstellung von Alter (in Jahren) und Gewichtsverteilung (in kg) am Tag -1 in beiden Gruppen (Gewicht: Glutamingruppe Mean 77,84 +/- 3,12 und Kontrollgruppe 70,2 +/- 2,71 (p=0,12)).

Andere Ergebnisse zeigen die Dauer des Aufenthaltes auf der Intensivstation (ITS) und der stationären Behandlungsdauer. Hier sind zwei Ausreißer in der Glutamingruppe zu konstatieren, die zu einer Verfälschung des arithmetischen Mittels führen, der Median weist jedoch annähernd gleiche Werte auf (Abb. 11).

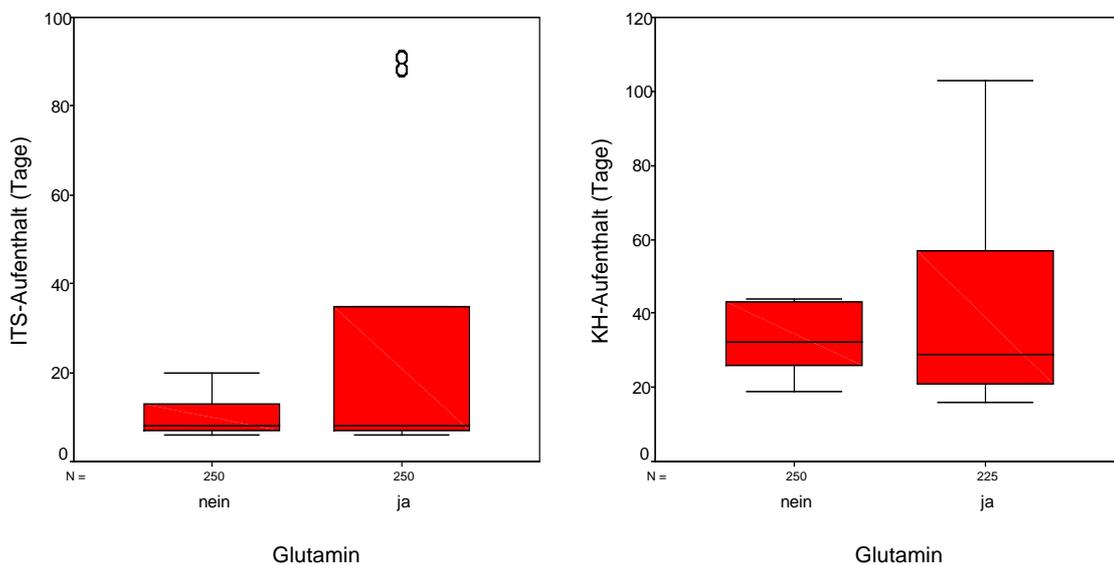


Abb. 11) Box-Plot Darstellung von ITS Aufenthalt und Krankenhausaufenthalt mit Median (schwarz), Quartilen und Ausreißern (p=0,59 und p=0,74).

### 3.2. Glutaminspiegel und Stickstoffbilanz

Zur Interpretation der ausgewerteten Daten war der Glutaminspiegel im peripheren Blut von Interesse, um einerseits den Verlauf im Allgemeinen und andererseits in Bezug auf die weiteren Messdaten interpretieren zu können (Abb. 12). Beide Gruppen zeigen von Tag 1 bis Tag 5 einen signifikanten Abfall der Glutaminkonzentration im peripheren Blut. Ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen ist hingegen nicht zu beweisen.

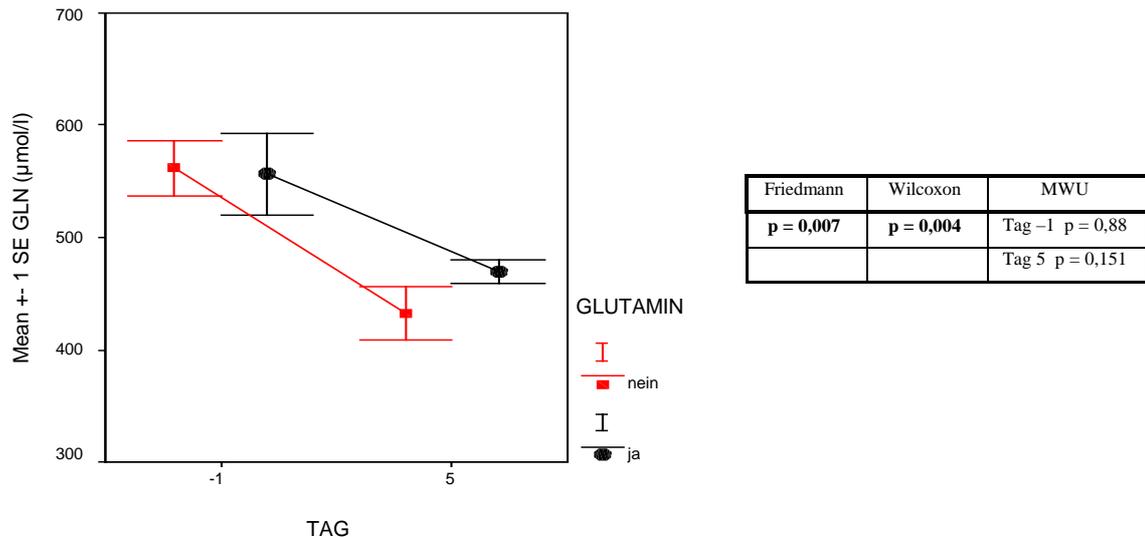
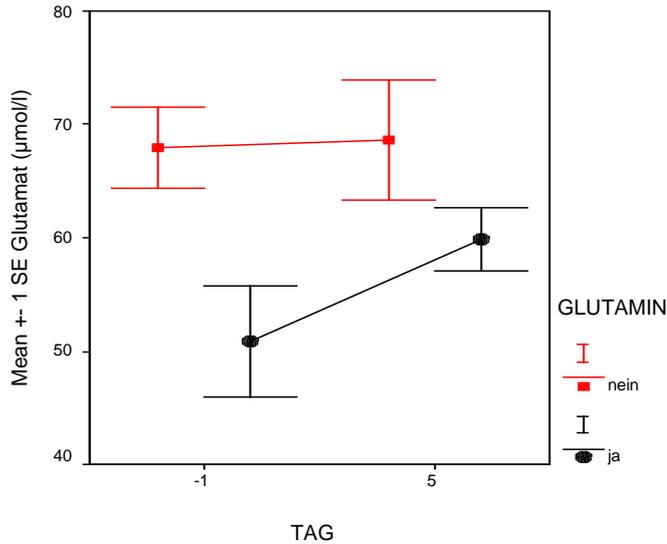


Abb. 12) Glutaminplasmaspiegel (GLN) in  $\mu\text{mol/l}$  beider Gruppen ( $p < 0,05$ , signifikante Werte hervorgehoben).

Der unmittelbare Metabolit, der aufgrund einer Desaminierungsreaktion aus Glutamin entsteht, ist Glutaminsäure (Glutamat).

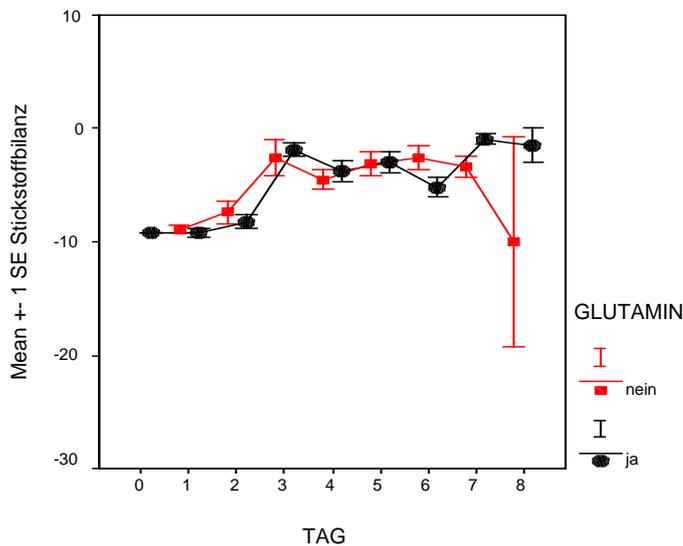
In den Serumkonzentrationen von Glutamat findet sich keine signifikante Konzentrationsänderung (Abb. 13). Auch im Gruppenvergleich am Tag 5 ist kein signifikanter Unterschied zu eruieren. Die Unterschiede der Glutamatkonzentrationen am Tag -1 sind nicht auf den Einfluss des parenteral zugeführten Glutamins zurückzuführen.



Friedmann	Wilcoxon	MWU
p = 0,371	p = 0,478	Tag 5 p = 0,648

Abb. 13) Glutamatplasmaspiegel in µmol/l beider Gruppen (p<0,05).

Die zusätzliche Glutamingabe sollte einen Effekt auf die Stickstoffbilanz haben. Die Abbildung 14 zeigt bei der Kontroll- wie Studiengruppe eine negative Bilanz über den gesamten postoperativen Verlauf. Eine signifikante Verbesserung der Stickstoffbilanz konnte in keiner der beiden Gruppen festgestellt werden.



Friedman	Wilcoxon	MWU
n. d.	n. d.	Tag -1 /
		Tag 0 /
		Tag 1 p = 1
		Tag 2 p = 0,402
		Tag 3 p = 0,368
		Tag 4 p = 0,600
		Tag 5 p = 0,873
		Tag 6 p = 0,563
		Tag 7 p = 0,347
		Tag 8 p = 0,480

Abb. 14) Stickstoffbilanz beider Gruppen (p<0,05, Friedman- und Wilcoxon-Test waren nicht durchführbar).

### 3.3. Leukozyten

Blutbildveränderungen sind obligate Beobachtungen nach einer mit einer Entzündungsreaktion einhergehenden, traumatischen Schädigung. Als „Mausergewebe“ beinhaltet die Funktionalität immunkompetenter Zellen auch die zahlenmäßige Veränderung der zirkulierenden Population. Dabei verhalten sich die einzelnen Leukozytenpopulationen unterschiedlich, wie die nachfolgenden Abbildungen zeigen.

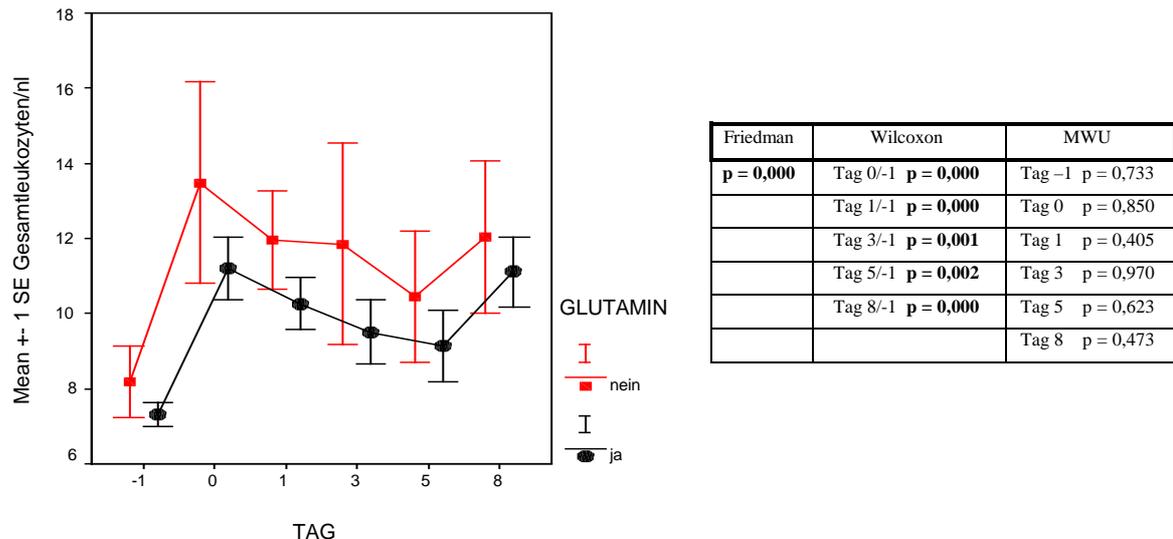
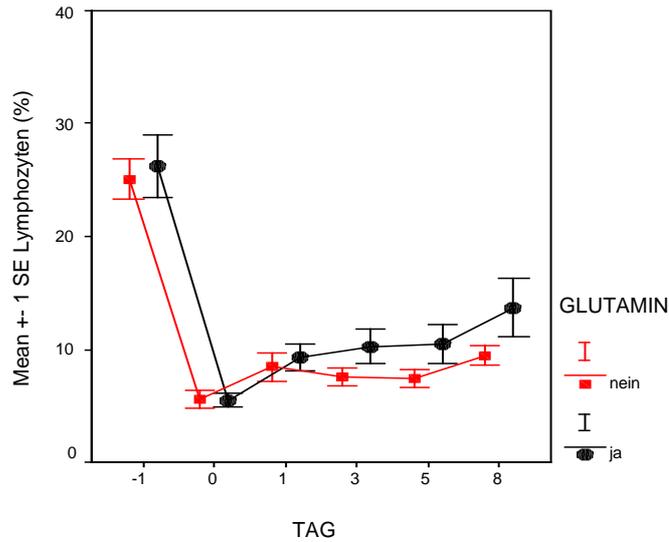


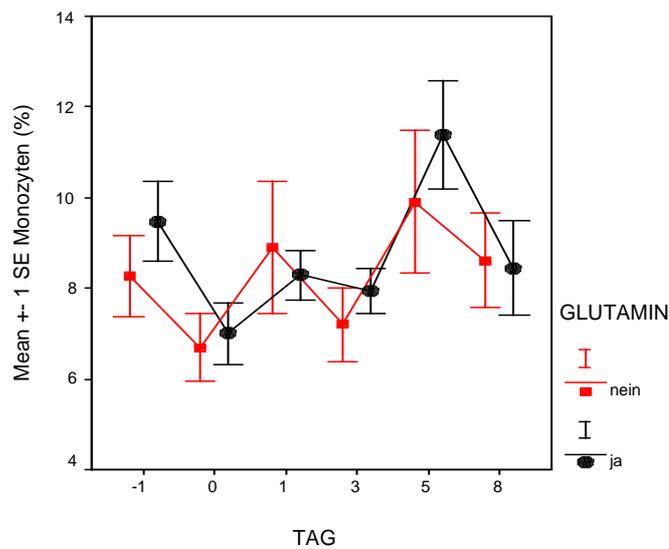
Abb. 15) Gesamtleukozyten pro nl ( $p < 0,05$ , signifikante Werte hervorgehoben).

Die Abbildung 15 zeigt den Gesamtleukozytenverlauf beider Gruppen und einen signifikanten Anstieg der Leukozytenzahlen am Tag der Operation. Dieser ist in der Hauptsache auf den Anstieg der polymorphkernigen Granulozyten (PMN) zurückzuführen, während die Monozyten nur einen signifikanten Anstieg am Tag 1 zeigen. Die Lymphozyten am Tag 0 sind signifikant vermindert. Diese „relative Lymphopenie“ bleibt bis zum Ende der Beobachtungszeit bestehen und die Ausgangswerte werden nicht wieder erreicht (Abb. 16 bis Abb. 18). Signifikante Unterschiede zwischen beiden Studiengruppen sind nicht existent.



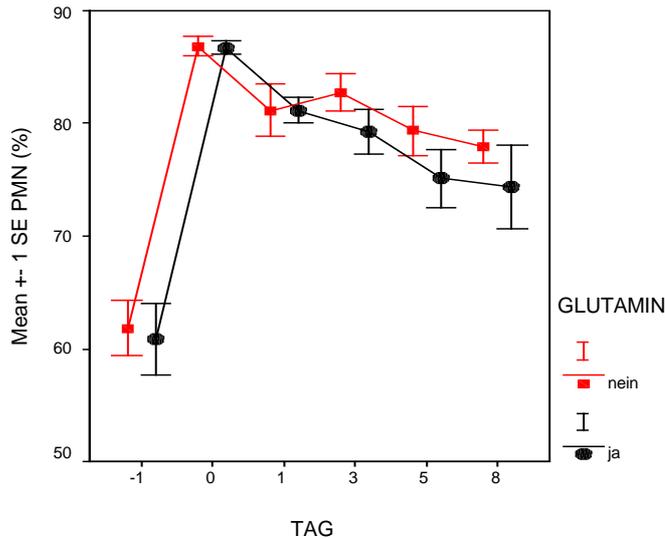
Friedman	Wilcoxon	MWU
<b>p = 0,000</b>	Tag 0/-1 <b>p = 0,000</b>	Tag -1 p = 0,821
	Tag 1/-1 <b>p = 0,000</b>	Tag 0 p = 0,597
	Tag 3/-1 <b>p = 0,000</b>	Tag 1 p = 0,290
	Tag 5/-1 <b>p = 0,000</b>	Tag 3 p = 0,059
	Tag 8/-1 <b>p = 0,000</b>	Tag 5 p = 0,174
		Tag 8 p = 0,142

Abb. 16) Prozentualer Anteil der Lymphozyten an der Gesamtleukozytenzahl ( $p < 0,05$ , signifikante Werte hervorgehoben).



Friedman	Wilcoxon	MWU
<b>p = 0,002</b>	Tag 0/-1 <b>p = 0,012</b>	Tag -1 p = 0,545
	Tag 1/-1 p = 0,911	Tag 0 p = 0,545
	Tag 3/-1 p = 0,086	Tag 1 p = 0,880
	Tag 5/-1 p = 0,052	Tag 3 p = 0,364
	Tag 8/-1 p = 0,627	Tag 5 p = 0,364
		Tag 8 p = 0,762

Abb. 17) Prozentualer Anteil der Monozyten an der Gesamtleukozytenzahl ( $p < 0,05$ , signifikante Werte hervorgehoben).

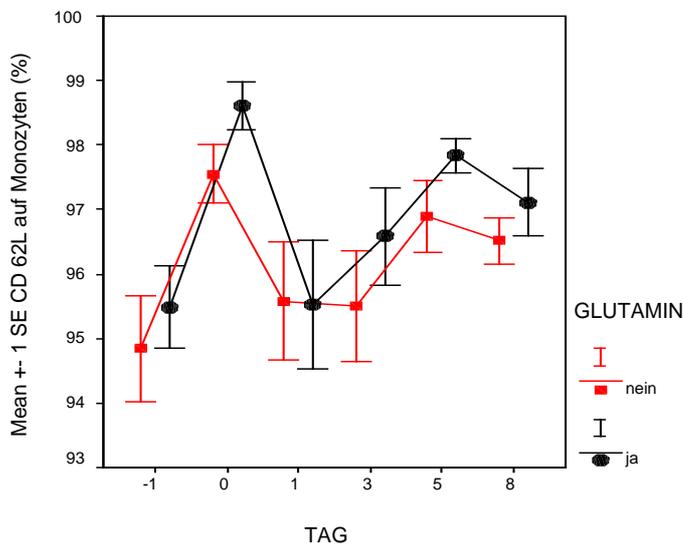


Friedman	Wilcoxon	MWU
<b>p = 0,000</b>	Tag 0/-1 <b>p = 0,000</b>	Tag -1 p = 0,940
	Tag 1/-1 <b>p = 0,000</b>	Tag 0 p = 0,762
	Tag 3/-1 <b>p = 0,000</b>	Tag 1 p = 0,650
	Tag 5/-1 <b>p = 0,000</b>	Tag 3 p = 0,174
	Tag 8/-1 <b>p = 0,000</b>	Tag 5 p = 0,257
		Tag 8 p = 0,940

Abb. 18) Prozentualer Anteil von PMN an der Gesamtleukozytenzahl ( $p < 0,05$ , signifikante Werte hervorgehoben).

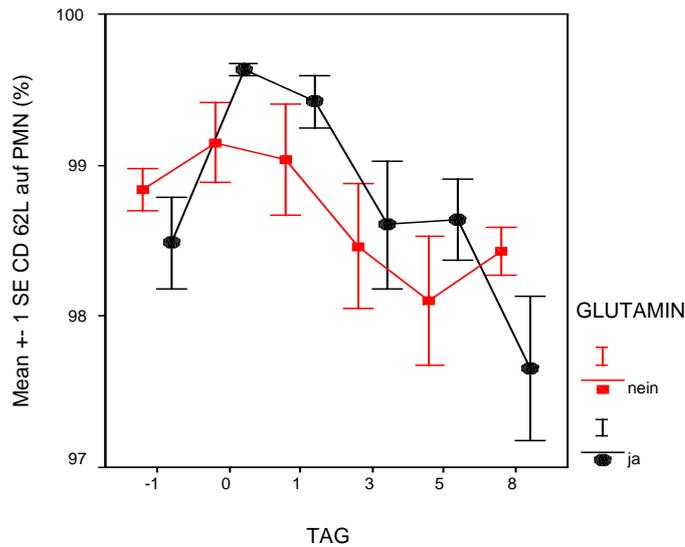
### 3.4. Monozyten, Granulozyten und Adhäsion

Bei der Adhäsion und Emigration von Monozyten und Granulozyten spielt eine kaskadenähnliche Abfolge von Bindungen an das Endothel über sogenannte Adhäsionsmoleküle eine Rolle, die der Reihenfolge nach in den Abbildungen 19 bis 22 dargestellt sind.



Friedman	Wilcoxon	MWU
<b>p = 0,000</b>	Tag 0/-1 <b>p = 0,000</b>	Tag -1 p = 0,705
	Tag 1/-1 p = 0,156	Tag 0 p = 0,131
	Tag 3/-1 <b>p = 0,037</b>	Tag 1 p = 0,940
	Tag 5/-1 <b>p = 0,000</b>	Tag 3 p = 0,290
	Tag 8/-1 <b>p = 0,009</b>	Tag 5 p = 0,290
		Tag 8 p = 0,369

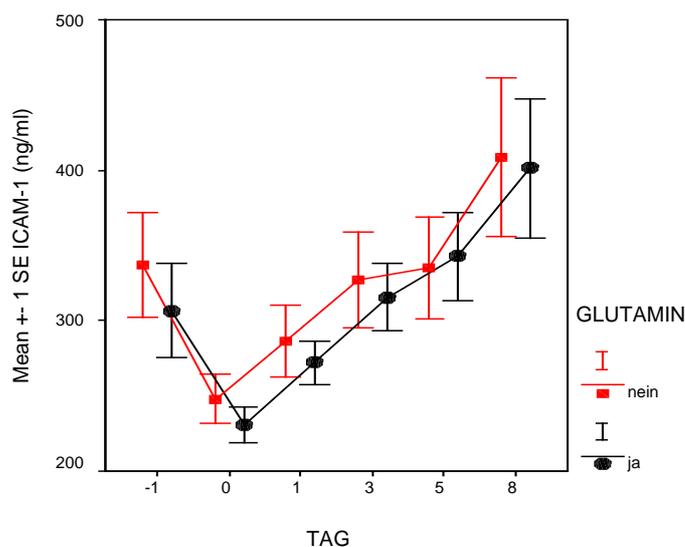
Abb. 19) Prozentualer Anteil von Monozyten, die den Selektin-Rezeptor CD 62L exprimieren ( $p < 0,05$ , signifikante Werte hervorgehoben).



Friedman	Wilcoxon	MWU
<b>p = 0,000</b>	Tag 0/-1 <b>p = 0,001</b>	Tag -1 p = 0,450
	Tag 1/-1 <b>p = 0,014</b>	Tag 0 p = 0,151
	Tag 3/-1 p = 0,751	Tag 1 p = 0,791
	Tag 5/-1 p = 0,936	Tag 3 p = 0,597
	Tag 8/-1 <b>p = 0,004</b>	Tag 5 p = 0,406
		Tag 8 p = 0,165

Abb. 20) Prozentualer Anteil von Granulozyten, die CD 62L exprimieren (p<0,05, signifikante Werte hervorgehoben).

Der sowohl auf Monozyten als auch auf Granulozyten exprimierte L-Selektinrezeptor CD 62L zeigt perioperativ einen kurzzeitigen Anstieg, der bei beiden Zellpopulationen signifikante Werte aufweist, um am Tag 1, respektive Tag 3 wieder abzufallen. Bei den Monozyten bleibt der Anteil der CD 62L-positiven Zellen oberhalb der Ausgangswerte, während bei den Granulozyten dieser Anteil jedoch unterhalb, der am Tag -1 erhobenen Werte liegt. Signifikante Gruppenunterschiede liegen nicht vor.



Friedman	Wilcoxon	MWU
<b>p = 0,000</b>	Tag 0/-1 <b>p = 0,000</b>	Tag -1 p = 0,402
	Tag 1/-1 p = 0,102	Tag 0 p = 0,364
	Tag 3/-1 p = 0,777	Tag 1 p = 0,910
	Tag 5/-1 p = 0,286	Tag 3 p = 0,940
	Tag 8/-1 <b>p = 0,007</b>	Tag 5 p = 0,821
		Tag 8 p = 0,940

Abb. 21) ICAM-1 in ng/ml (p<0,05, signifikante Werte hervorgehoben).

Das Adhäsionsmolekül ICAM-1 fällt perioperativ signifikant ab, um im weiteren Verlauf wieder anzusteigen und am Tag 8 signifikant über den Ausgangswerten zu liegen. Es existieren keine gruppenspezifischen Unterschiede.

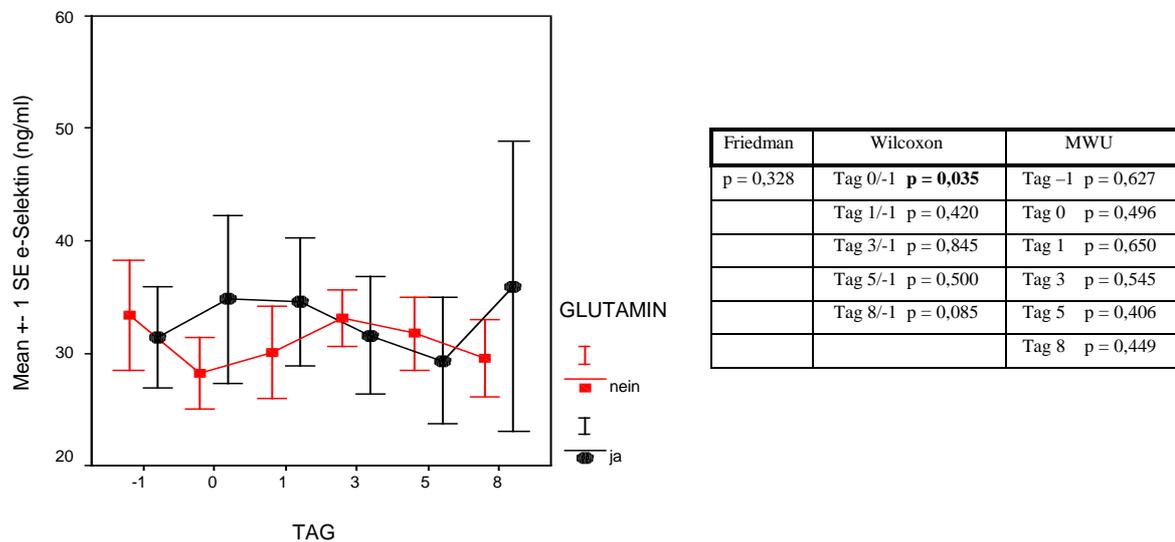


Abb. 22) Serum-Spiegel von e-Selektin in ng/ml ( $p < 0,05$ , signifikante Werte hervorgehoben).

Das von Endothelien exprimierte Adhäsionsmolekül e-Selektin weist über den gesamten Verlauf relativ konstante Werte auf, ohne signifikante Veränderungen (Ausnahme Tag 0). Glutamin- und Kontrollgruppe unterscheiden sich weder im Gesamtverlauf noch am Tag 0.

In der Zusammenschau ist zu erkennen, wie der Anteil von CD 62L-exprimierenden Zellen bereits am Tag 0 einen signifikanten Anstieg zeigt, während ICAM-1 zunächst abfällt und erst im weiteren Verlauf signifikant ansteigt. Überraschenderweise zeigt e-Selektin kaum Änderungen seiner Serumkonzentration. Ein glutaminspezifischer Effekt ist nicht nachweisbar.

### 3.5. Phagozytose und oxidativer Burst

Die Hauptaufgabe von Monozyten und Granulozyten besteht in der Phagozytose und Elimination von Fremdanigen. Bei den Monozytenabkömmlingen kommt eine weitere Funktion der Antigenpräsentation hinzu, in der das Proteinantigen intrazellulär prozessiert und über MHC-Klasse-II-Proteine (Major Histocompatibility Complex) präsentiert werden muss. Die bakterizide Aktivität ist die Hauptwirkung beider Zellrassen.

Um das Fremdantigen binden zu können, sind nicht selten Antikörper, meist präformierte IgG-Antikörper nötig, die vermittelt über unterschiedlich affine Rezeptoren (CD 11b und CD 64), die Phagozytose einleiten.

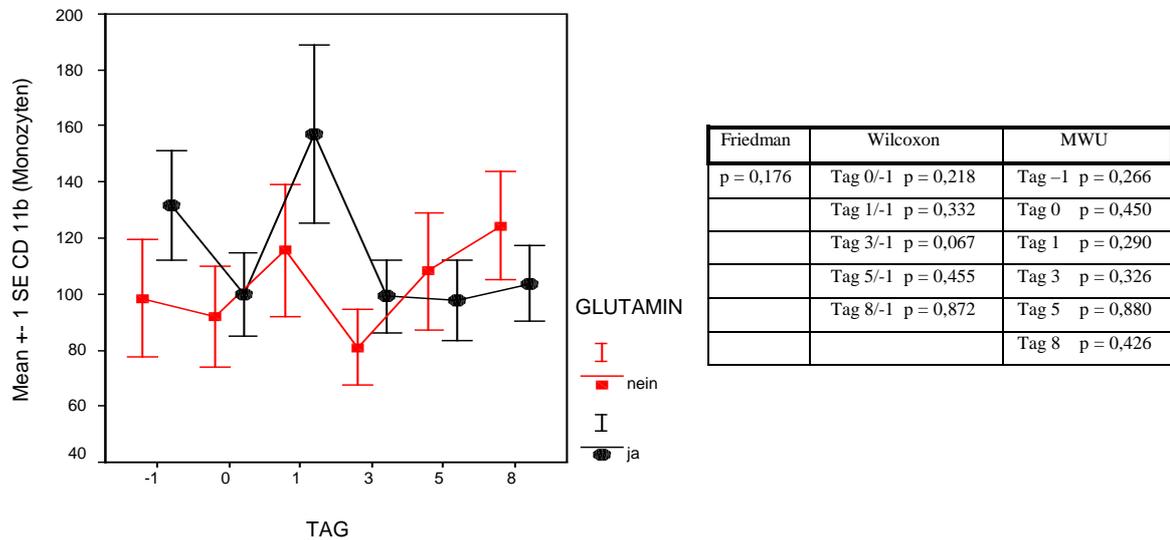


Abb. 23) CD 11b-Expression (mean channel) auf Monozyten ( $p < 0,05$ ).

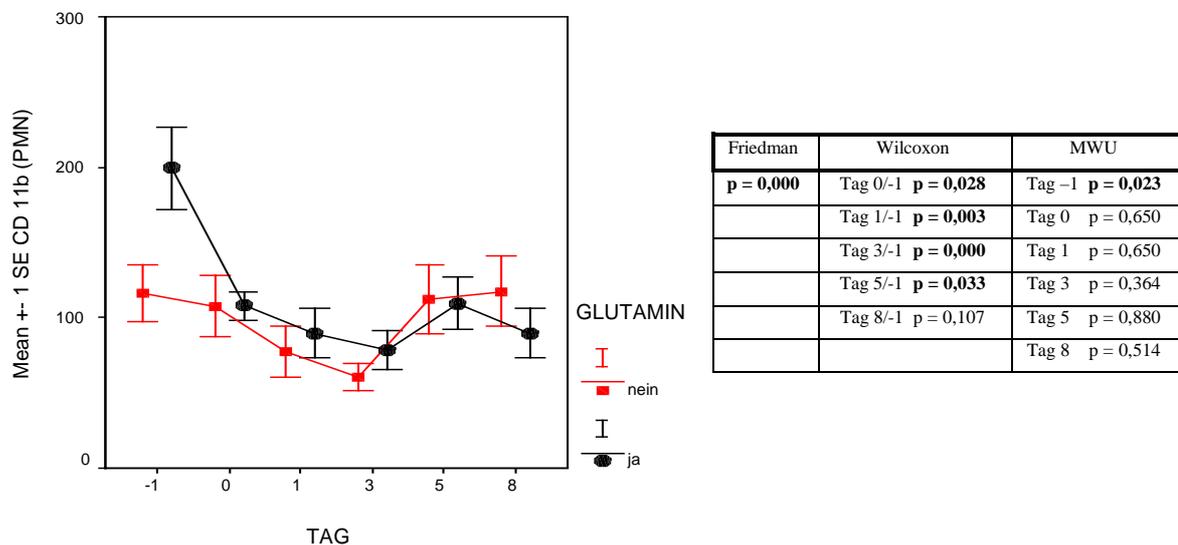
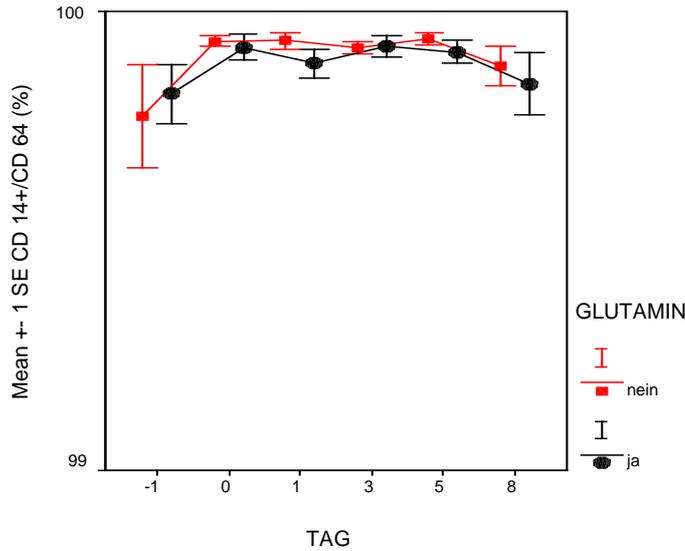


Abb. 24) CD 11b-Expression (mean channel) auf Granulozyten ( $p < 0,05$ , signifikante Werte hervorgehoben).

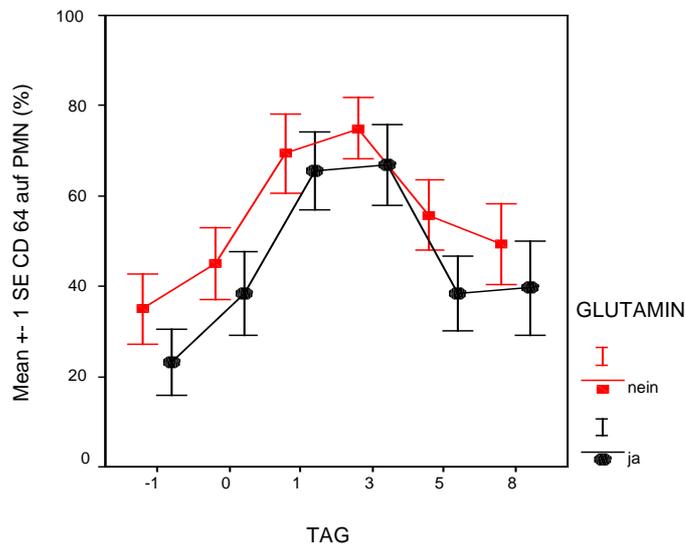
Während bei den Monozyten keine signifikanten Unterschiede in der Expression von CD 11b existieren, zeigen die Granulozyten bereits einen signifikanten Abfall am Tag 0, der sich erst am Tag 8 wieder normalisiert. Der Gruppenunterschied am Tag -1 ist nicht auf den Einfluss von Glutamin zurückzuführen.



Friedman	Wilcoxon	MWU
p = 0,338	Tag 0/-1 p = 0,052	Tag -1 p = 0,848
	Tag 1/-1 p = 0,147	Tag 0 p = 0,558
	Tag 3/-1 p = 0,076	Tag 1 p = 0,750
	Tag 5/-1 <b>p = 0,003</b>	Tag 3 p = 0,373
	Tag 8/-1 p = 0,343	Tag 5 p = 0,843
		Tag 8 p = 0,934

Abb. 25) CD 64-Expression auf Monozyten in Prozent ( $p < 0,05$ , signifikante Werte hervorgehoben).

In der Expression von CD 64 unterscheiden sich beide Zellpopulationen ebenfalls. Während die Granulozyten (PMN) einen signifikanten Anstieg von CD 64-exprimierenden Zellen aufweisen, ändert sich der Anteil bei den Monozyten nicht. Signifikante Gruppenunterschiede sind nicht zu verzeichnen.



Friedman	Wilcoxon	MWU
<b>P = 0,000</b>	Tag 0/-1 <b>p = 0,017</b>	Tag -1 p = 0,174
	Tag 1/-1 <b>p = 0,000</b>	Tag 0 p = 0,406
	Tag 3/-1 <b>p = 0,000</b>	Tag 1 p = 0,821
	Tag 5/-1 <b>p = 0,002</b>	Tag 3 p = 0,650
	Tag 8/-1 <b>p = 0,009</b>	Tag 5 p = 0,174
		Tag 8 p = 0,462

Abb. 26) CD 64-Expression auf PMN in Prozent ( $p < 0,05$ , signifikante Werte hervorgehoben).

Die Phagozytose von FITC-markierten Escherichia coli ist in den Abbildungen 27 für Monozyten und 28 für Granulozyten dargestellt.

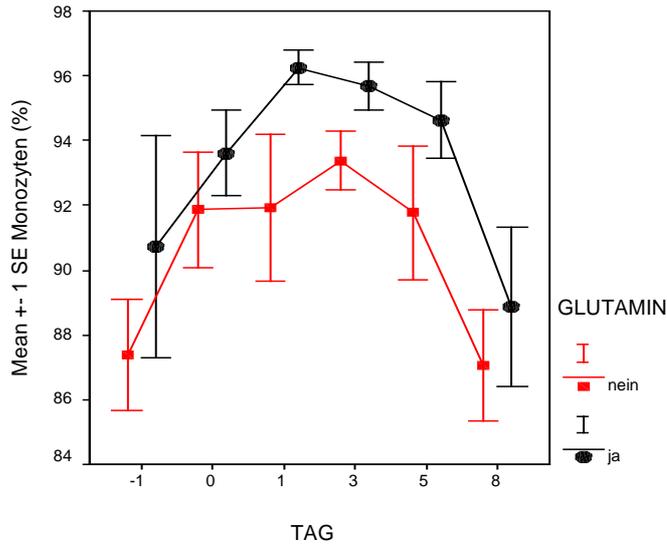


Abb. 27) Prozentualer Anteil Escherichia coli phagozytierender Blutmonozyten ( $p < 0,05$ , signifikante Werte hervorgehoben).

Während die, als antigenpräsentierenden Zellen fungierenden Monozyten unmittelbar postoperativ einen größeren Anteil phagozytierender Zellen zeigen, nimmt dieser bei den Granulozyten signifikant ab, um im weiteren Verlauf wieder anzusteigen. Signifikante Unterschiede zwischen der Glutamingruppe und der Kontrollgruppe existieren nicht.

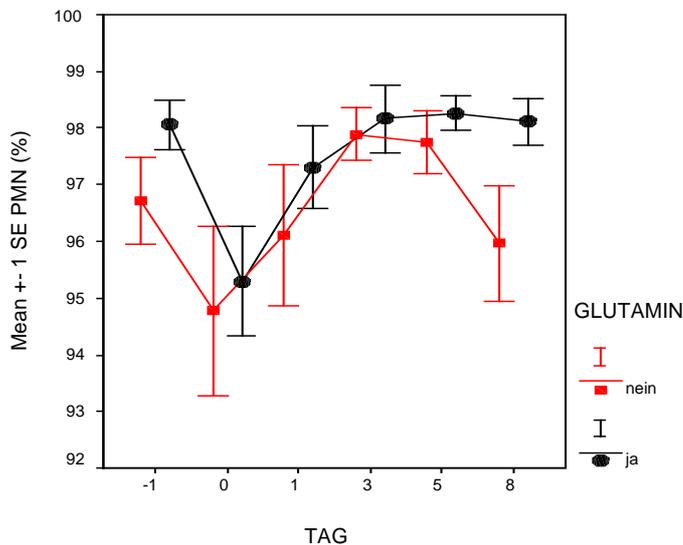


Abb. 28) Prozentualer Anteil Escherichia coli phagozytierender polymorphkerniger Granulozyten ( $p < 0,05$ , signifikante Werte hervorgehoben).

Die oxidative Leistung und damit ihre bakterizide Fähigkeit im Verlauf ist für beide Gruppen in den Abbildungen 29 und 30 dargestellt. Als Stimulus dienten ebenfalls Escherichia coli Bakterien.

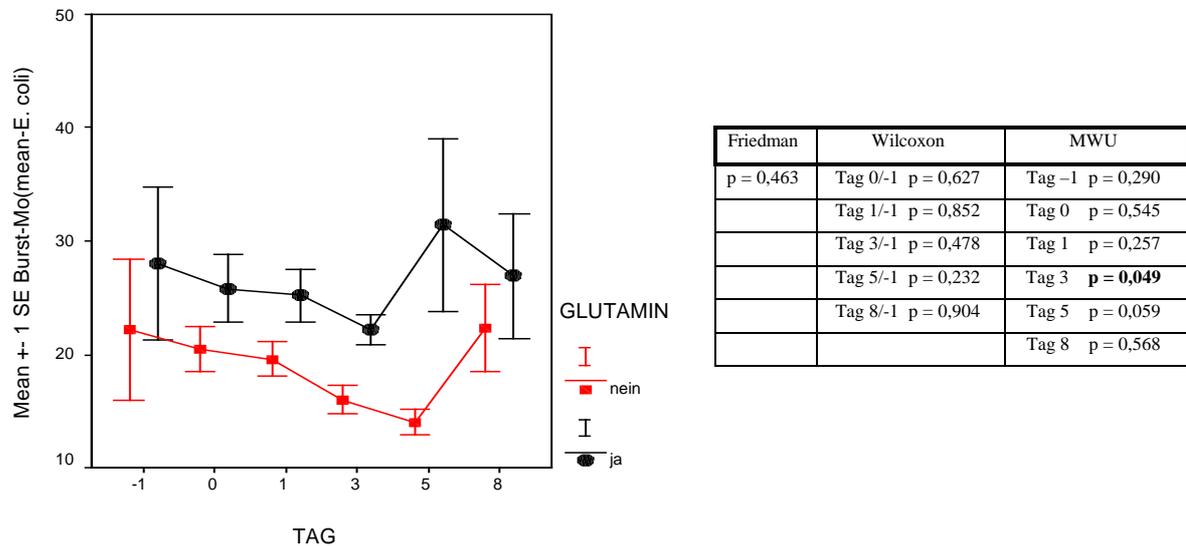


Abb. 29) Oxidativer Burst (mean channel) Monozyten - Escherichia coli stimuliert ( $p < 0,05$ , signifikante Werte hervorgehoben).

Beide Zellrassen verhalten sich hier vergleichbar, wie aus dem Kurvenverlauf ersichtlich ist. Lediglich bei den Granulozyten ist am Tag 0 und 5 im Wilcoxon-Test ein signifikanter Abfall des oxidativen Bursts zu verzeichnen. Ein signifikanter Gruppenunterschied ist bei den Monozyten am Tag 3 zu verifizieren, jedoch ergaben sich aus dem Verlauf hier keine signifikanten Unterschiede.

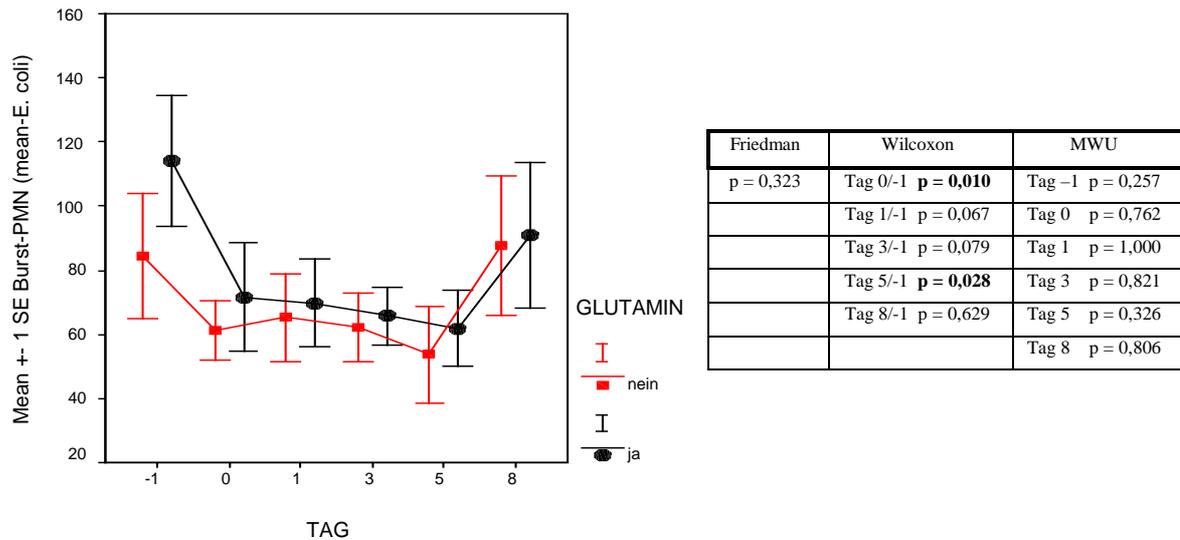


Abb. 30) Oxidativer Burst (mean channel) polymorphkerniger Granulozyten - Escherichia coli stimuliert ( $p < 0,05$ , signifikante Werte hervorgehoben).

Zusammenfassung: Sowohl bei der Phagozytose als auch in ihren bakteriziden Eigenschaften unterscheiden sich Monozyten und Granulozyten. Während die Expression von CD 11b und CD 64 bei Monozyten postoperativ ansteigt, fällt diese bei den Granulozyten (CD 11b) ab und zeigt auch bei CD 64 einen trägeren Anstieg. Diese Beobachtung ähnelt dem Phagozytoseverhalten beider Zellarten, da die Phagozytosefähigkeit bei den Granulozyten zunächst einmal sinkt, um im weiteren Verlauf wieder anzusteigen, während sie bei den Monozyten unmittelbar zunimmt. Beim oxidativen Burst zeigen beide Zellpopulationen grafisch eine verminderte Kapazität, doch nur bei den Granulozyten ist diese Veränderung an den Tagen 0 und 5 als signifikant einzuschätzen.

### 3.6. Postoperative Immunsuppression

Bei immunologischen Prozessen verhalten sich pro- und antiinflammatorische Funktionen invers, d.h. im Zuge einer Entzündung sorgen proinflammatorische Faktoren dafür, das schädigende Agens zu eliminieren oder einzudämmen und antiinflammatorische Faktoren verhindern ein „Ausufer“ der entzündlichen Reaktion, um gesundes Gewebe zu schonen oder zu schützen. Dabei sind beide Vorgänge eng aufeinander abgestimmt. Überwiegt eine der beiden Seiten resultiert entweder ein SIRS oder aber Anergie. Die folgenden Abbildungen 31 bis 33 zeigen die relevanten Marker, die eine solche verstärkte Immunsuppression anzeigen.

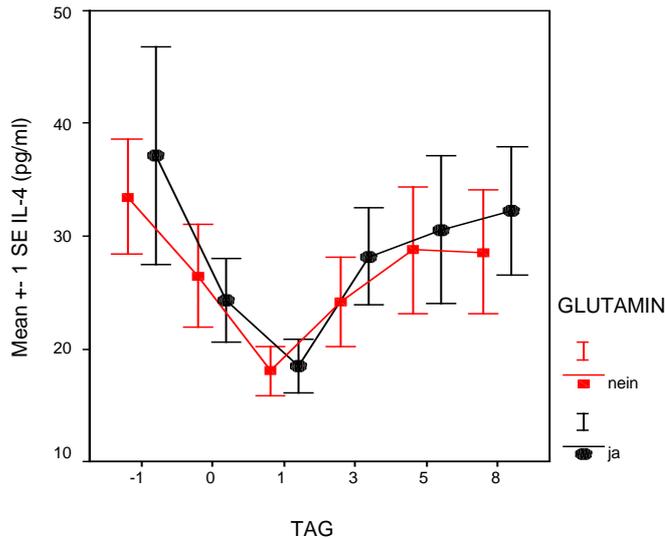


Abb. 31) Interleukin 4 in pg/ml ( $p < 0,05$ , signifikante Werte hervorgehoben).

Interleukin 4 zeigt einen signifikanten Abfall am Tag 0 und 1, um danach wieder fast auf den Ausgangswert anzusteigen. Signifikante Unterschiede zwischen Glutamin- und Kontrollgruppe existieren nicht.

Invers verhält sich hingegen Interleukin 10 mit einem signifikanten Anstieg am Tag 0. Die erhöhten Ausgangswerte werden zum Ende des Beobachtungszeitraumes nicht egalisiert. Der signifikante Gruppenunterschied am Tag -1 ist nicht auf die Wirkung des Glutamins zwischen Experimental- und Kontrollgruppe zurückzuführen.

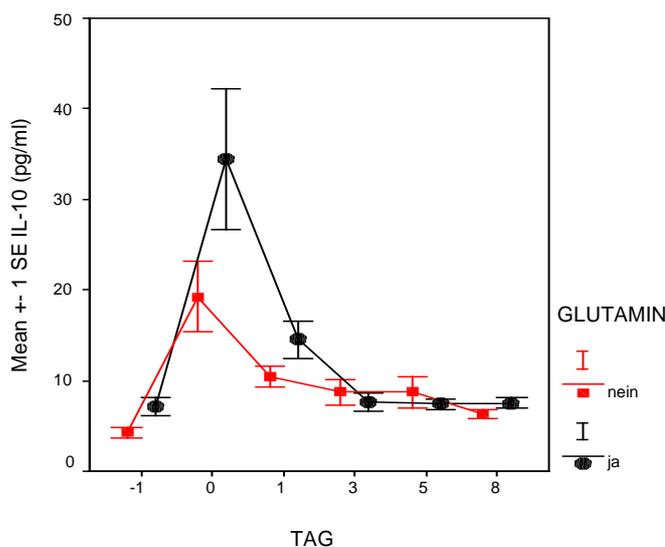


Abb. 32) Interleukin 10 in pg/ml ( $p < 0,05$ , signifikante Werte hervorgehoben).

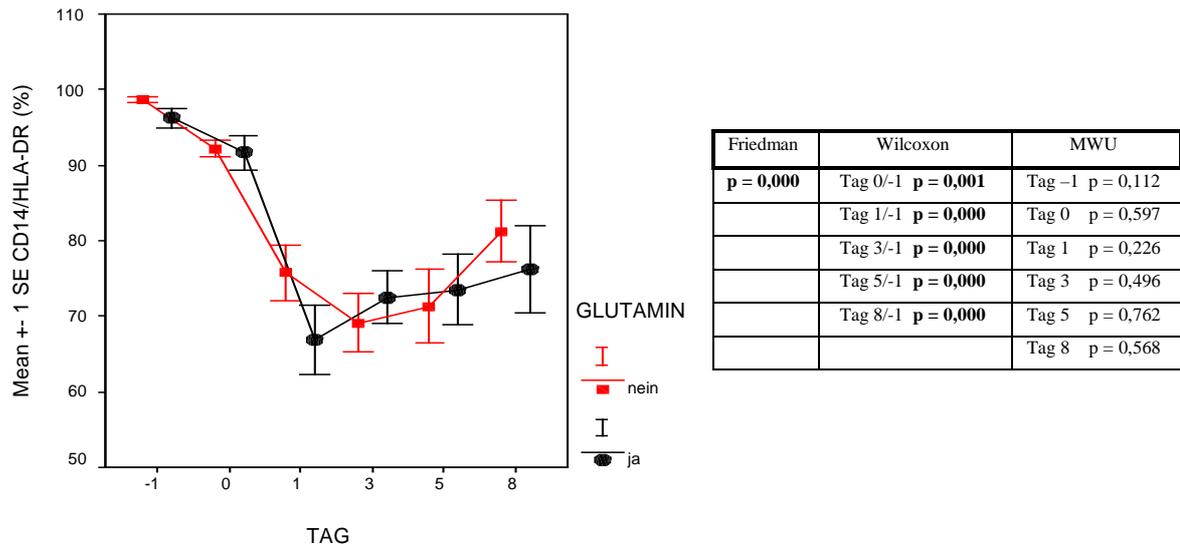


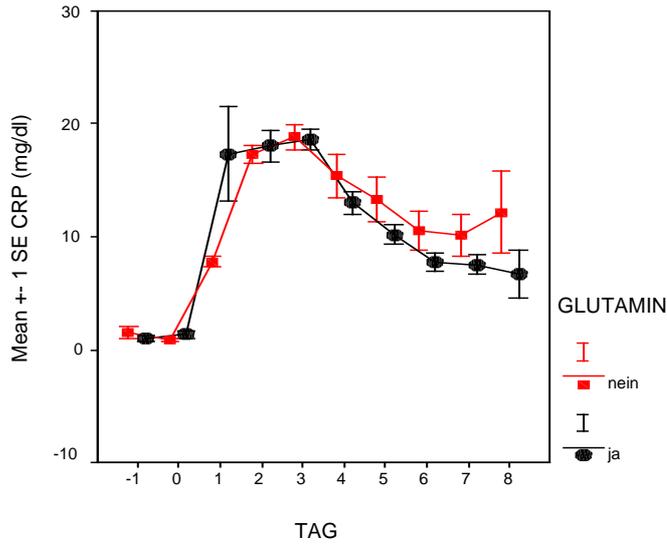
Abb. 33) HLA-DR-Expression auf CD14-positiven Monozyten ( $p < 0,05$ , signifikante Werte hervorgehoben).

Die HLA-DR-Expression (Human Leukocyte Antigen) auf Monozyten zeigt einen typischen, signifikanten Abfall über den gesamten Verlauf, mit erneut steigenden Werten ab Tag 5 und damit einer verminderten Immunsuppression nach der akuten Entzündungsphase. Signifikante Gruppenunterschiede sind nicht zu zeigen.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass in beiden Gruppen die Verläufe für IL-4, IL-10 und HLA-DR auf Monozyten ähnlich sind und bis auf IL-10, zunächst mit einer signifikanten Verminderung postoperativ einhergehen. IL-10 zeigt unmittelbar postoperativ einen Anstieg. Auch darin unterscheiden sich sowohl Glutamin- und Kontrollgruppe nicht.

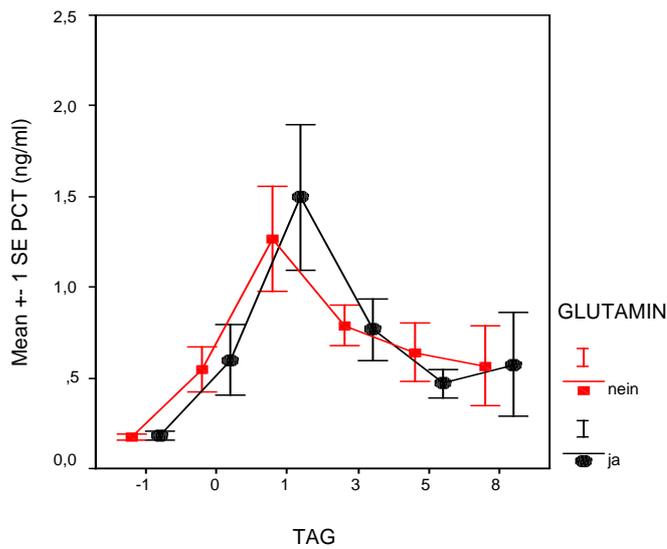
### 3.7. Klinische Parameter und Infektionen

Im klinischen Alltag sind derartige immunologische Untersuchungen zu aufwendig. Meist beschränken sich die Untersuchungen auf gröbere und globalere Nachweismethoden einer Entzündungsreaktion. Zum einen sind die Verläufe von C-reaktivem Protein (Abb. 34) und Procalcitonin (Abb. 35) dargestellt. Eine andere Möglichkeit besteht darin, einen Infektionsfokus, die Keimbeseidlung bestimmter Organe und Organsysteme oder aber das Wundgebiet, als „Eintrittspforte“ von Krankheitserregern zu untersuchen (Abb. 36 bis 40).



Friedman	Wilcoxon	MWU
<b>p = 0,000</b>	Tag 0/-1 p = 0,838	Tag -1 p = 0,698
	Tag 1/-1 <b>p = 0,000</b>	Tag 0 p = 0,614
	Tag 3/-1 <b>p = 0,000</b>	Tag 1 p = 0,096
	Tag 5/-1 <b>p = 0,000</b>	Tag 3 p = 0,806
	Tag 8/-1 <b>p = 0,003</b>	Tag 5 p = 0,691
		Tag 8 p = 0,116

Abb. 34) C-reaktives Protein in mg/dl ( $p < 0,05$ , signifikante Werte hervorgehoben).



Friedman	Wilcoxon	MWU
<b>p = 0,000</b>	Tag 0/-1 <b>p = 0,000</b>	Tag -1 p = 0,939
	Tag 1/-1 <b>p = 0,000</b>	Tag 0 p = 0,622
	Tag 3/-1 <b>p = 0,000</b>	Tag 1 p = 0,623
	Tag 5/-1 <b>p = 0,000</b>	Tag 3 p = 0,570
	Tag 8/-1 <b>p = 0,000</b>	Tag 5 p = 0,496
		Tag 8 p = 0,762

Abb. 35) Procalcitonin in ng/ml ( $p < 0,05$ , signifikante Werte hervorgehoben).

C-reaktives Protein und PCT zeigen unmittelbar postoperativ erwartungsgemäß einen ansteigenden Verlauf mit den höchsten Werten für das CRP am Tag 4 und für das PCT am Tag 1. Die Verläufe sind für beide Marker signifikant. Gruppenunterschiede sind nicht festzustellen.

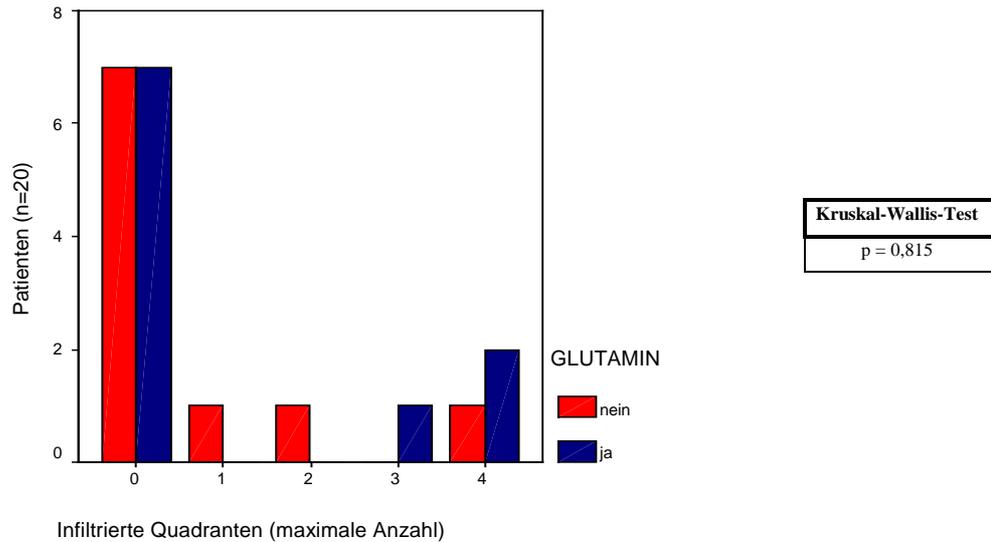


Abb. 36) infiltrierte Quadranten - Lunge ( $p < 0,05$ ).

Die Abbildung 36 zeigt die Unterschiede im bildmorphologischen Nachweis von entzündlichen Lungeninfiltraten (jeweils in vier Quadranten beider Lungen). Zwei Patienten der Glutamingruppe wiesen Infiltrate in jeweils einem respektive zwei Quadranten auf, ein Patient der Kontrollgruppe in drei Quadranten und zwei Patienten der Kontrollgruppe und ein Patient der Glutamingruppe in allen vier Quadranten. Signifikante Unterschiede sind zwischen beiden Gruppen nicht erkennbar.

Die Besiedelungen des Wundgebietes durch mikrobiologische Spezies sind ein häufiges klinisches Phänomen. Zum einen werden bei der Wundversorgung bzw. der Materialgewinnung patienteneigene Keime der Hautflora miterfasst, zum anderen bereiten entsprechende mikrobiologische Befunde Schwierigkeiten, da zwar ein Keim nachweisbar, nicht aber die Pathogenität immer eindeutig interpretierbar ist. Insgesamt wurde bei der Hälfte der Patienten eine Wundbesiedelung durch Bakterien oder Pilze festgestellt, wie Abbildung 37 zeigt. Bei sieben Patienten der Glutamingruppe und drei Patienten der Kontrollgruppe konnte kein positiver Nachweis geführt werden. Ein signifikanter Unterschied zwischen Glutamingruppe und Kontrollgruppe, ob eine Besiedelung vorlag oder nicht, konnte nicht gezeigt werden ( $p=0,081$ ).

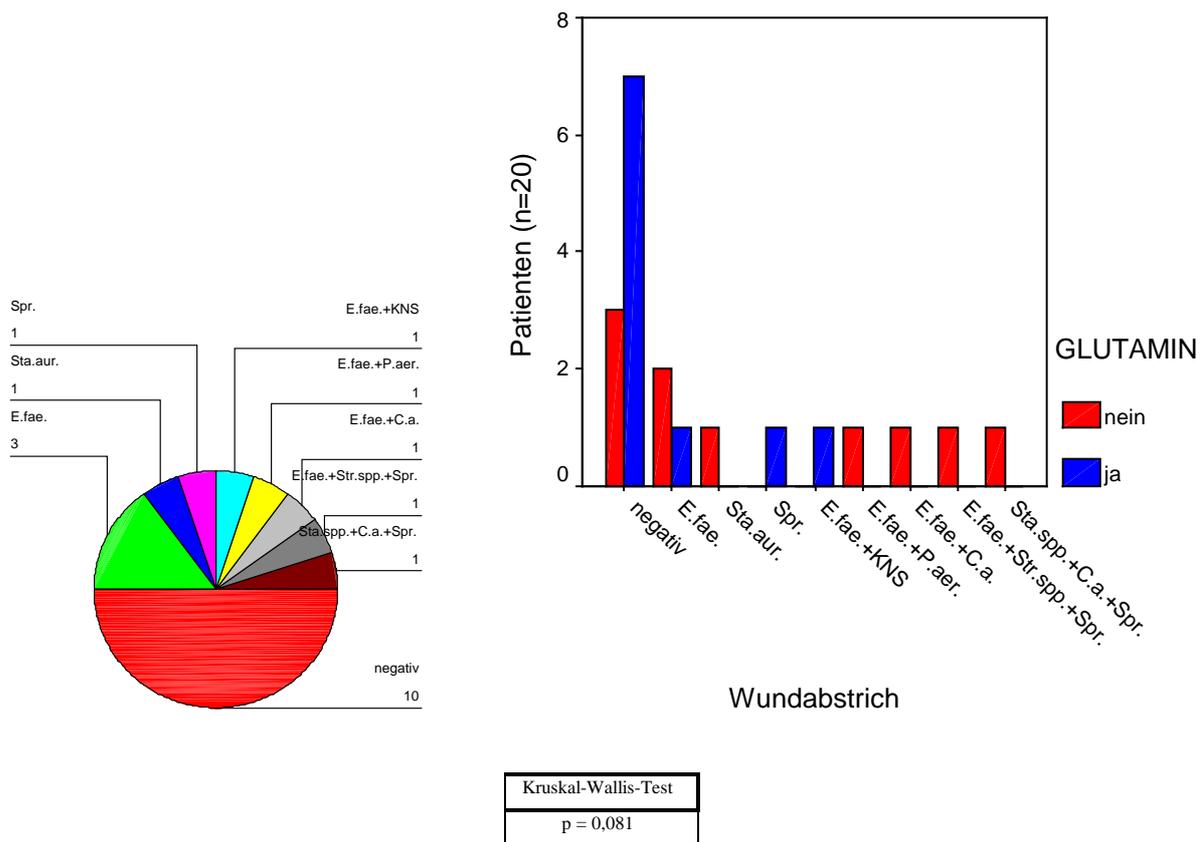


Abb. 37) Wundbesiedelung (links gesamt – rechts nach Gruppen;  $p < 0,05$ ; E.fae. = Enterococcus faecalis, Sta.aur. = Staphylococcus aureus, Spr. = Sprosspilze, KNS = koagulase negative Staphylokokken, P.aer. = Pseudomonas aeruginosa, C.a. = Candida albicans, Str.spp. = Streptococcus spp, Sta.spp. = Staphylococcus spp.).

Bei mehr als der Hälfte der Patienten sowohl in der Glutamin- als auch in der Kontrollgruppe, wurden keine pathogenen Keime im Katheterurin nachgewiesen. In drei Fällen der Kontrollgruppe wurde im Urin eine positive Kultur erzielt (Abb. 38). Auch hier muss einschränkend erwähnt werden, dass die Qualität einer mikrobiologischen Untersuchung von Katheterurin eng an die Einhaltung hygienischer Richtlinien gebunden ist, da die für die temporäre Harnableitung vorgesehenen Kathetersysteme zeitabhängig kontaminieren bzw. ähnlich wie bei den Wundabstrichen, eine Kontamination bei der Materialgewinnung erfolgen kann.

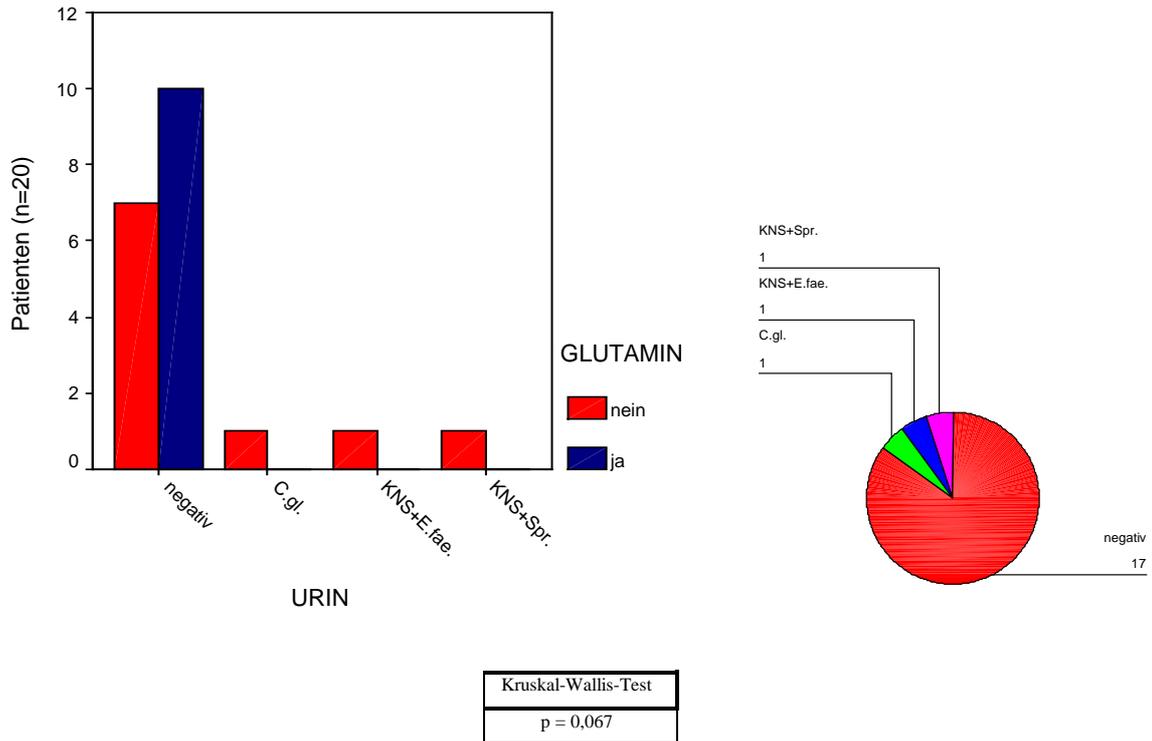
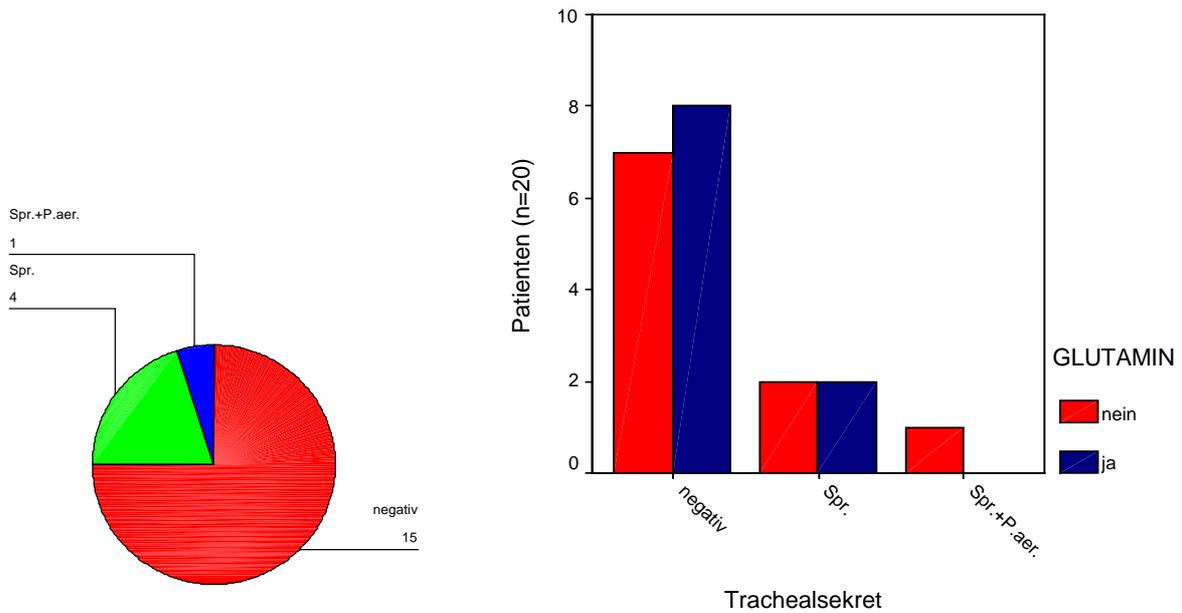


Abb. 38) Keimnachweis im Urin (links nach Gruppen – rechts gesamt;  $p < 0,05$ ; C.gl. = *Candida glabrata*, KNS = koagulase negative Staphylokokken, E.fae. = *Enterococcus faecalis*, Spr. = Sprosspilze).

Im Trachealsekret wiesen fünfzehn Patienten keine Besiedelung durch Pilze und Bakterien auf. Bei den übrigen fünf konnten in der Mehrzahl Sprosspilze und im Fall der Doppelbesiedelung zusätzlich *Pseudomonas aeruginosa* nachgewiesen werden. Signifikante Unterschiede hinsichtlich der Fragestellung, ob eine Besiedelung vorlag oder nicht, müssen zwischen beiden Gruppen verneint werden (Abb. 39).



Kruskal-Wallis-Test
P = 0,615

Abb. 39) Keimnachweis im Trachealsekret (links gesamt – rechts nach Gruppen;  $p < 0,05$ ; Spr. = Sprosspilze, P.aer. = Pseudomonas aeruginosa).

Um der Frage nachzugehen, ob sich beide Gruppen in der Besiedelung einer der drei gewonnenen und mikrobiologisch untersuchten Probenarten unterschieden, wurde der relativ kleinen Stichprobe wegen der exakte Test nach Fisher durchgeführt (Abb. 40).

GLN/Keim	ja	Nein	
ja	5	5	10
nein	9	1	10
	14	6	

Fisher	Test
p-eiseitig	0,070
p-zweiseitig	0,141

Abb. 40) exakter Test nach Fisher gruppiert nach Kontroll- und Studiengruppe (GLN) sowie positivem und negativem Keimnachweis (Keim).

Wie der einseitig und zweiseitig durchgeführte Test zeigt, ergibt sich zwischen Studien- und Kontrollgruppe kein signifikanter Unterschied in der mikrobiellen Besiedelung von Trachealsekret oder Urin oder der Operationswunden.

Insgesamt unterscheiden sich beide Gruppen somit weder im Verlauf globaler Entzündungsmarker wie das CRP oder das PCT, noch weisen die Patienten der Glutamingruppe eine signifikant geringere mikrobielle Besiedelung der Operationswunden, des Urins oder des Trachealsekretes auf. Auch konnten bei ihnen nicht signifikant weniger intrapulmonale Infiltrate röntgenmorphologisch detektiert werden.

## **4. Diskussion**

Im Anschluss an die Darstellung der von unserer Arbeitsgruppe erhobenen Daten sollen diese im Ergebnis mit denen anderer Studien verglichen werden. Dabei geht es einerseits um den Vergleich im Rahmen unserer angewandten Methodik und andererseits um die Identifikation und Verifikation möglicher Variablen, die gewollt oder ungewollt Einfluss auf das Gesamtergebnis hatten. In der Einleitung wird die Charakterisierung der Marker, mit deren Hilfe die Interpretation der Ergebnisse möglich ist, vorangestellt, gefolgt von der Betrachtung des Verlaufes im Gesamtkollektiv und im Gruppenvergleich zwischen Testgruppe (glutaminangereicherte TPN) und Kontrollgruppe (Standard-TPN). Einleitend sollen unsere Daten diskutiert werden, die in vielen Studien für den Einsatz von Glutamin als Zusatz zur TPN plädieren und weitere Untersuchung über die Wirksamkeit der Aminosäure rechtfertigen.

### **4.1. Allgemeine Vorbetrachtung**

Die Aktivierung des Immunsystems und seiner Komponenten hängt maßgeblich vom Ausmaß des chirurgischen Traumas ab [Allendorf et al. 1997]. Dieses wurde durch die in der Studie verwandten Patientenkollektive standardisiert, d.h. die interindividuellen Veränderungen zwischen den beiden Gruppen in den einzelnen Parametern waren somit nicht durch das initiale, chirurgische Trauma bedingt.

Studien mit großen Fallzahlen bzw. Multicenterstudien haben gezeigt, dass Glutamin als Nahrungszusatz zu einer kürzeren Liegedauer oder Hospitalisation führt [Fürst et al. 1999, Jiang et al. 1999]. Ein derartiges Ergebnis konnte in der von uns durchgeführten Studien nicht belegt werden. Zwar ist ein Unterschied im arithmetischen Mittel beim Aufenthalt auf der Intensivstation und ein verkürzter stationärer Aufenthalt zu konstatieren, jedoch ist dies auf statistische Ausreißer in der Glutamingruppe zurückzuführen. Im Median sind beide Gruppen nicht signifikant verschieden. Zum einen mag das an der zu geringen Fallzahl ( $n=20$ ) im Gegensatz zu den erwähnten Multicenterstudien mit Beobachtungskollektiven von 120 respektive 126 Patienten liegen, zum anderen haben diese Studien auch gezeigt, dass Glutamin die Stickstoffbilanz signifikant verbessern konnte. Welche weiteren Einflüsse Glutamin über eine verbesserte Stickstoffbilanz und die damit verminderte Katabolie hinaus verursacht, sind nicht untersucht. Zu ähnlichen Schlüssen kommen andere Studien, wie die von Ziegler et al. (1992) oder Schloerb et al. (1993) bei Patienten mit autologer und allogener Knochenmarkstransplantation. In einer Übersichtsarbeit von Wilmore aus dem Jahr 2001 waren

6 von 8 klinisch randomisierten Studien an chirurgischen Patienten in der Lage, eine Verbesserung der negativen Stickstoffbilanz zu zeigen. Die durchschnittlich verabreichte Dosierung betrug 0,27 g/kg/d (0,18 bis 0,4 g/kg/d). Die Aminosäurenkonzentration im Blutplasma wurde in sieben Studien gemessen. Die Glutaminkonzentration war in drei Studien signifikant höher als in der Kontrollgruppe.

Ab einer Glutaminplasmakonzentration von  $<0,4$  mmol, verglichen mit der normalen Plasmaglutaminkonzentration von Gesunden  $>0,6$  mmol, kann es zu Beeinträchtigungen des Immunsystems kommen [Wilmore et al. 1998].

Unsere Ergebnisse erscheinen insofern kohärent, als dass in allen weiteren untersuchten Variablen keine signifikanten Unterschiede zwischen der Patientengruppe, die Glutamin als Zusatz zur totalen parenteralen Ernährung (TPN) und jener, welche die Standard-Ernährung erhielt, existieren. Ursächlich für dieses negatives Ergebnis ist eventuell, wie weiter unten ausgeführt, die zu geringe Glutaminmenge, die der Nährformel zugesetzt wurde. Wie der Verlauf der plasmatischen Glutaminkonzentration zeigt, kommt es zu einem erwarteten Abfall der Konzentration vom Tag -1 bis Tag 5. Dieser Abfall ist maßgeblich auf eine Verarmung des Skelettmuskels an Glutamin zurückzuführen, der in katabolen Situationen als alleinige Glutaminquelle fungiert. Dies zeigte sich bereits in einer Studie von Askanazi et al. aus dem Jahr 1978 an 19 Patienten, die sich einem Hüftgelenkersatz unterzogen, im Vergleich mit Probanden, die Bettruhe oder eine Nahrungskarenz einzuhalten hatten. Interessanterweise blieben die Glutamatkonzentrationen in unserer Studie bei der Kontrollgruppe nahezu konstant, während in der Glutamingruppe die Werte leicht anstiegen (nicht signifikant). Diese Verarmung an Glutamin und die damit verbundene erniedrigte Konzentration im Blut wird von vielen Autoren als eine Ursache der Funktionsminderung von immunkompetenten, zirkulierenden Zellen angesehen. Eine Reihe von klinischen Studien konnte zeigen, dass es im Rahmen kataboler Zustände zu einer Verminderung der Plasmakonzentration von Glutamin kommt (35 Arbeiten im Zeitraum von 1985 bis 2000, zu entnehmen bei Boelens et al. 2001).

Die meisten dieser Studien konnten auch aufzeigen, dass durch den Zusatz von Glutamin in der TPN eine Verbesserung der kumulativen Stickstoffbilanz zu erzielen ist. Inwieweit die alleinige Optimierung der katabolen Stoffwechsellage Ursache für das verbesserte klinische Outcome ist, können auch diese Studien nicht klären, da sie zwar einen signifikanten Unterschied in den „weichen Daten“, wie beispielsweise dem Klinikaufenthalt oder dem Zeitraum der intensivmedizinischen Behandlung aufweisen und eine verbesserte Stickstoffbilanz der mit

Glutamin behandelten Patienten erreichen, aber keine kausale Erklärung für die ursächliche Wirkung von Glutamin liefern. Aus den Ergebnissen in Zellkulturen, die Eagle Ende der fünfziger Jahre veröffentlichte, ist jedoch bekannt, dass die Funktion von Glutamin in Zellkulturen nicht durch anderweitige Aminosäuren oder Glutamat ersetzt werden kann.

#### **4.2. Leukozyten und deren Subpopulationen**

Blutbildveränderungen und deren Verläufe stellen ein klinisch routinemäßig durchgeführtes Verfahren zur Abschätzung und Verlaufkontrolle entzündlicher Prozesse dar, da es bei jedem entzündlichen Prozess zur Wanderung, Infiltration und Aktivierung von an der Wundheilung beteiligten Zellen kommt [Lingen 2001]. Hierbei werden jedoch nur semiquantitative Informationen über einzelne Leukozytenpopulationen bzw. quantitative Aussagen über deren Verlauf getroffen. Dabei unterscheiden sie sich je nach Infektion und auch Stadium der Infektion und ihrem Anteil der granulozytär bedingten Leukozytenerhöhung [Kobayashi et al. 2005]. Sie sind aber allenfalls grobe Richtwerte und unterliegen zahlreichen Einflussfaktoren, wie diversen Grunderkrankungen oder Medikamenten. Die Gesamtleukozytenzahl in unserer Studie stieg bei beiden Patientenkollektiven bereits am Tag 0 signifikant an, was maßgeblich auf den massiven Anstieg der Granulozyten zurückzuführen ist. Normalerweise verfügt der menschliche Organismus über eine große Granulozytenreserve, zum einen der zirkulierende, üblicherweise gemessene Granulozytenpool, zum anderen der am Endothel haftende Pool, dessen Rezirkulation durch stressbedingte Hormonsekretion (Adrenalin, Cortison) getriggert wird, und letztlich der Knochenmarkreserve. Durch diese Reserven kann es ohne Neusynthese zu einem erheblichen Anstieg der Granulozyten kommen. Über den gesamten Verlauf blieben die Leukozytenzahlen wie die Zahl der Granulozyten in unseren Ergebnissen erhöht. Diese Erhöhung geht häufig mit einer Störung der Funktion, insbesondere der bakteriziden Aktivität neutrophiler Granulozyten einher wie bei Furukawa et al. (1997) beschrieben. Letztere konnte sich durch Glutaminzusatz und Inkubation in vitro signifikant schneller wieder normalisieren.

Der Anteil der zirkulierenden Lymphozyten weist postoperativ einen signifikanten Abfall am Tag 0 auf und diese Veränderung bleibt bis zum Ende des Beobachtungszeitraums bestehen. Wie in der Einleitung beschrieben, ist die Bedeutung der Wirkung von Glutamin auf den Lymphozytenstoffwechsel relativ gut durch die Arbeitsgruppen um Newsholme (1997) untersucht. Eine interessante Studie von Ziegler et al. aus dem Jahr 1998 zeigt den Einfluss von Glutamin auf die Lymphozytenpopulation nach Knochenmarkstransplantation. Hier führte Glutamin innerhalb von 14 Tagen zu einer erhöhten Lymphozytenzahl, die maßgeblich aus

einem höheren Anteil an T-Lymphozyten bestand. Unsere Daten weisen hingegen einen signifikanten Abfall der Lymphozyten am Tag 0 auf, der über den Zeitraum der Beobachtung Bestand hatte. Die Monozyten zeigten bis auf einen kurzfristigen Abfall am Tag 0 einen relativ konstanten Verlauf während des Beobachtungszeitraumes. Bei Monozyten und Granulozyten handelt es sich um weitgehend ausdifferenzierte Zellen und die Granulozytenpopulation weist durch die Inkorporation von Antigen und anschließende Zerstörung im Sinne eines sogenannten „suicide bag“ einen hohen Turnover auf. Somit kann bei diesen Zellen aufgrund der quantitativen Verfügbarkeit kein unmittelbarer Schluss auf ihre Funktion gezogen werden. Bei Makrophagen wie bei den Granulozyten gehen jedoch Traumata und metabolische Stresssituationen mit Einschränkungen der Funktionalität einher [Wallace et al. 1992]. Insgesamt ist aber wenig über den Einfluss von Glutamin, insbesondere auf Granulozyten, bekannt [Furukawa et al. 2000], während bei den Monozyten in der Mehrzahl in vitro Daten zur Verfügung stehen.

### **4.3. Makrophagen- und Granulozytenaktivierung und Funktion**

#### **4.3.1. Adhäsion und Aktivierung**

Hauptaufgabe von Monozyten und Granulozyten ist die Phagozytose und Elimination von extrazellulärem Fremdantigen. Darüber hinaus bestimmen die Antigenpräsentation bei Monozyten/Makrophagen sowie die Produktion von Botenstoffen das Aufgabengebiet beider Zellen, wodurch gerade Monozyten/Makrophagen als Bindeglied zwischen angeborenem und erworbenem Immunsystem fungieren. Die Phagozytose läuft dabei in vier Schritten ab:

- 1) der Chemotaxis, der Anlockung der phagozytierenden Zelle durch Zytokine oder Komplementfaktoren,
- 2) unspezifisch – die Adhärenz im Rahmen des angeborenen Immunsystems oder spezifisch mittels Opsonierung durch Antikörper,
- 3) die Aufnahme in die Zelle (Ingestion oder die Phagozytose im engeren Sinne),
- 4) die Digestion mit Hilfe von Lysozym, Proteasen und reaktiven Sauerstoffverbindungen.

Ersteres soll mit der Frage der sogenannten Adäsionsmolekülexpression auf Granulozyten und Monozyten, sowie der löslichen Formen von ICAM-1 und e-Selektin im Serum nachgegangen werden, während der zweite Schritt in unserer Studie mit der Expression von CD 64 und CD 11b erörtert werden soll; die Untersuchung der Phagozytose von FITC-markierten

Escherichia coli Bakterien und die anschließende Generierung reaktiver Sauerstoffverbindungen beleuchten Schritt 3 und 4.

CD 62L ist ein 90-110 kD schweres Adhäsionsmolekül der Selektin-Familie und wird auf Lymphozyten und anderen Leukozyten, aktivierten Endothelzellen sowie Thrombozyten exprimiert und vermittelt neben dem „Rolling“ von Leukozyten auf aktivierten Endothelzellen und der heterotopen Aggregation von Leukozyten und Thrombozyten auch das Homing naiver T-Zellen. Des Weiteren sind Aggregationen von Tumorzellen, Thrombozyten und Endothelzellen über die Selektine beschrieben [Geng et al. 2004]. Für die Migration und Extravasation von Leukozyten haben weitere Adhäsionsmoleküle eine entscheidende Bedeutung. So erfolgt über L-Selektin (CD 62L) zunächst eine lockere Bindung an, von TNF- $\alpha$ , IL-1 und INF- $\gamma$  aktiviertem Endothel (sogenanntes Rolling), um eine festere Bindung, zum Beispiel an ICAM-1 (CD 54), einem IgG ähnlichen und 80-114 kD schweren Adhäsionsmolekül zu ermöglichen. Diese Bindung von ICAM-1 an seine Liganden (LFA-1) führt vermutlich zu einer weiteren Ausschüttung von chemotaktischen Substanzen [Stolpe et al. 1996]. Die Migration der gebundenen Zellen wird im weiteren Verlauf durch diesen Endothelkontakt gesteuert. Außer auf endothelialen Zellen wird ICAM-1 auch auf einer Reihe anderer epithelialer und endothelialer Zellen wie Makrophagen, hämatopoetischen Vorläuferzellen, Lymphozyten und Fibroblasten exprimiert [Wang et al. 1998]. ICAM-1 ist in der Lage sowohl auf CD 4- und CD 8-positiven Lymphozyten als auch auf NK-Zellen zu wirken [Buhaescu et al. 2005, Stolpe et al. 1996]. E-Selektin ist ein weiteres Adhäsionsmolekül von 110 kD Größe, welches sich ausschließlich auf zytokinaktivierten Endothelzellen findet und mit verschiedenen Oberflächenproteinen der Lewis-Blutgruppenantigene auf Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten reagiert.

Unsere Daten zeigen, dass die CD 62L-Expression auf Monozyten wie Granulozyten unmittelbar postoperativ am Tag 0 ansteigt. Während der Anteil der CD 62L-exprimierenden Monozyten signifikant bis zum Tag 8 erhöht bleibt, fällt der Anteil CD 62L-exprimierender Granulozyten am Tag 3 wieder ab, um am Tag 8 sogar signifikant niedriger zu sein als am Tag -1. Das Adhäsionsmolekül ICAM-1, welches eine stärkere Bindung der Zellen an das Endothel über LFA-1 vermittelt, steigt hingegen nur langsam an und erst am Tag 8 liegen die Werte signifikant über denen der Ausgangswerte. E-Selektin weist keine signifikante Veränderung im gesamten Verlauf auf. In einer Studie von Zhao et al. (2005) konnte gezeigt werden, dass CD 62L auf PMN bereits eine Stunde nach der Induktion einer akuten Pankreatitis im Tierversuch in der BAL (broncho-alveolar-lavage) erhöht ist. CD 62L wird durch frühe proinflammatorische Zytokine TNF- $\alpha$ , IL-1 und INF- $\gamma$  stimuliert. Somit ist der frühe Anstieg der CD 62L im Rahmen der akuten Entzündungsreaktion zu erklären. Dabei scheint eine erhöhte und prolongierte

Expression von CD 62L ein Indikator für komplizierte klinische Verläufe zu sein. Kerner et al. (1999) konnten bei Patienten mit Polytraumata und einem frühen Multiorganversagen oder SIRS eine erhöhte CD 62L-Expression auf Monozyten nach sechs Tagen nachweisen. Interessant im Zusammenhang mit der Expression von Adhäsionsmolekülen sind in vitro Studien mit Plasma präeklaptischer Frauen. Diese weisen einen erniedrigten Plasmaspiegel an Glutamin auf [Hsu et al. 2005]. Dabei zeigen Adhäsionsmoleküle auf HUVECs (human umbilical vein endothelial cell) und PMN nach Stimulation mit Plasma präeklaptischer Frauen eine erhöhte Expression. Die Kultivierung dieses Ansatzes mit unterschiedlichen Glutaminkonzentrationen zeigte nun eine Abnahme der Adhäsionsmolekülexpression von ICAM-1 der HUVECs und eine verminderte Transmigration von neutrophilen Granulozyten bei Glutaminkonzentrationen, die im Bereich physiologischer Konzentrationen oder darüber lagen [Hsu et al 2006]. Zu gleichen Ergebnissen kommen auch Aosasa et al. (2003) bei Enterozyten, die in Kultur mit einer Konzentration von 10 mmol/l Glutamin eine verminderte ICAM-1-Expression zeigen konnten. IL-4 und IL-10 sind starke Inhibitoren der ICAM-1-Expression. Aosasa et al. (2003) konnten auch eine erhöhte Zytokinproduktion von IL-10 nachweisen. Widersprüchliche Ergebnisse hingegen zeigen Fukatsu et al. (2001), die im Tierversuch eine durch Glutamin verminderte Organ ICAM-1-Expression im Intestinum, nicht aber in der Lunge feststellten. Die verminderten IL-4-Werte konnten in der Glutamingruppe normalisiert werden. Ein Einfluss auf IL-10 wurde nicht nachgewiesen. Zum anderen wird der Ligand von ICAM-1/CD 54 auf Monozyten ebenfalls glutaminabhängig herunterreguliert, wie das Spittler et al. (1995) in einer in vitro Studie zeigen konnten. Im Rahmen einer systemischen Entzündungsreaktion kann es zu einer erhöhten Konzentration von löslichem e-Selektin (CD 62E) im Blut kommen [Cummings et al. 1997]. Wie bei der Studie von Kerner et al. (1999), unterschieden sich die Werte von septischen Patienten deutlich von denen nichtseptischer, kritisch Erkrankter im Hinblick auf Infektionen. Zusammengefasst kann gesagt werden, dass die frühe Aktivierung im Rahmen der unmittelbaren postoperativen Phase zu einer erhöhten CD 62L-Expression sowohl auf Monozyten als auch auf Granulozyten führt, was die Migration beider Zellen in das Entzündungsgebiet fördert. Die abnehmende CD 62L-Expression auf Granulozyten ist weiter als abklingende erste, von Granulozyten getragene Entzündungsreaktion zu sehen. ICAM-1 im Plasma hingegen steigt erst mit einer zeitlichen Verzögerung an. Die in den in vitro Studien gezeigte abnehmende Expression von ICAM-1 unter Glutamin-Supplement ist in unserer Studie bei ICAM-1 im Blut nicht verifizierbar. Der ausbleibende Anstieg von e-Selektin ist möglicherweise auf die Tatsache zurückzuführen, dass septische Komplikationen bei keinem Patienten im Beobachtungszeitraum klinisch diagnostiziert werden konnten.

### 4.3.2. Phagozytose und oxidativer Burst

Durch Krankheitsbilder wie der progressiv-septischen Granulomatose weiß man um die Bedeutung von Phagozytose und oxidativem Burst sowohl bei Granulozyten als auch Makrophagen. Es handelt sich um differenzierte Zellen, deren Funktionalität bakterizider Eigenschaften im Vordergrund steht. Granulozyten weisen Funktionsstörungen in katabolen Stoffwechselsituationen auf. In einer Arbeit von Siedhoff et al. (1996) wurden bei 10 Patienten nach größeren abdominalchirurgischen Eingriffen neutrophile Granulozyten aus dem peripheren Blut isoliert und deren Cysteinyl-Leukotrien-Produktion analysiert, welche als Indikator für die Granulozytenfunktion gemessen wird. Hier zeigte sich eine schnellere Erholung der Granulozytenfunktion am 6. postoperativen Tag bei der Hälfte der Patienten, die Glutamin erhielten. Diese Hauptaufgaben von Granulozyten und Makrophagen beinhalten jedoch die Phagozytose und anschließende Lyse mit Hilfe von Proteasen/Lysozym und reaktiven Sauerstoffverbindungen.

Zum Teil erfolgt die Phagozytose, d.h. die intrazelluläre Aufnahme von Fremdartigen unspezifisch, zum Teil spezifisch über opsoniertes Antigen mittels eines 75 kD schweren IgG-Rezeptors (Fc $\gamma$ -Rezeptor-1, CD 64) [Berntzen et al. 2006] oder den 165 kD schweren Komplementfaktor-3-Rezeptor (C3bi-Rezeptor, CD 11b) [Malizia et al. 1991, Sutterwala et al. 1996]. Beide Bindungsarten setzen einen Besatz des Fremdartigen mit Antikörpern vom IgG-Typ oder des C3-Komplementfaktors voraus und damit eine vorherige Antigenerkennung. Der C3bi-Rezeptor ist ebenso Bestandteil des Adhäsionskomplexes Mac-1-Integrin wie CD 18, der ebenfalls als Adhäsionsfaktor fungiert. Der oxidative Burst, also die Generierung reaktiver Sauerstoffradikale (Superoxide), die bei Granulozyten zur Zerstörung der Zelle und zu den klassischen Entzündungssymptomen führt, erfolgt maßgeblich durch ein NADPH-abhängiges Oxidasesystem. Glutamin ist mit seinem Metabolismus in die Funktion der NADP<sup>+</sup>-abhängigen Malat-Dehydrogenase involviert. NADPH wiederum ist am Elektronentransfer beteiligt, der zur Reduktion molekularen Sauerstoffs führt [Newsholme 2001].

CD 11b und CD 64 zeigen in unserer Studie bei den Monozyten keine Änderung der Expression, während Granulozyten bei CD 11b eine Abnahme, aber bei der Expression von CD 64 eine Zunahme zeigen. Insgesamt überwiegt bei Granulozyten eine Zunahme der IgG-gekoppelten Phagozytose, während diese Form bei den Monozyten zu keiner signifikanten Zunahme führte. Spittler et al. (1995) konnten in vitro eine Abnahme der CD 11b/CD 18-Expression von Monozyten bei unterschiedlichen Glutaminkonzentrationen nachweisen. Zu einem signifikanten Abfall kam es bei Konzentrationen von unter 0,3 mmol Glutamin. Diese Beobachtung hatte

ebenso einen Einfluss auf die Phagozytose von opsonierten *Escherichia coli* Bakterien. Im Tierversuch mit chemisch induzierter Peritonitis konnten Ikeda et al. (2003) keinen Unterschied in der CD 11b-Expression auf Peritonealmakrophagen zwischen enteral ernährten Mäusen, solchen die eine Standard-TPN, und jenen, die zusätzlich Glutamin parenteral erhielten, feststellen. Diese Beobachtung deckte sich jedoch nicht mit einer erhöhten Phagozytoserate, wohingegen der oxidative Burst unverändert blieb. Die schlechtesten Ergebnisse zeigte die Gruppe von Tieren, welche die Standard-TPN erhielten. Somit scheint die Phagozytose über andere Mechanismen abzulaufen. Aus den Untersuchungen der Arbeitsgruppe um Spittler (1995) geht weiter hervor, dass die CD 64-Expression auf Monozyten schon ab Konzentrationen von unter 0,6 mmol Glutamin signifikant zu sinken beginnt. In einer Untersuchung von Boelens et al. (2002) an Patienten mit einem Polytrauma und enteraler Glutaminzufuhr zeigte sich kein Unterschied in der Expression von CD 64, was sich in unseren Ergebnissen ebenfalls widerspiegelt. Hingegen konnte diese Studie am Tag 3 bis Tag 5 nach dem Trauma einen signifikanten Unterschied in der Plasmaglutaminkonzentration wie der HLA-DR-Expression auf Monozyten zeigen, die in der Glutamingruppe signifikant höher war.

Hinsichtlich des Phagozytoseverhaltens unterscheiden sich beide Zellrassen in unserer Studie deutlich. Während die Monozyten einen deutlichen Anstieg der Phagozytosefähigkeit zeigen, ist dieser bei den Granulozyten am Tag 0 sogar vermindert und erreicht am Tag 1 wieder Ausgangswerte, um sich im weiteren Verlauf nicht mehr wesentlich zu ändern.

Wallace und Keast haben in den in vitro Untersuchungen aus dem Jahr 1992 zeigen können, dass Glutamin ab einer Konzentration von mehr als 0,125 mmol/l ( $p < 0,025$ ) zu einer gesteigerten Phagozytose von Cr51-markierten Schafserythrozyten durch Peritonealmakrophagen von BALB/c-Mäusen führt. Gleichzeitig ging diese Eigenschaft mit einer erhöhten 3H-Uridin-Inkorporation einher und zeigte eine erhöhte RNA-Synthese. Gleiches konnten Spittler et al. (1995) in vitro mit vergleichbaren Ergebnissen aufweisen.

In einer klinisch kontrollierten Studie von Furukawa et al. (1997) an sieben ausgewählten Patienten nach größeren gastrointestinalen Eingriffen und Standard-TPN zeigte sich, dass es nach Kultivierung von Monozyten und Granulozyten in unterschiedlichen Kulturmedien mit ansteigenden Glutaminkonzentrationen (0 bis 2 mmol), am 7. Tag postoperativ bei 2 mmol/l Glutamin zu einer erhöhten Phagozytoserate kam. Gleiches galt auch für die Generierung reaktiver Sauerstoffverbindungen von Granulozyten und Monozyten gleichermaßen an den Tagen 3 und 7 nach der Operation und bei Glutaminkonzentrationen von 2 mmol/l. In gewisser Weise spiegeln unsere Daten diese Funktionseinschränkung bei der Generierung reaktiver

Sauerstoffverbindungen wider. Während die Monozyten keine Veränderungen aufweisen, zeigen die Granulozyten sogar an den Tagen 0 und 5 eine verminderte Fähigkeit des oxidativen Burst. Beide Gruppen unterscheiden sich indes nicht signifikant und zeigen sowohl bei der Phagozytose als auch beim oxidativen Burst annähernd gleiche Kurvenverläufe. IL-10 hat dabei keinen Einfluss auf den oxidativen Burst [Galova et al. 2004].

Zusammengefasst kann man sagen, dass die Phagozytose und der oxidative Burst glutaminabhängig zu sein scheinen. Dies ist jedoch nicht unmittelbar an die Expression von Rezeptoren für IgG oder Komplementfaktor gebunden. Ebenso ist diese Fähigkeit unmittelbar postoperativ beeinträchtigt und kann zumindest in der Kultur durch Glutamin in Konzentrationen, teilweise oberhalb physiologischer Werte, erhöht werden [Furukawa et al. 2000]. Diese Erkenntnis weisen unsere Daten in vivo nicht aus, zumal die Plasmakonzentrationen weit unter den oben erwähnten Werten lagen. Ein Grund für die verminderte Generierung von Superoxiden ist u.a. die Adrenalin-abhängige Hemmung, wie sie üblicherweise postoperativ beobachtet wird und im Zusammenhang mit einer verminderten Glutaminkonzentration steht. In vitro ist diese Hemmung durch Inkubation von neutophilen Granulozyten in einem Medium von 2 mmol/l Glutamin wieder rückgängig zu machen [Garcia et al. 1998].

#### **4.4. Postoperative Immunsuppression**

Entzündliche Prozesse unterliegen keinem starren Schema. Sie bestehen aus verschiedenen modulatorischen Komponenten, die je nach Gewichtung einen Prozess in die eine oder andere Richtung lenken können. In den letzten Jahren wurden diese Funktionen immer weiter analysiert und klassifiziert, insbesondere was die Population der CD 4-positiven T-Helferzellen betrifft und schließlich zur Differenzierung von Th1- und Th2-Zellen führte. Diese Charakterisierung beschränkt sich dabei lediglich auf das von den Zellen produzierte Zytokinmuster und nicht auf anderweitige Marker wie beispielsweise Oberflächenantigene.

Th1-Zellen produzieren neben IL-2 weitere proinflammatorische Zytokine wie INF- $\gamma$ , das eine Aktivierung von zytotoxischen T-Zellen und eine Up-Regulation von HLA-DR auf Monozyten zur Folge hat. Gleichzeitig hemmen sie B-Zellen und deren IgE-Synthese. Insgesamt wirkt dieses Reaktionsmuster also entzündungsfördernd und allergiehemmend, so dass diese Reaktion häufig auch als proinflammatorisch bezeichnet wird [Abbas, Immunologie, Huber 1996].

Th2-Zellen produzieren u.a. IL-4, -5 und -10 und haben darüber einen inhibierenden Effekt auf Th1-Zellen. Sie fördern weiterhin die IgE-Bildung durch B-Lymphozyten und aktivieren eosinophile Granulozyten. Sie wirken somit den Th1-Zellen entgegen, weshalb man diesen

Prozess auch als antiinflammatorische Reaktion bezeichnet, was sich u.a. in einer verminderten Expression von HLA-DR auf Monozyten widerspiegelt [Abbas, Immunologie, Huber 1996]. Neben dem SIRS, das maßgeblich durch proinflammatorische Zytokine getriggert und unterhalten wird, scheinen auch antiinflammatorische Zytokine wie IL-10 an einem Multiorgan dysfunktionssyndrom beteiligt zu sein, so dass es schlussendlich zu einer Aktivierung beider efferenter Schenkel der Zytokinantwort kommt (mixed antagonistic response syndrom; MARS) [Bauer et al. 1998].

Die meisten Untersuchungen zu Glutamin und seiner Wirkung auf das Immunsystem beschränken sich auf die Untersuchung proinflammatorischer Zytokine wie TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , IL-6 oder IL-8. Insgesamt zeigen die in vitro Untersuchungen von Chang et al. (1999), dass insbesondere die Th1-Immunantwort glutaminabhängig ist, wohingegen eine Th2-Antwort durch Glutamin unbeeinflusst bleibt. Weiterhin kommen Yaqoob et al. (1998) in der Kultur von menschlichen peripheren mononukleären Zellen zu dem Schluss, dass Glutamin die T-Zell-abhängige Zytokinantwort stärker beeinflusst als die nur minimal steigerungsfähige Antwort von Monozyten.

Stellvertretend für die postoperative antiinflammatorische Reaktion wurden in unserer Studie die IL-4- und IL-10 Konzentrationen untersucht. IL-4 ist ein 20 kD großes Zytokin, das von CD 4-positiven T-Zellen und Mastzellen gebildet wird und zu einer Hemmung der Aktivierung und Proliferation von B-Zellen, mononukleären Zellen und T-Lymphozyten führt. Außerdem bewirkt es bei B-Zellen einen Antikörper-Switch zu IgE [Mosman et al. 1996] und führt zu einer erhöhten Expression von MHC-Klasse-II-Molekülen auf verschiedenen Zellen. Die Hauptaufgabe besteht darin, allergische Reaktionen zu regulieren. IL-4 hemmt die Makrophagenaktivierung und verhindert die meisten Effekte von INF- $\gamma$ . Diese Wirkung hat auch IL-10, das von Th2-Zellen produziert wird, so dass eine Aktivierung des Th2-Subsets durch IL-4 mit einer verminderten Makrophagenreaktion einhergeht. Eine erhöhte lokale IL-4-Konzentration induziert daher eine Entzündungsreaktion, die reich an Eosinophilen und Monozyten ist [Abbas, Immunologie, Huber 1996].

IL-10 ist ein 18 kD schweres Zytokin, das in der Masse von dem Th2-Subset CD4-positiver T-Helferzellen synthetisiert wird. Seine Hauptaufgabe besteht darin, die Zytokinproduktion (TNF, IL-1, Chemokine und IL-12) von Makrophagen zu hemmen und akzessorische Funktionen der Makrophagen bei der T-Zell vermittelten Immunreaktionen zu unterdrücken [Enk et al. 1994, Becker et al. 1994]. Gleichzeitig bewirkt es bei menschlichen B-Zellen einen aktivierenden Effekt mit einem Switch zu IgG<sub>4</sub>.

Wie bei Chang et al. (1999) konnte auch bei unseren Untersuchungen ein Einfluss weder auf IL-4 noch auf IL-10 festgestellt werden. Während es bei der IL-4-Konzentration sowohl in der Glutamingruppe als auch in der Kontrollgruppe zu einem signifikanten Abfall am Tag 0 und Tag 1 kam, und die Werte ab Tag 3 wieder auf das Ausgangsniveau anstiegen, zeigte IL-10 einen deutlichen Anstieg ab Tag 0. Anschließend wies die IL-10-Konzentration zwar einen Werterückgang auf, blieb aber bis zum Ende des Beobachtungszeitraums signifikant erhöht. Diese unmittelbar erhöhten IL-10-Werte könnten somit auch den Verlauf des ICAM-1 erklären, das initial vermindert war und erst im weiteren Verlauf anstieg. Gleiches spiegelt sich in der Expression von HLA-DR auf Monozyten wider (siehe weiter unten).

In einer tierexperimentellen Untersuchung von Fukatsu et al. (2001) konnte gezeigt werden, dass die intestinale IL-4-Konzentration durch Glutamin in der TPN erhöht bzw. normalisiert werden konnte, während IL-10 keine Veränderungen aufwies. Bei septischen Mäusen hingegen war bei Yeh et al. (2005) durch Glutamin eine Verminderung des intralymphozytären INF- $\gamma$  und eine Erhöhung der IL-4-Expression zu erzielen. Bei einer enteral durchgeführten Applikation von Glutamin-angereicherter Nahrung konnten bei polytraumatisierten Patienten am Tag 1 nach dem Trauma keine Unterschiede und nach 14 Tagen bei der Kontrollgruppe verminderte Werte festgestellt werden [Boelens et al. 2004].

In der Übersicht scheint Glutamin weniger Einfluss auf die monozytenreiche, Th2-getriggerte Immunantwort zu haben, als dass dies bei der Th1-spezifischen Antwort eine Rolle spielt. Wohl mögen einzelne Faktoren wie die Phagozytose bei Monozyten/Makrophagen durch Glutamin beeinflusst werden, andererseits scheint bei der Entzündungsreaktion der Th2-Zellen-Monozyten Achse mittels IL-4, -10 u.a. der Einfluss von Glutamin beschränkt, wenn nicht sogar marginal zu sein.

Wie erwähnt führen IL-4 und IL-10 zu einer verminderten HLA-DR-Expression auf Monozyten. HLA-DR ist ein Teil des sogenannten MHC-Klasse-II-Moleküls (major histocompatibility complex), das im Rahmen der spezifischen Immunantwort in Verbindung mit dem akzessorischen T-Zell-Rezeptor CD 3 und dem eigentlichen T-Zell-Rezeptor TCR  $\alpha/\beta$  die Antigenerkennung vermittelt und zwar die CD 4-restriktive T-Zell-Antwort. Die größte Expressionsdichte findet sich daher auf Antigen präsentierenden Zellen wie Makrophagen aber auch B-Lymphozyten. Die Expressionsdichte auf Makrophagen stellt ein Maß der Immunparalyse bzw. der Deaktivierung im Rahmen septischer und anderer Krankheitszustände dar [Volk et al. 1996, Kox et al. 2000]. Experimentell konnte eine Abhängigkeit der HLA-DR-Expression auf Monozyten von der Glutaminkonzentration im Kulturmedium gezeigt werden.

Glutamin steigert in vitro die Expression von HLA-DR um 40 %, wenn im Kulturmedium die Glutaminkonzentration von 200  $\mu\text{mol/l}$  auf 2  $\text{mmol/l}$  gesteigert wird. [Spittler et al. 1995].

In einer Reihe von klinischen Studien wurde die Hypothese überprüft, ob die in vitro Ergebnisse einer Verbesserung der HLA-DR-Expression auf Monozyten durch Glutamin in vivo Bestand haben. Wang et al. (2006) untersuchten den Glutaminspiegel bei 40 kritisch Kranken (APACHE II Score  $\geq 8$ ) im Vergleich zu zehn gesunden Probanden und fanden einen signifikant geringeren Glutaminspiegel ( $p < 0,05$ ) bei der Experimentalgruppe sowie eine signifikant geringere Expression von HLA-DR auf Monozyten ( $p < 0,05$ ). In einer Untersuchung von Spittler et al. 2001 wurden 30 Patienten nach großen abdominalchirurgischen Eingriffen über 48 h postoperativ jeweils 0,5 g/kg Körpergewicht der Dipeptide Alanin-Glutamin oder Glycin-Glutamin zusätzlich der isonitrogenen total parenteralen Ernährung zugesetzt. Man fand heraus, dass die Gruppe, die Glycin-Glutamin erhielt, eine signifikant höhere Expression von HLA-DR bei Monozyten aufwies als die Kontrollgruppe, die kein Glutamin erhielt. Überraschenderweise konnte dieser Effekt bei Alanin-Glutamin als nicht signifikant ausgewiesen werden. Zum gleichen Ergebnis kommen Jacobi et al. (1999) bei 34 Patienten nach Ösophagusresektion. Patienten, die Glutamin erhielten (0,4 g/kg/d über 5 Tage), zeigten eine raschere Kompensation der HLA-DR-Expression auf Monozyten. Ein solches Ergebnis konnte in unserer Studie nicht verifiziert werden. Die Expression auf Monozyten nahm signifikant am Tag 0 ab und erholte sich während des gesamten Beobachtungszeitraumes nicht. Signifikante Gruppenunterschiede existierten nicht. Um eine mögliche Erklärung für die nicht signifikanten Ergebnisse unserer Daten zu liefern, sei auf die in anderen klinischen Studien verwendeten, Glutaminkonzentrationen verwiesen.

## **4.5. Klinische Parameter**

### **4.5.1. Entzündungsparameter**

Das C-reaktive Protein (CRP) ist ein 140 kD schweres Akute-Phase-Protein und wird nach Stimulation v.a. durch IL-6 in Hepatozyten synthetisiert. Die Plasmakonzentration steigt binnen 18-24 h nach Beginn eines entzündlichen Prozesses an und kann Werte um den Faktor 1000 erreichen. CRP aktiviert in Verbindung mit dem Bakterium das Komplementsystem und führt zur Opsonierung durch C3b [Heinrich et al. 1990]. Es ist weit verbreitet als globaler und allgemeiner Entzündungsmarker. Wischmeyer et al. (2001) konnten an 26 Polytraumapatienten mit Verbrennungen von 25 bis 90 % Prozent und parenteraler Glutaminapplikation einen verminderten CRP-Wert nach 14 Tagen feststellen. Gleiches zeigten Okenga et al. 2002. An 28 Patienten mit akuter Pankreatitis und 0,3 g/kg Alanin-Glutamin am Tag 14 stellten sie neben

erhöhten Lymphozytenwerten, höheres Albumin und ein vermindertes CRP fest. Ein derartiger Unterschied war bei unseren Daten nicht zu beobachten, hier stieg das CRP am Tag 0 signifikant an, um auf einem erhöhten Niveau im Rahmen unseres Beobachtungszeitraumes zu verharren.

Procalcitonin (PCT) ist das Propeptid des Calcitonins. Bisher ist eine hormonelle Aktivität nicht bekannt. Es besteht aus 113 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 13 kD [Jacobs et al. 1981]. Es wird von den C-Zellen der Schilddrüse synthetisiert. Calcitonin besitzt eine Halbwertszeit (HWZ) von ca. 10 Minuten, während Procalcitonin eine Halbwertszeit von 25-30 h besitzt. Bei gesunden Probanden ist Procalcitonin mit Standardmethoden nicht nachweisbar (<0,1 ng/ml). Bei parasitären, bakteriellen oder pilzbedingten systemischen Infektionen können die Werte bis auf über 100 ng/ml ansteigen [Oberhoffer et al. 1997]. Aber auch bei Patienten im Zustand nach totaler Thyreoidektomie werden vergleichsweise hohe Spiegel im Rahmen systemischer Infektionen gefunden, so dass von anderen Quellen der Synthese ausgegangen werden muss. Als mögliche Quellen wurden Leukozyten [Oberhoffer et al. 1997] und neuroendokrine Zellen der Lunge [Becker et al. 1993] identifiziert. Marnitz et al. (1997) zeigten bei Patienten, die sich einer Ösophagusresektion unterziehen mussten, erhöhte postoperative Werte. In unseren Daten war ebenfalls ein postoperativer Anstieg des PCTs gegenüber dem CRP mit einer zeitlichen Verzögerung zu konstatieren. Ein Maximum erreichten die PCT-Werte am Tag 1. Signifikante Gruppenunterschiede existierten nicht.

#### **4.5.2. Infektionen und mikrobielle Besiedelung**

Die mikrobielle Besiedelung von Operationswunden und Organen, die einer permanenten Auseinandersetzung mit der sie umgebenden Umwelt unterliegen, sind ein häufiges klinisches Phänomen. Dabei werden oft mechanische oder immunologische Schutzbarrieren des Körpers im Rahmen von anderweitig erforderlichen Therapiemaßnahmen überbrückt bzw. umgangen, beispielsweise durch Intubation [Dilworth et al. 1992] oder Blasenverweilkatheter [Moore et al. 2002]. Als Ausgangspunkt einer Infektion oder als Fokus systemischer Infektionen sind derartige Besiedelungen jedoch von einer Reihe weiterer Faktoren wie der Virulenz und Pathogenität des Erregerspektrums oder der Menge des inokulierten Erregers abhängig.

Eine Reihe von Studien haben die positive Wirkung von Glutamin als Zusatz zu der standardmäßig verwendeten parenteralen Ernährung zeigen können. Jacobi et al. kamen in einer mit unserer vergleichbaren Studie aus dem Jahr 1999 zu dem Ergebnis, dass es bei Patienten nach Ösophagusoperationen durch Glutamin in der parenteralen Nährformel nur zu einer Wundinfektion bei insgesamt 28 Patienten kam. In der Kontrollgruppe dagegen kam es zu fünf Wundinfektionen, einer Sepsis, drei pulmonalen und einer kardiovaskulären Infektion. Ein-

schränkend muss hier jedoch erwähnt werden, dass die zugeführte Glutaminmenge mit 0,4 g/kg/d um ein Vielfaches höher lag, als das in unserer Studie der Fall war. Die häufig herausgearbeitete verminderte Bakteriämie bei Patienten unter Glutamin-Supplement betrifft insbesondere gramnegative Bakterienspezies. Bei der von Wischmeyer et al. (2001) durchgeführten Studie, konnte im Rahmen der parenteralen Ernährung mit Glutamin eine um 35 % niedrige gramnegative Bakteriämie (8 % vs. 43 % bei Standard-TPN) nachgewiesen werden. Und auch die enterale Glutaminapplikation erbrachte bei Houdijk et al. (1998) ähnliche Resultate. Bei 60 kritisch erkrankten Patienten (Injury Severity Score >20) entwickelten 5 von 29 Patienten in der Glutamingruppe eine Pneumonie, verglichen mit 14 von 31 in der Kontrollgruppe ( $p < 0,005$ ). Eine Bakteriämie wurde in 7 % der Glutamin- und 42 % der Kontrollgruppe diagnostiziert. Nur ein Patient in der Glutamin- und acht in der Kontrollgruppe entwickelten eine Sepsis. Die Autoren merkten weiter an, dass die meisten positiven Bakterienkulturen, einschließlich die der septischen Patienten, gramnegative Bakterienspezies aufwies, was wiederum die Rolle des Darmes als glutaminabhängiges Organ und bei katabolen Risikopatienten als möglichen Ausgangspunkt einer Infektion oder gar eines septischen Krankheitsverlaufes unterstreicht. Ebenfalls war die HLA-DR-Expression auf Monozyten in der Glutamingruppe signifikant höher als in der Kontrollgruppe. Weniger Infektionen konnten auch MacBurney et al. (1994) in einer retrospektiven Auswertung einer randomisierten, doppelblinden prospektiven Studie an 43 Patienten nach Knochenmarktransplantation nachweisen. Die hier verwendete Glutaminmenge betrug 0,57 g/kg/d. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen Scheltinga et al. (1991) und Ziegler et al. (1992). Unsere Ergebnisse zeigen eine derartige Beeinflussung durch Glutamin nicht. Bei den röntgenologisch detektierten entzündlichen Veränderungen der Lungen wiesen jeweils drei Patienten beider Gruppen ein bis vier entzündlich infiltrierte Lungenquadranten auf. Eine Besiedelung der Operationswunden durch Bakterien wiesen 7 Patienten der Kontrollgruppe und 3 Patienten der Glutamingruppe auf - ein signifikanter Gruppenunterschied war nicht zu beweisen. Weit weniger positive mikrobiologische Befunde waren im Urin (0 vs. 3 Patienten) und im Trachealsekret (1 vs. 2 Patienten) nachweisbar, signifikante Unterschiede waren jedoch auch hier nicht zu konstatieren. Fürst et al. (1995) haben in einer Literaturübersicht über 15 Studien herausgearbeitet, dass die Gefahr einer mikrobiellen Besiedelung bei ausreichenden Glutaminmengen von mindestens 12-15 g pro Tag vermindert werden kann. Gleiches galt für andere Parameter wie die Stickstoffbilanz oder klinisch manifeste Infektionen. Rechnet man die von uns verwendete Glutaminzufuhr von 0,15 g/kg/d auf einen 70 kg schweren Menschen um, so

erhält man 10,5 g, womit der von Fürst et al. geforderte Wert nicht erreicht wird und somit ebenfalls Grund für unsere Ergebnisse sein mag.

#### **4.6. Unbekannte Variablen und Störfaktoren**

Die Einflussnahme von Medikamenten wie Anästhetika und Schmerzmittel auf Funktionen des Immunsystems sind vielfältig. Hinzu kommen im weiteren Verlauf meist schlecht kontrollierbare Faktoren, wie etwa die perioperative Stressreaktion oder Schmerzen. Da es sich hier um ein komplexes Netzwerk verschiedenster Variablen handelt, betrifft es beide efferenten Immunreaktionen in unterschiedlichem Maße. Eine Beeinflussung entweder der Th1- oder der Th2-dominanten Immunantwort bedingt daher auch immer eine Veränderung des jeweiligen Gegenspielers. Im Anschluss ist eine Auswahl solcher Faktoren aufgeführt.

Narkose-relevante und perioperative Einflüsse:

- Das operative Trauma führt zu einer Aktivierung von Nebennierenrindenhormonen wie Cortisol, das die Zytokinantwort hemmen kann. Hingegen stimuliert Prolactin die T-Zell-Proliferation und Synthese von IL-2, IL-3 und IL-6 [Mukherjee et al. 1990]. Dopamin hemmt hierbei die Prolaktinausschüttung im Hypophysenvorderlappen, das Peristaltikum Metoclopramid steigert hingegen seine Freisetzung.
- Das operative Trauma führt zu einer Abnahme CD 4-positiver Helferzellen bei weitgehend konstanten CD 8-positiven Lymphozytenzahlen. Weiterhin ist die lymphozytäre Proliferation, durch von Makrophagen verstärkte Prostaglandin E2-Produktion gehemmt, wie auch eine stärkere Verschiebung der Lymphozytenantwort in Richtung des Th2-Subsets mit verminderter Synthese von INF- $\gamma$  zu beobachten [Ertel et al. 1992].
- Es gibt Hinweise, dass es im Rahmen der Sepsis zu einer Verminderung der Neutrophilen- und Monozytenfunktionen, beispielsweise einer verminderten Chemotaxis, kommt [Furebring et al. 2005].
- Die maschinelle Beatmung peri- wie auch postoperativ führt zu einer Erhöhung der Zytokinspiegel im peripheren Blut, wie dies durch Nasraway für IL-2, -6 und -8 gezeigt wurde [Nasraway 2003].
- Eine total intravenöse Anästhesie mit Propofol und Alfentanil führt zu einer verringerten IL-6- und Cortisolantwort im Vergleich zu einer Inhalationsanästhesie mit Isofluran und Lachgas [Crozier et al. 1994].

- Etomidate und Thiopental hemmen über mehrere Stunden die ACTH-abhängige Cortisolantwort [Kenyon et al. 1984].
- Persistieren der Stressantwort bei unzureichender Analgesie führt zu einer Beeinträchtigung der Immunantwort, insbesondere der „natural killer cells“ [Sklar et al. 1979].
- Beeinflussung von Endotoxin erkennenden Komplexen und Reaktivität des Systems in Folge der Beeinflussung der Expression von CD 14 durch verschiedene Anästhetika [Bauer et al. 1998].
- Hemmung des „respiratory burst“ von PMN durch Thiobarbiturate und Propofol [Krumholz et al. 1994].

#### Weitere medikamentöse Einflüsse:

- Hemmung der Synthese von TNF, IL-10 und IL-6 durch verschiedene Medikamente wie Phosphodiesterasehemmer,  $\beta$ -Agonisten, Dobutamin oder COX-Hemmer und Fieber [Kleinschmidt et al. 1998, Valesco et al. 1991].
- Glukokortikoide haben eine starke (primär translational lokalisierte) TNF-inhibierende Wirkung [Bauer et al. 1998].
- Funktionen wie die Expression von CD 11b oder CD 35 und die damit verbundene gesteigerte Phagozytose und der anschließende oxidative Burst in Monozyten werden durch Analgetika aus der Gruppe der Morphine gehemmt. Ausnahme hier das Morphinderivat Fentanyl [Menzebach et al. 2004]. Hohe Dosen von Fentanyl können zu einer gesteigerten Ausschüttung von TNF- $\alpha$  führen [Lahat et al. 1992].
- Chemotaxisinhibierende Wirkung von Opioiden, die durch den Antagonisten Nalaxon aufhebbar ist und maßgeblich mit der Lipidlöslichkeit einhergeht [Van Epps et al. 1984]. Daneben hemmen Opioide die INF- $\gamma$ -Freisetzung von mononukleären Zellen im Blut [Peterson et al. 1987].
- Durch Gabe von LPS- (Lipopolysaccharid) bindenden Substanzen kann im Rahmen einer systemischen Infektion mit gramnegativen Bakterien die Makrophagenaktivierung über CD 14 vermindert sein (Aminoglykoside). Andere Antibiotika wie Cephalosporine führen durch die Bakterizidie zu einer erhöhten Freisetzung von LPS [Dofferhoff et al. 1991].

Einflüsse durch Volumen- und intravenöser Therapie:

- Hemmung makrophagenaktivierender Zytokine durch Pharmaka (Pentoxiphyllin oder  $\beta$ -agonistische Katecholamine). Ob in diesem Rahmen der Speicherung von Volumenersatzmittel wie HAES eine ähnliche Rolle zukommt, ist nicht belegt [Ginz et al. 1998].
- Die Interaktion von Granulozyten und Endothel („slow rolling“ mittels e- und p-Selektine, shedding CD 11b/CD 18 sowie die Adhäsion über ICAM-1) wird durch Plasmaersatzmittel wie Dextrane und HAES, nicht jedoch durch Gelantine beeinflusst [Bauer et al. 1998].
- Fremdbluttransfusionen führen zu einem immunsuppressiven Effekt. Dieser korreliert mit der Anzahl der transfundierten Konserven und lässt sich durch buffy coat armes Fremdblut vermindern, aber nicht verhindern [Nielsen 1995].
- Zufuhr von Lipiden insbesondere mittelkettige Fettsäuren erhöhen die CD 11b- und erniedrigen die CD 62L-Expression auf Leukozyten [Versleijen et al. 2005].

## **4.7. Methodenkritik**

### **4.7.1. Allgemeine Vorbetrachtung**

Doppelblindstudien stellen im klinischen Studiendesign einen „Goldstandard“ dar, da sie eine oder mehrere der zu untersuchenden Variablen variieren und alle bekannten und kontrollierbaren Faktoren ausschließen bzw. vergleichbar halten. Übersieht man die Funktionen und die Bedeutung, welche die Aminosäure Glutamin im menschlichen Stoffwechsel besitzt, von der Regulation der Zellgröße bis hin zum Ammoniakstoffwechsel, so sind eine Reihe inter- und intraindividuelle, bekannte und unbekannte Variablen vorstellbar, die den Ausgang der Untersuchungen beeinflusst haben können. Beispielsweise wurde in der Studie das Gewicht der Studienteilnehmer miteinander verglichen, wohingegen eine Glutaminspeicherung nur in der Skelettmuskulatur und nicht im Fettgewebe erfolgt, Alter und Muskel- bzw. Fettverteilung sich in der normalverteilten Bevölkerung jedoch invers verhalten [Griffith 1996]. Weiterhin schwer abschätzbar sind die Einflüsse der malignen Grunderkrankung auf den Stoffwechsel, nicht zuletzt auf den Glutaminstoffwechsel, wie in der Einleitung beschrieben oder auf das Immunsystem selbst.

### **4.7.2. Glutaminapplikation, Dosierung und Zeitpunkt**

Zeitpunkt und Menge der Applikation von Glutamin sind als Hauptkritikpunkte anzuführen. Da der Einfluss von Glutamin auf die Proteinbiosynthese oder Zytokinproduktion mit einer

gewissen Latenz erfolgt, kann mit einer direkten Einflussnahme erst ab Tag 3 nach der Applikation gerechnet werden [Meisse et al. 1999].

Die Glutamingaben erfolgten jedoch vom zweiten bis zum achten Tag postoperativ. Somit war die Glutaminapplikation zum Zeitpunkt des Traumas nicht gegeben und der weitere Behandlungszeitraum möglicherweise zu kurz. Kurzfristige (Hydratationszustand der Zellen, osmotische Wirksamkeit) sind somit kaum von längerfristigen Wirkungen (Proteinbiosynthese) zu trennen.

Hauptkritikpunkt ist aber die geringe Konzentration an Glutamin (0,15 g/kg Körpergewicht/d).

Autor	Jahr	GLN-TPN	Dauer (d)	Patienten	Ergebnisse
Stehle	1989	0,17 g/kg/d	5	12	improved N <sub>2</sub> bilance, preservation of muscle GLN
Van der Hulst	1993	0,23 g/kg/d	12	20	intestinal permeability unaltered, preserved mucosal integrity
O’Riordain	1994	0,18 g/kg/d	6	22	improved T cell DNA synthesis
Tremel	1994	12 g/d	9	12	suggesting preventing intestinal atrophy, less increased permeability
Van Zaanen	1994	0,26 g/kg/d	18	15	weight gain per chemotherapy cycle, no other significant differences
Weingartmann	1996	14-28 g/kg	5	16	highest dose necessary to sustain effect on plasma levels
De Beaux	1998	0,22 g/kg/d	7	14	IL-8 was reduced, trend for lymphocyte proliferataion
Morlion	1998	0,3 g/kg/d	5	28	improved N <sub>2</sub> bilance, improved lymphocyte recovery, improved cysteinyl-leukotriene generation, shorter hospital stay
Brown	1998	50 g/d	27	34	preservation protein C and albumin, protective of hepatic function
Decker-Baumann	1999	14-22 g/d	2	24	reduction of mucositis and ulcerations of gastric and duodenal mucosa after chemotherapy, better preserved histology gut
Jiang	1999	0,5 g/kg/d	6	120	improved N <sub>2</sub> bilance, suggesting preservation intestinal permeability, shorter hospital stay
Jacobi	1999	0,4 g/kg/d	5	34	reduction complications, faster compensation of postoperative immune suppression
Van Acker	2000	0,21 g/kg/d	8-10	23	GLN administration does not inhibit endogenous GLN synthesis

Tabelle 7) Übersicht über Dauer, Patienten und Glutaminmenge in verschiedenen Studien. Entnommen aus Boelens et al. (2001). Berücksichtigt wurden nur Studien, in denen Glutamin Dipeptide verwendet wurden (GLN-TPN = Glutamin-angereicherte totale parenterale Ernährung).

Wie die Tabelle 7) zeigt, liegen die meisten Glutaminkonzentrationen in Studien weit über den von uns verwendeten Konzentrationen und Applikationsmengen. Viele Studien konnten signifikante Unterschiede zwischen einer glutaminhaltigen und einer glutaminfreien TPN zeigen. In der Katabolie verbraucht der Darm 11-15 g Glutamine pro Tag. Niere und Immunsystem verbrauchen weitere 6-8 g, wohingegen der Muskel nur 8-10 g zur Verfügung stellen kann, somit bleibt ein Defizit von (10 g) 12-15 g [Fürst et al. 1995, Stehle et al. 1996]. Berechnet man die in unserer Studie verwendete tägliche Menge für einen 70 kg schweren Menschen, ergibt sich allenfalls eine tägliche Menge von 10,5 g, womit die pro Tag infundierte Menge an der Untergrenze liegt. Somit muss in katabolen Stoffwechselsituationen ein Mindestbedarf von 10-15 g Glutamin in 24 h veranschlagt werden, um das durch den metabolischen, postoperativen Stress ausgelöste Defizit auszugleichen. Novak et al. haben 2002 in einer großen Übersichtsarbeit 14 randomisierte Studien an chirurgischen Patienten, die sich einem Elektiveingriff unterzogen hatten, und internistisch-intensivmedizinische Patienten hinsichtlich der Mortalität, Infektionskomplikationen und Krankenhausaufenthaltsdauer analysiert. Dabei war eine Glutamin-Applikation mit einer risk ratio von 0,78 bei der Mortalität assoziiert und einer niedrigeren Rate an infektiologischen Komplikationen (risk ratio 0,81) sowie einem kürzeren Krankenhausaufenthalt (-2,6 Tage) verbunden. In Hinblick auf die Mortalität wurden Gruppen unterschieden mit einer parenteralen Glutaminapplikation (risk ratio 0,71) und high dose glutamine (risk ratio 0,73) verglichen mit Studien, die enteral Glutamin anwandten (risk ratio 1,08) und solchen mit low dose Glutamin Applikation (risk ratio 1,02). In der weiteren Subgruppenanalyse zeigte sich, dass bei chirurgischen Patienten kein Effekt, bei internistisch-intensivmedizinischen Patienten ein Trend zu einer verminderten Mortalität auszumachen war (nicht signifikant). Komplikationen waren bei chirurgischen Patienten signifikant niedriger, während die Vergleichsgruppe nur einen positiven Trend aufwies. Und auch bei der Krankenhausverweildauer zeigte sich bei chirurgischen Patienten eine Verkürzung, wohingegen die internistische Patientengruppe keinen Effekt aufwies. Weiterhin wurde zwischen low dose Glutamin mit  $<0,2$  g/kg/d und high dose Glutamin mit  $>0,2$  g/kg/d unterschieden. In der low dose Gruppe war in keinem der drei untersuchten Endpunkte ein signifikanter Effekt nachzuweisen, während die high dose Gruppe signifikante Veränderungen in Bezug auf die Krankenhausverweildauer und die Komplikationsrate zeigte - bei der Mortalität jedoch allenfalls nur ein positiver Trend festzustellen war.

Somit ist die Patientengruppe, die in unserer Studie untersucht wurde, als chirurgische Patientengruppe mit einer low dose Glutaminapplikation einzuordnen. In Anbetracht der eigenen Ergebnisse waren damit in den dargestellten Endpunkten keine signifikanten Ergebnisse zu erwarten.

## 5. Zusammenfassung

### 5.1. Allgemeine Betrachtung der Ergebnisse

Seit den experimentellen Erkenntnissen von Eagle und Salzman zur Rolle des Glutamins Ende der fünfziger Jahre, den in vitro Untersuchungen von Newsholme in den achtziger Jahren und den zahlreichen klinischen Studien der neunziger Jahre kommen nach wie vor, neben Untersuchungen an Zellkulturen und tierexperimentellen Daten, solche der klinischen Erprobung hinzu. Es gilt, experimentell gewonnene Ergebnisse in klinisch anwendbaren Settings zu überprüfen. Eine zweifelsfreie Klärung ob und inwiefern bei welchen Patientengruppen, in welcher Dosierung und in welchem Applikationszeitraum Glutamin eine sinnvolle Ergänzung zu den bisherigen Ernährungsregimen ist, bleibt umstritten. Ein Grund für diese Unsicherheit ist die Funktion der Aminosäure Glutamin selbst. So sind die Endpunkte vieler Studien recht vielfältig und reichen von rein ökonomischen Fragestellungen bis hin zu Untersuchungen einzelner Zellfunktionen. Die vorliegende Studie an 20 Patienten mit einem distalen Ösophaguskarzinom, die sich einer Ösophagusresektion mit anschließendem Magenhochzug unterzogen hatten, sollte dazu folgende Fragestellungen klären.

*1.) Gibt es zwischen der Studiengruppe, die zusätzlich Glutamin erhielt und einer Kontrollgruppe, die eine Standard-TPN erhielt, Unterschiede in der postoperativen Funktion von Makrophagen und Granulozyten?*

Beide Zellpopulationen wiesen in unterschiedlichen Parametern und Fähigkeiten signifikante Veränderungen auf, die teilweise ihre zellspezifische Funktionalität widerspiegeln. Signifikante Gruppenunterschiede konnten jedoch nicht aufgezeigt werden.

*2.) Kommt es in beiden Gruppen zu einer vergleichbaren postoperativen Immunsuppression?*

In beiden Patientenkollektiven zeigte sich ein annähernd gleicher Verlauf der Zytokine IL-4 und IL-10. Bei der HLA-DR-Expression auf Monozyten, als einen wichtigen Indikator der Immunsuppression, weisen die Kurvenverläufe ebenfalls signifikante Veränderungen und damit eine Beeinträchtigung der Immunfunktion auf. Ein Einfluss von Glutamin war jedoch nicht zu konstatieren. Beide Gruppen unterlagen einer vergleichbaren postoperativen, im Verlauf signifikanten Immunsuppression.

### *3.) Haben die immunologischen Veränderungen Auswirkungen auf klinisch erfassbare Parameter?*

Die untersuchten Entzündungsparameter CRP und PCT wiesen signifikante Verläufe postoperativ auf, eine Einflussnahme von Glutamin war nicht erkennbar. Bei den radiologisch erfassbaren Infiltrationen der Lunge lag ein positiver Trend der Glutamingruppe vor, ein signifikanter Unterschied konnte nicht nachgewiesen werden. Gleiches gilt für die mikrobielle Besiedelung der Operationswunden, wo weitaus mehr Patienten der Kontrollgruppe eine solche aufwiesen, allerdings nicht signifikant. Beim Keimnachweis im Sammelurin wie im Trachealsekret waren ebenfalls keine signifikanten Unterschiede feststellbar.

Einen signifikanten Einfluss von Glutamin konnte somit in dieser Untersuchung weder im Verlauf immunologischer, klinischer noch mikrobiologischer Parameter gefunden werden.

## **5.2. Therapeutischer Stellenwert und Ausblick**

Katabole, posttraumatische Stresssituationen gehen mit einer Verarmung des Skelettmuskels an Glutamin einher. Grund für diesen Verlust ist der plötzliche Bedarf von Organen, die unter physiologischen Bedingungen Glutamindonatoren sind, wie beispielsweise der menschliche Darm, zu Ungunsten anderer Organsysteme, wie des Immunsystems. In der Gesamtnettobilanz liegt somit ein Glutaminmangel des Gesamtorganismus vor. Aus dieser Erkenntnis folgte bereits vor fast drei Jahrzehnten die Schlussfolgerung einer entsprechenden Substitution, wie sie bei anderen Komponenten einer parenteralen Ernährung klinischer Standard sind. Kompliziert wird im Rahmen einer solchen Immunonutrition die Tatsache, dass die Effekte einer derartigen Ernährung über den Ausgleich eines rein strukturellen Mangels hinausgehen sollen, und mit der Therapie gezielt einzelne Organ- und Zellfunktionen beeinflussbar werden. Unklar bleibt dabei, für welche Patientengruppen welche Menge an Glutamin, welche Applikationsdauer oder -form, klinisch und auch aus Kostengründen sinnvoll sind, um welchen Effekt dabei zu erzielen. Dies spiegelt sich nicht nur in den unterschiedlichen, untersuchten Variablen sondern auch in den erhobenen Ergebnissen vieler klinischer Studien wider [Novak et al. 2002]. Die Ergebnisse unterscheiden sich zum Teil erheblich im Hinblick auf die Menge des zugeführten Glutamins, der Art der Zufuhr (enteral vs. parenteral), und sogar in der Art der verwendeten Dipeptide (Alanin-Glutamin vs. Glycyl-Glutamin). In der Übersichtsarbeit von Novak et al. (2002) wurde weiterhin durch Auswertung zahlreicher Studien herausgearbeitet, dass positive Effekte bei einer Glutaminzufuhr von mindestens 0,2 g/kg/d Glutamin zu erwarten sind, was sich mit den Empfehlungen von Fürst et al. (1995) von 12-15 g Glutamin pro Tag deckt.

In unserer Studie handelt es sich um eine Patientengruppe, die aufgrund des operativen Eingriffs (Zwei-Körperhöhlen-Eingriff) in eine Patientengruppe mit höherem Glutaminbedarf [Novak et al. 2002] einzuordnen ist und von einer weitaus höheren Glutaminzufuhr möglicherweise profitiert hätte. Fazit ist somit, dass für Patienten mit vergleichbaren operativen Eingriffen eine Glutaminzufuhr von 0,15 g/kg/d unzureichend ist. In keinen der von uns untersuchten Parameter und Variablen war ein signifikanter Gruppenunterschied und damit eine Veränderung erkennbar, die auf die Zufuhr von Glutamin zurückzuführen gewesen wäre. Dies verdeutlicht die Tatsache, dass beide Gruppen abfallende Glutaminspiegel im Plasma aufwiesen, die auch eine parenterale Zufuhr von Glutamin in der oben erwähnten Menge nicht hätte auffangen können. Und auch die Gesamtstickstoffbilanz ergibt hier ein schlüssiges Ergebnis, denn nicht wenige der erwähnten Untersuchungen führen die Wirkung von Glutamin einzig und allein auf eine Verbesserung der katabolen Stoffwechsellage zurück. Somit war eine Beeinflussung durch Glutamin in unserer Studie nicht gegeben, und es bleibt weiteren Studien überlassen, die optimale Menge an zuzuführendem Glutamin zu eruieren, um Patientengruppen mit gleichen oder ähnlich schweren Traumen zu entsprechen.

## 6. Quellennachweis

1. Abbas, A. K.: Immunologie/ Abul K. Abbas; Andrew H. Lichtman; Jordan S. Pober. Übers. von Beda M. Stadler und Max Hess.-Bern; Göttingen; Toronto; Seattle: Huber, 1996 Einheitsacht.: Cellular und molecular immunology <dt.>ISBN 3-456-82596-X.
2. Abumrad N.N., Morse E.L., Lochs H., Williams P.E., Adibi S.A.: Possible sources of glutamine for parenteral nutrition: impact on glutamine metabolism. *Am J Physiol.* 257 (2 Pt1.) (1989), E228-34.3.
3. **Ahlers O., Harndt K., Hodek R., Kietzmann C., Pettersson M., Ruland K., Fournier K., Neuhaus P., Falke K., Gerlach H.: Glutamine-enriched parenteral nutrition during postoperative catabolic state.** *Critical Care* 2000, 4(Suppl 1) (2000), 168.
4. Allendorf J.D.F., Bessler M., Whelan R.L., Trokel M., Laird D.A., Terry M.B., Treat M.R.: Postoperative immune function varies inversely with the degree of surgical trauma in a murine model. *Surg Endosc* 11 (1997), 427-430.
5. Aosasa S., Wells-Byrum D., Alexander J.W., Ogle C.K.: Influence of glutamine-supplemented Caco-2 cells on cytokine production of mononuclear cells. *JPEN* 27 (5) (2003), 333-339.
6. Askanazi J., Elwyn D.H., Kinney J.M., Gump F.E., Michelsen C.B., Stinchfield F.E., Fürst P., Vinnars E., Bergström J.: Muscle and plasma amino acids after injury: The role of inactivity. *Ann Surg* 188 (1978), 797-803.
7. Baskerville A., Hambleton P., Benbough J.E.: Pathological features of glutaminase toxicity. *Br J Exp Pathol* 61 (1980), 132-138.
8. Bauer M., Rensing H., Ziegenfuß T.: Anästhesie und perioperative Immundefunktion. *Anaesthesist* 47 (1998), 538-556.
9. Becker K.L., O'Neill W., Snider R.H., Nysten E.S., Jeng J., Silva O.L., Lewis M.S., Jordan M.H.: Hypercalcitoninemia in inhalation burn injury: A response of the pulmonary neuroendocrine cells? *Anatomic Record* 236 (1993), 136-138.
10. Becker J.C., Czerny C., Brocker E.B.: Maintenance of clonal anergy by endogenously produced IL-10. *Int Immunol* 6 (1994), 1605-1612.
11. Berntzen G., Brekke O.H., Mousavi S.A., Andersen J.T., Michaelsen T.E., Berg T., Sandlie I., Lauvrak V. : Characterization of an Fc (gamma) RI-binding peptide selected by phage display. *Protein Eng Des Sel.* 19(3) (2006), 121-128.

12. Blomqvist B.I., Hammarqvist F., von der Decken A., Wernerermann J.: Glutamine and alpha-Ketoglutarat prevent the decrease in muscle free glutamine concentration and influence protein synthesis after total hip replacement. *Metabolism* 44 (1995), 1215-1222.
13. Boelens P.G., Nijveldt R.J., Alexander P, Houdijk J, Meijer S., van Leeuwen P.A.M.: Glutamine Alimentation in Catabolic State. *American Society for Nutritional Sciences* (2001), 2569-2577.
14. Boelens P.G., Houdijk A.P., Fonk J.C., Nijveldt R.J., Ferwerda C.C., von Blomberg-van der Flier B.M., Thijs L.G., Haarman H.J., Puyana J.C., van Leeuwen P.A.: Glutamine-enriched enteral nutrition increases HLA-DR expression on monocytes of trauma patients. *J Nutr* 132(9) (2002), 2580-2586.
15. Boelens P.G., Houdijk A.P., Fonk J.C., Puyana J.C., Haarman H.J., von Blomberg-van der Flier M.E., van Leeuwen P.A.: Glutamine-enriched enteral nutrition increases in vitro interferon gamma production but does not influence the in vivo specific antibody response to KLH after severe trauma. A prospective, double blind, randomized clinical study. *Clin Nutr* 23(3) (2004), 391-400.
16. Buhaescu I., Segall L., Goldsmith D., Covic A.: New immunosuppressive therapies in renal transplantation: Monoclonal antibodies. *J Nephrol* 18 (2005), 529-536.
17. Cahill G.F. Jr.: Starvation in man. *Clin Endocrinol Metab.* 5(2) (1976), 397-415.
18. Calder P.C.: Glutamine and the immune system. *Clin Nutr* 13 (1994), 2-8.
19. Chang W.K., Yang K.D., Shaio M.F.: Effect of glutamine on Th1 and Th2 cytokine response of human peripheral blood mononuclear cells. *Clin Immunol* 93(3) (1999), 294-301.
20. Cooper A.J.L., Meister A.: Isolation and properties of highly purified glutamine transaminase. *Biochemistry* 11 (1972), 661-671.
21. Costa M., Pensa B., Fontana M., Foppoli C., Cavallini D.: Transamination of L-cystathione and related compounds by a bovine liver enzyme: possible identification with glutamine transaminase. *Biochem Biophys Acta* 881(1986), 314-320.
22. Crawford J., Cohen H.: The essential role of L-glutamine in lymphocyte differentiation in vitro. *J Cell Physiol* 124 (1985): 275-282.
23. Crozier T.A., Müller J.E., Quittkat D., Sydow M., Wuttke W., Kettler D.: Effect of anaesthesia on the cytokine response to abdominal surgery. *Br J Anaesth* 72 (1994): 280-285.

24. Cummings J.C., Sessler C.N., Beali L.D., Fisher B.J., Best A.M., Fowler III A.A.: Soluble e-selektin levels in sepsis and critical illness. *Am J Respir Crit Care Med* 156 (2) (1997), 431-437.
25. Dilworth J.P., White R.J., Brown E.M.: Microbial flora of the trachea during intubation of patients undergoing upper abdominal surgery. *Thorax* 47(10) (1992), 818-820.
26. Dofferhoff A.S.M., Nijland J.H., de Vries-Hospers H.G., Mulder P.O.M., Weits J., Bom V.J.J.: Effects of different types and combination of antimicrobial agents on endotoxine release from gram negative bacteria. An in vitro an in vivo study. *Scand J Infect Dis* 23 (1991), 745-754.
27. Douglas R.D., Shaw J.H.F.: Metabolic response to sepsis and trauma. *Br J Surg* 76 (1989), 115-122.
28. Eagle H.: Amino acid metabolism in mammalian cell cultures. *Science* 130 (1959), 432-437.
29. Enk A.H., Saloga J., Becker D., Zadeh M., Knop J.: Induction of hapten-specific tolerance by interleukin 10 in vivo. *J Exp Med* 179 (1994), 1397-1402.
30. Ertel W., Morrison M.H., Meldrum D.R., Ayala A., Chaudry I.H.: Ibuprofen restores immunity and decrease susceptibility to sepsis following hemorrhage. *J Surg Res* 53 (1992), 55-61.
31. Felig P., Owen O.E., Wahren J., Cahill G.F.Jr.: Amino acid metabolism during prolonged starvation. *J Clin Invest* 48(3) (1969), 584-594.
32. Fukatsu K., Lundberg A.H., Kudsk K.A., Hanna M.K., Johnson C.D., Wu Y., Wilcox H.G., Zarzaur B.L.: Modulation of organ ICAM-1 expression during IV-TPN with glutamine and bombesin. *Shock* 15 (1) (2001), 24-28.
33. Furebring M., Hakansson L., Venge P., Sjolín J.: Differential expression of the C5a receptor and complement receptors 1 and 3 after LPS stimulation of neutrophils and monocytes. *Scand J Immunol.* 60(5) (2005), 494-499.
34. Furukawa S., Saito H., Fukatsu K., Hashiguchi Y., Inaba T., Lin M.T., Inoue T., Han I., Matsuda T., Muto T.: Glutamine-enhanced bacterial killing by neutrophils from postoperative patients. *Nutrition* 13 (1997), 863-869.
35. Furukawa S., Saito H., Inoue T., Matsuda T., Fukatsu K., Han I., Ikeda S., Hidemura A.: Supplemental glutamine augments phagocytosis and reactive oxygen intermediate production by neutrophils and monocytes from postoperative patients in vitro. *Nutrition* 16(5) (2000), 323-329.

36. Fürst P., Stehle P.: Glutaminsupplementierte Ernährung in der klinischen Praxis-Anwendung von glutaminhaltigen Dipeptiden. *Infusionsther Transfusionsmed* 22 (1995), 317-324.
37. Fürst P, Mertes N.: L-Alanyl-L-Glutamin supplementierte parenterale Ernährung verkürzt die Liegedauer nach ausgedehnten abdominal-chirurgischen Eingriffen: Eine Europäische Multicenterstudie. *Chir. Kongress München 1999*.
38. Gallova L., Kubala I., Ciz M., Lojak A.: IL-10 does not affect oxidative burst and expression of selected surface antigen on human blood phagocytes in vitro. *Physiol Res* 53(2) (2004), 199-208.
39. Garcia C., Curi T.C., Firmano M., De Melo M.P., Newsholme P., Curi R.: Effect of adrenalin on glucose and glutamine metabolism and superoxide production by rat neutrophils. *Clin Sci* 96 (1998), 549-555.
40. Geng J.G., Chen M., Chou K.C.: P-selectin cell adhesion molecule in inflammation, thrombosis, cancer growth and metastasis. *Curr Med Chem.* 11(16) (2004), 2153-2160.
41. Giner M., Laviano A., Meguid M.M., Gleason J.-R.: In 1995 a correlation between malnutrition and poor outcome in critically ill patients still exists. *Nutrition* 12(1) (1995), 23-29.
42. Givan A.L.: *Flow Cytometry: First Principles*. 2<sup>nd</sup> ed., John Wiley & Sons, New York (2001), ISBN 0-471-38224-8.
43. Ginz H.F., Gottschall V., Schwarzkopf G., Walter K.: Exzessive Gewebespeicherung von Kolloiden im retikuloendothelialen System. *Anaesthesist* 47 (1998), 330-334.
44. Griffith R.D.: Muscle mass, survival, and the elderly ICU patient. *Nutr* 12 (1996), 456-458.
45. Hammarqvist F., Wernerman J., von der Decken A., Vinnars E.: Alanyl-glutamine counteracts the depletion of free glutamine and the postoperative decline in protein synthesis in skeletal muscle. *Ann Surg* 212(5) (1990), 637-644.
46. Hankhard R.G., Darmaun D., Sager B.K., D'Amore D., Parsons W.R., Haymond M.: Response of glutamine metabolism to exogenous glutamine in humans. *Am J Physiol* 269 (1995), E663-670.
47. Häussinger D., Roth E., Lang F., Gerok W.: Cellular hydration state: an important determinant of protein catabolism in health and disease. *Lancet* 341 (1993), 1330-1332.
48. Häussinger D., Lang F., Gerok W.: Regulation of cell function by the cellular hydration state. *Am J Physiol* 267 (1994): E343-E355.

49. Heinrich P.C., Castell J.V., Andus T.: Interleukin-6 and the acute phase response. *Biochem J* 265 (1990), 621-636.
50. Houdijk A.P., Rijnsburger E.R., Jansen J., Wesdorp R.I.C., Weiss J.C., McCamish M.A., Teerlink T., Meuwissen S.G., Haarman H.J., Thijs L.G., van Leeuwen P.A.: Randomised trial of glutamine-enriched enteral nutrition on infectious morbidity in patients with multiple trauma. *Lancet* 352 (1998), 772-776.
51. Hörig A., Spagnoli G.C., Filgueira L., Babst R., Gallati H., Harder F., Juretic A., Heberer M.: Exogenous glutamine requirement is confined to late events of T-cell activation. *J Cell Biochem* 53 (1993), 343-351.
52. Hsu C., Chou S.Y., Liang S.J., Chang C.Y., Yeh C.L., Yeh S.L.: Effect of glutamine on cell adhesion molecule expression and leukocyte transmigration in endothelial cells stimulated by preeclamptic plasma. *Nutrition* 21(11-12) (2005), 1134-1140.
53. Hsu C.S., Chou S.Y., Liang S.J., Chang C.Y., Yeh S.L.: Effect of physiologic levels of glutamine on ICAM-1 expression in endothelial cells by preeclamptic plasma. *J Reprod Med* 51(3) (2006), 193-198.
54. Ikeda S., Kudsk K.A., Le T., Zarzaur B.L., Johnson C.D.: Glutamine improves impaired cellular exudation and polymorphonuclear neutrophil phagocytosis induced by total parenteral nutrition after glycogen-induced murine peritonitis. *Shock* 19(1) (2003), 50-54.
55. Jacobi C.A., Ordemann J., Zuckermann H., Docke W., Volk H.D., Müller J.M.: The influence of alanyl-glutamine on immunologic functions and morbidity in postoperative total parenteral nutrition. Preliminary results of a randomized trial. *Zentralbl Chir* 124(3) (1999), 199-205.
56. Jacobs J.W., Lund P.K., Bell H.H., Habener J.F.: Procalcitonin is a glyco-protein. *J Biol Chem* 256 (1981), 2803-2807.
57. Jiang et al.: The impact of glutamine dipeptide on nitrogen balance, intestinal permeability and clinical outcome of postoperative patients. Vortrag, ASPEN-Kongreß San Diego, 1999. Entnommen aus Suchner U.: *Glutamin in der klinischen Ernährung*. U. Suchner. 1. Aufl.; Verlag Hygieneplan, Oberursel/Ts., 2000. ISBN 3-922298-11-7.
58. Juretic A., Spagnoli G.C., Hörig H., Babst R., von Bremen K., Harder F., Heberer M.: Glutamine requirement in the generation of lymphokine-activated killer cells. *Clin Nutr* 13(1) (1994), 42-49.
59. Kafkewitz D., Bendich A.: Enzyme-induced asparagine and glutamine depletion and immune system function. *Am J Clin Nutr* 37 (1983), 1025-1030.

60. Kehlet H.: Multimodal approach to control postoperative pathophysiology and rehabilitation. *Br J Anaesth.* 78(5) (1997): 606- 17.
61. Kenyon C.J., Young J., Gray C.E., Fraser R.: Inhibition by etomidate of steroidogenesis in isolated bovine adrenal cells. *J Clin Endocrinol Metab* 58 (1984), 947-949.
62. Kerner T., Ahlers O., Spielmann S., Keh D., Buhner C., Gerlach M., Hofler S., Gerlach H.: L-selectin in trauma patients: a marker for organ dysfunction and outcome. *Eur J Clin Invest* 29(12) (1999), 1077-86.
63. Kinney J.M., Duke J.H.Jr., Long C.L., Gump F.E.: Tissue fuel and weight loss after injury. *J Clin Path Suppl* 4 (1970), 65-72.
64. Kleinschmidt S., Wanner G.A., Bußmann D., Kremer J.P., Ziegenfuß T., Menger M.D., Bauer M.: Proinflammatory cytokine gene expression in whole blood from patients undergoing coronary artery bypass surgery and its modulation by pentoxifylline. *Shock* 9 (1998), 12-20.
65. Kobayashi S.D., Voyich J.M., Burlack C., DeLeo F.R.: Neutrophils in the innate immune response. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz.)* 53(6) (2005), 505-507.
66. Koj A., Initiation of acute phase response and synthesis of cytokines. *Biochem Biophys Acta* 1317 (1996), 84-94.
67. Kollef M.H., Schuster D.P.: The acute respiratory distress syndrome. *New Engl J Med* 332 (1995), 27-37.
68. Kox W.J., Volk T., Kox S.N., Volk H.D.: Immunomodulatory therapies in sepsis. *Intensive Care Med.* 26 (Suppl 1) (2000), 124-128.
69. Krumholz W., Endrass J., Hempelmann G.: Propofol inhibits phagocytosis of *Staphylococcus aureus* and *Escheria coli* by polymorphonuclear leukocytes in vitro. *Can J Anesth* 41 (1994), 446-449.
70. Lahat N., Zlotnick A.Y., Shtiller R., Bar I., Merin G.: Serum levels of IL-1, IL-6 and TNF alpha in patients undergoing coronary artery bypass grafts or cholecystectomy. *Clin Exp Immunol* 89 (1992), 255-260.
71. Lang C.H.: Sepsis-induced insulin resistance in rats is mediated by a beta-adrenergic mechanism. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 263 (1992), E703-E711.
72. Lehninger A.L.: Prinzipien der Biochemie/ Albert L. Lehninger. Ins Dt. übertr. von Gislinde Peters und Diether Neubert. Berlin; New York: de Gruyter, 1987. Einheitssacht.: Principles of biochemistry <dt.> ISBN 3-11-008988-2.
73. Lingen M.W.: Angiogenesis in Inflammation and Wound Healing. *Arch Pathol Lab Med* 125 (2001), 67-71.

74. Löffler G.: Physiologische Chemie: Lehrbuch der medizinischen Biochemie und Pathobiochemie für Studierende und Ärzte / Georg Löffler; Petro E. Petrides. Unter Mitarb. Von Ludwig Weiss.-4., überarb. U. erw. Aufl., 1. korrigierter Nachdr.-Berlin; Heidelberg; New York; London; Paris; Tokyo: Springer, 1990. ISBN 3-540-18163-6.
75. MacBurney M., Young L.S., Ziegler T.R., Wilmore D.W.: A cost-evaluation of glutamine-supplemented parenteral nutrition in adult bone marrow transplant patients. *J Am Diet Assoc* 94 (1994), 1263-1266.
76. Malizia G., Calabrese A., Cottone M., Raimondo M., Trejdosiewicz L.K., Smart C.J., Oliva L., Pagliaro L.: Expression of leukocyte adhesion molecules by mucosal mononuclear phagocytosis in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 100(1) (1991), 150-159.
77. Matilla B., Ortiz J., Gonzales P., Garcia-Dietz F., Jorquera F., Culebras J.M., Gonzalez-Gallego J., Tunon M.J.: Effects of parenteral nutrition supplemented with glutamine or glutamine dipeptides on liver antioxidant and detoxication system in rats. *Nutrition* 16 (2000), 125-128.
78. Marnitz R., Gramm H.J., Zimmermann J.: Elaboration of mediators of inflammatory response after major surgery. *Shock* 7 (Abstr) (1997), 124.
79. McGuinness O.P., Fugiwara T., Murrell S., Bracy D., Neal D., O'Connor D., Cherrington A.D.: Impact of chronic stress hormone infusion on hepatic carbohydrate metabolism in the conscious dog. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 265 (1993): E314-E322.
80. McKeehan W.L.: Glycolysis, glutaminolysis and cell proliferation. *Cell Biol Int Rep* 6 (1982), 635-650.
81. Meisse D., Claeysens S., Husson A., Lavoigne A.: Glutamine a regulator of acute phase protein synthese. *Clin Nutr* 18(2) (1999), 111-112.
82. Menzebach A., Hirsch J., Nöst R., Mogk M., Hempelmann G., Welters I.D.: Morphin hemmt die Expression von Komplementrezeptoren sowie Phagozytose und Oxidativen Burst in Monozyten über einen NO-abhängigen Mechanismus. *Anästhesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther.* 39 (2004), 204-211.
83. Mittendorfer B.J., Gore D.C., Herndon D.N., Wolfe R.R.: Accelerated glutamine synthesis in critically ill patients cannot maintain normal intramuscular free glutamine concentration. *JPEN* 23 (1999), 243-252.
84. Moore K.N., Day R.A., Albers M.: Pathogenesis of urinary tract infections: a review. *J Clin Nurs.* 11(5) (2002), 568-74.

85. Mosman T.R., Sad S.: The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol Today* 17 (1996), 142-146.
86. Mukherjee P., Mastro A.M., Hymer W.C.: Prolactin induction of interleukin-2-receptor on rat splenic lymphocytes. *Endocrinology* 35 (1990), 219-225.
87. Nasraway S.A.: The Problems and Challenges of Immunotherapy in Sepsis. *Chest*. 123(45) (2003), 451-459.
88. Neumann F., Ott I., Marx N., Luther T., Kenngott S., Gawaz M., Kotzsch M., Schomig A.: Effect of human recombinant interleukin-6 and interleukin-8 on monocyte procoagulant activity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17 (1997), 3399-3405.
89. Newsholme E.A., Newsholme P., Curi R., Crabtree B., Ardawi M.S.M.: Glutamine metabolism in different tissues-its physiological and pathological importance. In: *Kidney J.M. Borum P.R. (eds) Perspectives in clinical nutrition*. Urban & Schwarzenberg, Baltimore München (1989), 71-98.
90. Newsholme E.A., Calder P.C.: The proposed role of glutamine in some cells of the immune system and the speculative consequences for the whole animal. *Nutrition* 13 (1997), 728-730.
91. Newsholme P.: Why is L-glutamine metabolism important to cells of the immune system in health, postinjury, surgery or infection. *J Nutr* 131 (2001), 2515-2522.
92. Nielsen H.J.: Detrimental effects of perioperative blood transfusion. *Br J Surg* 82 (1995), 582-587.
93. Nurjhna N., Bucci A., Perriello G., Stumvoll M., Dailey G., Bier D.M., Toft I., Jenssen T.G., Gerich J.E.: Glutamine: a major gluconeogenic precursor and vehicle for interorgan carbon transport in man. *J Clin Invest* 95 (1995), 272-277.
94. Novak F., Heyland D. K., Avenell A., Drover J.W., Su X.: Glutamine supplementation in serious illness: A systematic review of the evidence. *Crit Care Med* 30(9) (2002), 2022-2029.
95. Okenga J., Borchert K., Rifai K., Manns M.P., Bischoff S.C.: Effect of glutamine-enriched total parenteral nutrition in patients with acute pancreatitis. *Clin Nutr* 21(5) (2002), 409-416.
96. Oberhoffer M., Vogelsang H., Meier-Hellman A., Jäger L., Reinhart K.: Anti-katacalcin antibody reaction in different types of human leucocytes indicates procalcitonin content. *Shock* 7 (1997), 123.
97. O'Boyle et al.: Clinical association with bacterial translocation. *Clin Nutr* 16 (1997), 48 (ESPEN Abstract Band). Entnommen aus Suchner U.: *Glutamin in der klinischen*

- Ernährung. U. Suchner. 1. Aufl.; Verlag Hygieneplan Oberursel/Ts., 2000. ISBN 3-922298-11-7.
98. O’Riordain M.G., Fearon K.C., Ross J.A., Rogers P., Falconer J.S., Bartolo D.C., Garden O.J., Carter D.C.: Glutamine-supplemented total parenteral nutrition enhances T-lymphocyte response in surgical patients undergoing colorectal resection. *Ann. Surg.* 220 (1994), 212-221.
  99. Owen O.E., Felig P., Morgan A.P., Wahren J., Cahill G.F.Jr.: Liver and kidney metabolism during prolonged starvation. *J Clin Invest* 48(3) (1969), 574-583.
  100. Palmer T.E., Griffith R.D., Jones C.: Effect of L-glutamine on muscle in the very severely ill. *Nutrition* 12 (1996), 316-320.
  101. Paterson R.L., Webster N.R.: Sepsis and the inflammator response syndrome. *J R Coll Surg Edinb.* 45(3) (2000), 178-82.
  102. Peterson P.K., Sharp B., Gekker G., Brummit C., Keane W.F.: Opioid-mediated suppression of interferon gamma production by cultured peripheral blood mononuclear cells. *J Clin Invest* 80 (1987), 824-831.
  103. Rees D.D., Monkhouse J.E., Cambridge D., Moncada S.: The role of nitric oxide in a conscious mouse model of endotoxin shock. *Br J Pharmacol* 114 (1995) 123P
  104. Rennie M.J., Hundal H.S., Babij P. : Characteristics of a glutamin carrier in skeletal muscle have important consequences for nitrogen loss in injury, infection and chronic disease. *Lancet* 2(8514) (1986), 1008-1012.
  105. Roth E.: Glutamin – mehr als eine “nicht-essentielle” Aminosäure. *Wien Klin Wochenschr* 108(21) (1996), Editorial, 667-668.
  106. Roth E., Spittler A., Oehler R.: Glutamin. Wirkungen auf das Immunsystem, auf den Eiweißhaushalt und Darmfunktionen. *Wien Klin Wochenschr* 108(21) (1996), 669-676.
  107. Saito H., Trocki O., Alexander J.W., Kopcha R., Heyd T., Joffe S.-N.: The effect of route of nutrient administration on the nutritional state, catabolic hormone secretion, and gut mucosal integrity after burn injury. *JPEN* 11(1) (1987), 1-7.
  108. Salzmann N.P., Eagle H., Sebring E.D.: The utilization of glutamine, glutamic acid and amonia for the biosynthesis of nucleic acid bases in mammilian cell cultures. *J Biol Chem* 230 (1958), 1001-1012.
  109. Scheltinga M.R., Young L.S., Benfell K., Bye R.L., Ziegler T.R., Santos A.A., Autin J.H., Schloerb P.R., Wilmore D.W.: Glutamine-enriched intravenous feedings attenuate extra-cellular fluid expansion after standard stress. *Ann Surg* 214 (1991), 385-395.

110. Schloerb P.R., Amare M.: Total parenteral nutrition with glutamine in bone marrow transplantation and other clinical applications. *JPEN* 17 (1993), 407-413.
111. Sedman P.C., Macfie J., Sagar P., Mitchell C.J., May J., Macey-Jones B., Johnstone D.: The prevalence of gut translocation in humans. *Gastroenterology* 1994 107 (1994): 643-649.
112. Siedhoff H.P., Morlion B.J., Joosten U., Koller M., König W., Fürst P., Puchstein C.: Unterstützung des Immunsystems durch Glutamin-Dipeptid-supplementierte totale parenterale Ernährung (TPN) nach Dickdarmchirurgie. Abstract Band DAK Nürnberg 19-22. Juni (1996).
113. Sklar L.S., Anisman H. : Stress and coping factors influence tumor growth. *Science* 205 (1979), 513-515.
114. Spittler A., Winkler S., Götzinger P., Oehler R., Willheim M., Tempfer C., Weigel G., Függer R., Boltz-Nitulescu G., Roth E.: Influence of glutamine on the phenotype and function of human monocytes. *Blood* 86 (4) (1995), 1564-1569.
115. Spittler A., Holzer S., Oehler R., Boltz-Nitulescu G., Roth E.: A glutamine deficiency impairs the function of cultured human monocytes. *Clin Nutr* 16 (1997), 97-99.
116. Spittler A., Sautner T., Gornikiewicz A., Manhart N., Oehler R., Bergmann M., Függer R., Roth E.: Postoperative glycyl-glutamine infusion reduces immunosuppression: partial prevention of the surgery induced decrease in HLA-DR expression on monocytes. *Clin Nutr.* 20(1), (2001), 37-42.
117. Stehle P., Zander J., Mertes N., Albers S., Puchstein C., Lawin P., Fürst P.: Effect of parenteral glutamine peptide supplements on muscle glutamine loss and nitrogen balance after major surgery. *Lancet* 4;1 (8632), (1989), 231-233.
118. Stehle P.: Glutamin-ein unentbehrlicher Nährstoff bei metabolischem Stress. *Ernährungs-Umschau* 43 (1996), 318-328.
119. Stolpe A. v.d., Saag P.T. v.d.: Intercellular adhesion molecule 1. *J Mol Med.* 74(1) (1996), 13-33.
120. Suchner U., Kuhn K.S., Fürst P.: The scientific basis of immunonutrition. Aus *Proceedings of Nutrition Society*, Volume 59, Issue 4 (2000).
121. Sutterwala F.S., Rosenthal L.A., Mosser D.M.: Cooperation between CR1(CD35) und CR3(Cd11b/CD18) in the binding of complement-opsonized particles. *J Leukoc Biol.* 59(6) (1996), 883-890.
122. Teran J.C., Mullen K.D., McCullough A.J.: Glutamine - a conditionally essential amino acid in cirrhosis. *Am Clin Nutr* 62 (1995), 897-900.

123. Thijs A., Thijs L.G.: Pathogenesis of renal failure in sepsis. *Kidney Int* 53 (1998), 34-37.
124. Tremel H., Kienle B., Weilmann L.S., Stehle P., Fürst P.: Glutamine dipeptide – supplemented parenteral nutrition maintains intestinal function in critically ill. *Gastroenterology* 107 (1994), 1595-1601.
125. Velasco S., Tarlow M., Olsen K., Shay J.W., McCracken G.H.Jr., Nisen P.D.: Temperature dependent modulation of lipopolysaccharide induced interleukin-1beta and tumor necrosis factor alpha expression in cultured human astrological cells by dexamethasone and indomethacin. *J Clin Invest* 87 (1991), 1674-1680.
126. Van Epps D.E., Saland L.: Beta endorphine and met enkephaline stimulate human peripheral blood mononuclear cell chemotaxis. *J Immunol* 132 (1984), 3046-3053.
127. Versleijen M., Roelofs H., Preijers F., Roos D., Wanten G.: Parenteral lipids modulate leukocyte phenotypes in whole blood, depending on their fatty acid composition. *Clin Nutr* 24(5) (2005), 822-829.
128. Vinnars E., Wilmore D.: Jonathan Roads Symposium Papers. History of parenteral nutrition. *JPEN* 27(3) (2003): 225-31.
129. Volk H.D., Reinke P., Krausch D, Zuckermann H., Asadullah K., Müller J.M., Döcke W.D., Kox W.J.: Monocyte deactivation - a rational for a new therapeutic strategy in sepsis. *Intensive Care Med* 22 (1996), 474-481.
130. Wallace C., Keast D.: Glutamine and macrophage function. *Metabolism* 41 (1992), 1016-1020.
131. Wang J., Springer T.A.: Structural specializations of immunoglobulin superfamily members for adhesion to integrins and viruses. *Immunol Rev.* 163 (1998), 197-215.
132. Wang Z.T., Yao Y.M., Xiao G.X., Sheng Z.Y.: Risk factors of development of gut-derived bacterial translocation in thermally injured rats. *World J Gastroenterol.* 10(11) (2004): 1619-24.
133. Wang X.Y., Li W.Q., Li N., Li J.S.: Effect of glutamine on immunity and other function in critically ill patients. *Zhongguo Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue* 18(3) (2006): 143-145 (Abstract).
134. Wanner G.A., Ertel W., Müller P., Hofer Y., Leiderer R., Menger M.D., Messmer K.: Liver ischemia and reperfusion induces a systemic inflammatory response through Kupffer cell activation. *Shock* 5 (1996), 34-40.
135. Ward N.: Nutrition support to patients undergoing gastrointestinal surgery. *Nutrition Journal* 2(18) (2003), 1-5.

136. Wilmore D.W., Shabert J.K.: The role of glutamine in immunologic responses. *Nutrition* 14 (1998), 618-626.
137. Wilmore D.W.: The effect of glutamine supplementation in patients following elective surgery and accidental injury. *J Nutr* 131 (2001), 2543-2549.
138. Wischmeyer P.E., Lynch J., Liedel J., Wolfson R., Riem J., Gottlieb L., Kahana M.: Glutamine administration reduces gram negative bacteremia in severely burned patients: a prospective, randomized, double-blind trial versus isonitrogenous control. *Crit Care Med* 29(11) (2001), 2075-280.
139. Yaqoob P., Calder P.C.: Cytokine production by human peripheral blood mononuclear cells: differential sensitivity to glutamine availability. *Cytokine* 10(10) (1998), 790-794.
140. Yeh C.L., Hsu C.S., Yeh S.L., Chen W.L.: Dietary glutamine supplementation modulates Th1/Th2 cytokine and interleukin-6 expression in septic mice. *Cytokine* 31(5) (2005), 329-334.
141. Young V.R., Ajami A.M.: Glutamate: an amino acid of particular distinction. *J Nutr* 130 (2000), 892S-900S.
142. Zhang W., Frankel W.L., Bain A., Choi D., Klurfeld D.M., Rombeau J.L.: Glutamine reduces bacterial translocation after small bowel transplantation in cyclosporine-treated rats. *J Surg Res* 58(2) (1995), 159-164.
143. Zhao X., Dib M., Andersson E., Shi C., Widegren B., Wang X., Andersson R.: Alterations of adhesion molecule expression and inflammatory mediators in acute lung injury induced by septic and non-septic challenges. *Lung* 183(2) (2005), 87-100.
144. Ziegler T.R., Young L.S., Benfell K., Scheltinga M., Hortos K., Bye R.L., Morrow F.D., Jacobs D.D., Smith R.J., Autin J.H., Wilmore D.W.: Clinical and metabolic efficacy of glutamine-supplemented parenteral nutrition after bone marrow transplantation. *Ann Int Med* 116 (10) (1992), 821-828.
145. Ziegler T.R., Gatzert C., Wilmore D.W.: Strategies for attenuating protein-catabolic responses in the critically ill. *Annual Review of Medicine* 45 (1994), 459-480.
146. Ziegler T.R., Bye R.L., Persinger R.L., Young L.S., Autin J.H., Wilmore D.W.: Effects of glutamine supplementation on circulating lymphocytes after bone marrow transplantation: a pilot study. *Am J Med Sci* 315 (1998), 4-10.

## 7. Appendix

### 7.1. Verzeichnis häufig benutzter Abkürzungen

<b>ARDS</b>	<b>A</b> cute <b>R</b> espiratory <b>D</b> istress <b>S</b> yndrome
<b>ATP</b>	<b>A</b> denosin <b>t</b> riphosphat
<b>CD</b>	<b>C</b> luster of <b>D</b> ifferentiation
<b>CRP</b>	<b>C</b> apsel-reaktives <b>P</b> rotein
<b>CSA</b>	<b>C</b> yclosporin <b>A</b>
<b>DNA</b>	<b>D</b> eoxyribonucleic acid
<b>ELISA</b>	<b>E</b> nzyme- <b>L</b> inked <b>I</b> mmuno <b>S</b> orbent <b>A</b> ssay
<b>FITC</b>	<b>F</b> luorescein isothiocyana <b>t</b> e
<b>GLN</b>	<b>G</b> lutamin
<b>HAES</b>	<b>H</b> ydroxyethylstär <b>k</b> e
<b>HLA</b>	<b>H</b> uman <b>L</b> eukocyte <b>A</b> ntigen
<b>ICAM</b>	<b>(I</b> ntra-) <b>C</b> ell <b>A</b> dhesion <b>M</b> olecules
<b>IL</b>	<b>I</b> nterleukin
<b>ILMA</b>	<b>I</b> mmunoluminometrischer <b>A</b> ssay
<b>INF</b>	<b>I</b> nterferon
<b>LPS</b>	<b>L</b> ipopolysaccharid
<b>MHC</b>	<b>M</b> ajor <b>H</b> istocompatibility <b>C</b> omplex
<b>MWU</b>	<b>M</b> ann- <b>W</b> ithney- <b>U</b> - <b>T</b> est
<b>NAD/NADH</b>	<b>N</b> icotinsäureamid- <b>A</b> denin- <b>D</b> inucleotid
<b>NADP/NADPH</b>	<b>N</b> icotinsäureamid- <b>A</b> denin- <b>D</b> inucleotid- <b>P</b> hosphat
<b>PaCO<sub>2</sub></b>	<b>K</b> ohlendioxid- <b>P</b> artialdruck
<b>PCT</b>	<b>P</b> rocalcitonin
<b>PE</b>	<b>R</b> - <b>P</b> hycoerythrin
<b>PMN</b>	<b>p</b> olymorphkernige neutrophile <b>G</b> ranulozyten
<b>RNA/mRNA</b>	<b>R</b> ibonucleic acid/ <b>m</b> essenger <b>R</b> ibonucleic acid
<b>RIA</b>	<b>R</b> adioimmunoassay
<b>SIRS</b>	<b>S</b> ystemic <b>I</b> nflammatory <b>R</b> esponse <b>S</b> ndrome
<b>Th</b>	<b>H</b> elfer- <b>T</b> - <b>Z</b> ellen
<b>TNF</b>	<b>T</b> umor <b>N</b> ecrosis <b>F</b> actor
<b>TPN</b>	<b>T</b> otal <b>P</b> arenteral <b>N</b> utrition

## **7.2. Lebenslauf**

"Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht."

### **7.3. Danksagung**

Herrn Prof. Dr. H. Gerlach möchte ich herzlich für die Überlassung des Themas und die Betreuung bei der Durchführung der Arbeit danken. Gleiches gilt für Frau Dr. O. K. Harndt, die bei der Organisation der Arbeit stets als Ansprechpartner zur Verfügung stand.

Weiter möchte ich mich bei Dr. O. Ahlers und Dr. T. Böhnke bedanken, die bei der Durchführung der Durchflusszytometrie mit hilfreichen Anregungen und Ratschlägen nicht geizten sowie den Ärzten und dem Pflegepersonal der Station für operative Intensivmedizin und den allgemeinchirurgischen Stationen.

M. Pettersson war nicht nur als „gute Seele“ des Forschungslabors der Abteilung, sondern auch bei den ELISA-Untersuchungen in jeder Hinsicht ein Gewinn.

Allen, an der Arbeit Beteiligten, vielen Dank.

#### **7.4. Erklärung über Selbständigkeit**

##### Erklärung

„Ich, Carsten, Kietzmann, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Prospektiv-randomisierte Doppelblindstudie zur Wirkung einer glutaminhaltigen parenteralen Ernährung auf Monozyten, Granulozyten und Infektionen nach distaler Ösophagusresektion“, selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Reinberg, 01.08.2007

Unterschrift