

**Perioperative L-Alanyl-L-Glutamin-Nutrition  
in der Herzchirurgie  
und deren Bedeutung auf die Generierung  
pro- und antiinflammatorischer  
intrazellulärer Zytokine**

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
des Fachbereichs Medizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Simone Pitz  
aus Lahn-Gießen

Gießen 2008

Aus der Klinik für  
Anaesthesiologie, Intensivmedizin, Schmerztherapie  
des Fachbereichs Medizin  
der Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH  
Standort Gießen  
Direktor:  
Prof. Dr. med. Dr. h. c. G. Hempelmann

Betreuer: PD Dr. J. M. Engel

Gutachter: PD Dr. J. M. Engel

Gutachter: PD Dr. K. Mayer

Tag der Disputation: 12.01.2009

**Für meine Familie**

**Tempora mutantur nos  
et mutamur in illis**  
Lothar I

<b>1. <u>Inhaltsverzeichnis</u></b>	<b>5</b>
<b>2. <u>Einleitung</u></b>	<b>8</b>
<b>2.1 Einführung</b>	<b>8</b>
<b>2.2 Glutamin <i>in vivo</i> und <i>in vitro</i></b>	<b>10</b>
2.2.1 Glutamin im Überblick	10
2.2.2 Die Bedeutung von Glutamin im Immunsystem	12
2.2.3 Parenterale Glutaminnutrition im katabolen Stress	13
<b>2.3 Kardiochirurgie</b>	<b>15</b>
2.3.1 Die Anfänge der Herz-Lungen-Maschine	15
2.3.2 Folgen des kardiochirurgischen Eingriffs auf den Organismus	16
2.3.3 Modifikation des postoperativen kardiochirurgischen Verlaufs	19
<b>2.4 Zytokine</b>	<b>20</b>
<b>2.5 Fragestellung</b>	<b>23</b>
<b>3. <u>Patienten und Methoden</u></b>	<b>24</b>
<b>3.1 Patientenauswahl</b>	<b>24</b>
<b>3.2 Studienentwurf</b>	<b>25</b>
<b>3.3 Methode der Vollblutaufbereitung</b>	<b>28</b>
3.3.1 Überblick der Arbeitsschritte zur Probengewinnung	28
3.3.2 Aufbereitung der Blutproben	29
<b>3.4 Fluoreszenzdurchflusszytometer (FACS)</b>	<b>31</b>
3.4.1 Prinzip des Fluoreszenzdurchflusszytometers	31
3.4.2 Auswertung und Messung der Proben	35
<b>3.5 Fluoreszenz-Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie (F-HPLC)</b>	<b>39</b>
3.5.1 Prinzip der Fluoreszenz-Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie	39
3.5.2 Automatisierte Vorsäulenderivatisierung	41
3.5.3 Gradientenelution	42
3.5.4 Qualitätskontrolle der plasmatischen Glutaminmessung	42
<b>3.6 Routinelaborparameter</b>	<b>43</b>
<b>3.7 Statistische Berechnungen</b>	<b>43</b>

<b>4. Ergebnisse</b>	<b>45</b>
<hr/>	
<b>4.1 Patientenkollektiv-, Neben- und Begleitkriterien</b>	<b>45</b>
4.1.1 Patientenkollektiv- und Operationscharakteristika	45
4.1.2 Klinische Parameter	49
<b>4.2 Zytokine, Glutamin-Plasma-Spiegel und Klinik</b>	<b>51</b>
4.2.1 Ausgangswerte der intrazellulären Zytokindetektion	51
4.2.2 Intrazelluläre Zytokindetektion	52
4.2.3 Glutamin-Plasma-Spiegel	54
4.2.4 Klinisches Outcome	54
<b>5. Diskussion</b>	<b>56</b>
<hr/>	
<b>5.1 Methoden</b>	<b>56</b>
<b>5.2 Zytokindetektion</b>	<b>59</b>
5.2.1 Die proinflammatorische Antwort	60
5.2.2 Die antiinflammatorische Antwort	63
<b>5.3 Glutamin-Plasma-Spiegel</b>	<b>64</b>
5.3.1 Die parenterale Glutaminsubstitution und die Veränderung des Glutamin-Plasma-Spiegels	64
5.3.2 Der Einfluss des Glutamin-Plasma-Spiegels auf die T-Zell induzierte inflammatorische Antwort	67
<b>5.4 Auswirkungen der Glutaminnutrition auf das klinische     Outcome bei kardiochirurgischen Patienten</b>	<b>68</b>
<b>5.5 Konklusion</b>	<b>69</b>
<b>6. Zusammenfassung</b>	<b>70</b>
<hr/>	
Zusammenfassung	70
Abstract	71
<b>7. Literaturverzeichnis</b>	<b>73</b>
<hr/>	

<b>8. <u>Anhang</u></b>	<b>90</b>
<b>8.1 Ergebnistabellen</b>	<b>90</b>
8.1.1 Ausgangswerte der intrazellulären Zytokindetektion	90
8.1.2 Intrazelluläre Zytokindetektion	91
8.1.3 Glutamin-Plasma-Spiegel	92
8.1.4 Darstellung des klinischen Outcome	93
8.1.5 Elutionsbedingungen des binären Gradientenelutionssystems	93
<b>8.2 Protokoll: Aufbereitung der Blutproben</b>	<b>94</b>
<b>8.3 Protokoll: Vorbereitung der Reagenzien</b>	<b>96</b>
<b>8.4 Materialien</b>	<b>98</b>
8.4.1 Fluoreszenzdurchflusszytometer	98
8.4.2 Fluoreszenz-Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie	100
<b>8.5 Abbildungsverzeichnis</b>	<b>102</b>
<b>8.6 Tabellenverzeichnis</b>	<b>103</b>
<b>8.7 Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>104</b>
<b>9. <u>Curriculum vitae</u></b>	<b>107</b>
<b>10. <u>Danksagung</u></b>	<b>109</b>
<b>11. <u>Erklärung</u></b>	<b>110</b>

## 2. Einleitung

### 2.1 Einführung

Von Alters her war bekannt, dass ein quantitativer oder qualitativer Nahrungsmangel zu weitreichenden Schädigungen im Körper bis hin zu einer erhöhten Mortalität führt. Durch eine zusätzliche Nährstoffzufuhr versuchte man der Mangelernährung bei Menschen, die nicht essen konnten oder wollten, entgegenzuwirken. Schon um 3400 vor Christus verwendete man Nährklistiere, welche aus Schafsmilch, Honig, Schmalz und Wein zusammengesetzt waren. Über den Enddarm eingeführt, verblieb diese Mischung dort über mehrere Stunden. Bis zum Anfang des 20. Jahrhunderts war diese Methode üblich, obwohl schon zu diesem Zeitpunkt bekannt war, dass diese rektale Prozedur keine wirkliche Effizienz aufzeigte [30].

In verschiedenen Schriften wird ab dem 12. Jahrhundert über die Anwendung von oroöophagealen Kanülen berichtet. Um 1600 wurden die ersten nasalen Silbersonden eingesetzt, denen anschließend die Verwendung von flexiblen Schlund- und Magensonden folgte, um eine künstliche Ernährung zu ermöglichen. Frühzeitig strebten die medizinischen Wissenschaftler nach einer Lösung, Nährstoffe direkt in das Blut einzubringen. Grundlage für diese Idee war die Entdeckung des Blutkreislaufes im Jahr 1628 von Harvey, der die Vermutung aufstellte, dass die Nahrung durch den Blutstrom im Organismus verteilt wird. Daraufhin folgten die ersten mäßig erfolgreichen Versuche mit Bluttransfusionen. Dazu gehörten unter anderem die Experimente von W. Courtens, der 1678 diverse Substanzen wie Olivenöl, Zuckerlösungen und Opium mit unterschiedlichen Erfolgen intravenös infundierte. Aufgrund des mangelnden und fehlenden Wissens über die notwendigen Zusammensetzungen intravenös zugefügter Nährstofflösungen sowie der schlechten hygienischen Bedingungen, blieben die Versuche zur parenteralen Ernährung lange Zeit erfolglos. Daher war die orale Sondenernährung über eine lange Zeitspanne die einzige Möglichkeit für eine erfolgreiche Nutrition [30, 54].

Neben den analytischen und wissenschaftstheoretischen Betrachtungen, beschäftigte sich auch der Giessener Professor für Chemie und Pharmazie, Justus Liebig, intensiv mit den praktischen Fragen zur Verbesserung der Ernährungsgrundlage, der Nahrungsqualität und deren Hygiene. Dem Werk „*Arbeit über Proteine*“ 1843 folgte im Jahr 1847 die Veröffentlichung über „*Extractum Carnis*“ („*Fleischinfusum*“ oder als „*Liebig's Fleischextrakt*“ bekannt), welches zur medizinischen und allgemeinen oralen Verabreichung entwickelt worden war [62]. Ende des 19. Jahrhunderts gab es immer mehr

Versuche in der parenteralen Ernährung, welche subkutan mit unterschiedlichen Lebensmitteln praktiziert wurden und oft mit Schmerzen und Abzessbildung einhergingen. Erst ab dem Jahr 1962 stand eine sichere totale parenterale Ernährung (TPN) mit verträglichen Fettlösungen zur Verfügung, die 1968 zusammen mit der Einführung des Zentralvenenkatheters erfolgreich eingesetzt werden konnte. Später folgte die Entwicklung von verträglichen Aminosäure-, Pepton- und Glukoselösungen, um einer Mangelernährung durch einen erhöhten oder gestörten Nährstoffbedarf und dessen Folgen entgegenzuwirken [30, 54]. Heutzutage sind die Ursachen für eine Mangelernährung in der westlichen Welt meist sekundärer Natur, ausgelöst durch Malabsorption, Hypermetabolismus und Anorexie oder durch konsumierende Erkrankungen, wie Malignome und Stoffwechselstörungen. Auch minderwertige Nahrungsmittel, die durch eine unzureichende Nährstoffzusammensetzung oder Kontaminierung definiert sind, verschlechtern die Widerstandsfähigkeit des Körpers.

Diese vielfältigen Ursachen für Mangelernährung beeinflussen über metabolische, neurologische oder endokrine Parameter das Immunsystem [123]. Welche Folgen der Ernährungsstatus auf den Menschen hat, dokumentierte 1936 Studly et al. [127]. Sie erkannten, dass sich eine Mangelernährung bei chirurgischen Patienten auf das Infektionsrisiko und der Letalität auswirkt. Etwa 23 Jahre später beschrieben Scrimshaw et al. [115] die Wechselwirkung zwischen Immunsystem und Ernährungszustand. Eine ausgewogene Zusammensetzung der klinischen oder normalen Ernährung, durch welche die Protein-, RNA- und DNA-Synthese beeinflusst wird, begünstigt die Proliferation und Funktion der immunbeteiligten Zellen. Der Protein- und Energiemangel vermindert unter anderem die T-Lymphozytenzahl, besonders die Anzahl der T-Helferzellen ist bis zu 40 % reduziert. Eine Folge davon ist eine herabgesetzte Interleukinproduktion [51, 52, 142, 146]. Die über die letzten 15 Jahre betriebenen intensiven Forschungen von Ernährungswissenschaftler und klinischen Forschern zeigten, dass nicht nur die Quantität, sondern auch die Zusammenstellung der Ernährungsmischung ausschlaggebend ist [141, 142]. Alexander et al. [1] bewiesen 1995, dass Substanzen wie Arginin, Fettsäuren und Glutamin einen Einfluss auf das Immunsystem haben. Besonders trat Glutamin durch seine hohe Konzentration im Körper sowie der Wirkung im Immunsystem hervor [7]. Dass die Ernährung und das Immunsystem im gegenseitigen Einfluss stehen, zeigen verschiedene Immundefekterkrankungen, die zu einer Kachexie führen können. Dagegen hat das Postaggressionsyndrom, ein Zustand nach Traumen, Sepsis oder Operationen, Folgen auf die Immunantwort. Der erhöhte Stickstoffverlust, die verschlech-

terte Glukoseverwertung und die verstärkte Lipolyse können eine parenterale Ernährung erforderlich machen, um den Patienten vor einer Mangelernährung zu bewahren [120]. Ebenfalls konnte bewiesen werden, dass auch sportliche Menschen von einer zusätzlichen Nahrungsergänzung profitieren. Athleten, die unter erhöhten körperlichen Anforderungen stehen, erhielten zusätzlich Zink, Glutamin und Vitamine. Diese Supplementierung konnte das Infektionsrisiko bei diesen Probanden deutlich senken [98].

## **2.2 Glutamin *in vivo* und *in vitro***

### **2.2.1 Glutamin im Überblick**

Die Aminosäure mit der größten Konzentration im menschlichen Körper ist Glutamin. Mit der höchsten Umsatzrate aller 23 Aminosäuren, liegt dieses in einer Konzentration von 600  $\mu\text{mol/l}$  im Blutplasma vor. Der Hauptanteil des freien Aminosäurenpools liegt im Skelettmuskel mit 20  $\text{mmol/l}$  vor. Auch in anderen Geweben wie Leber, Gastrointestinaltrakt und Leukozyten ist eine recht hohe Konzentration nachzuweisen [51, 52]. Glutamin (Summenformel  $\text{C}_5\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_3$ , Molmasse 146,15  $\text{g/mol}$ ) ist eine nichtessentielle Aminosäure und stellt ein Amid der Glutaminsäure dar. Es stellt nicht nur ein bedeutender Baustein der Proteinsynthese dar, sondern ist auch in verschiedenen synthetisierenden und metabolischen Stoffwechselwegen involviert [60].

In den Nieren, der Mukosa des Gastrointestinaltraktes und dem Immunsystem sind die Zellen mit dem höchsten Glutaminverbrauch vorzufinden. Dort stellt es einen wichtigen Energielieferanten dieser schnell proliferierenden Zellen dar. Unter physiologischen Bedingungen sind alle Gewebe in der Lage, eine ausreichende Menge an Glutamin zu synthetisieren und zu verwerten. Die Glutaminolyse, initialer Schritt zum Abbau, und die Glutaminsynthesereaktion finden in unterschiedlichen Kompartimenten, dem Golgiapparat und Zytosol, statt [2, 121]. Bekannt ist auch, dass die Lunge fähig ist, in akuten Situationen Glutamin zu produzieren. Das Gehirn synthetisiert dieses, um es im Bedarfsfall zu dem Neurotransmitter Glutamat umzuwandeln [96, 97, 120]. Größtenteils wird Glutamin nicht vollständig oxidiert, sondern zu Glutamat, Ammoniak, Laktat und Aspartat umgewandelt. Glutamin ist ein N-Donator und dient als Substrat in der Synthese von Purinen, Pyrimidinen, Nukleotiden und Glukosaminen. Zudem ist Glutamin eine Vorstufe des intrazellulären Antioxidans Glutathion, welches über die Aminosäuren Glycin, Cystein und Glutamat synthetisiert wird. Im oxidativen Stress kann es dessen Spiegelkonzentration aufrecht erhalten [2, 51, 82].

Im Gegensatz zu dem neutralen Glutamin ist Glutamat ein geladenes Molekül, das nur unter erschwerten Bedingungen die Zellmembranen durchwandern kann. Deshalb ist Glutamin unter anderem ein wichtiger Lieferant bei der Glutamatsynthese [81, 146]. Weiterhin ist Glutamin als ein Stickstoff- und Ammoniaktransportmolekül zwischen den Organen, Substrat für die Urogenese in der Leber und in der hepatischen sowie renalen Glukoneogenese vorzufinden [2, 96, 97].

In der renalen Ammoniakgenese ist es in der Regulierung des Säuren-Basen-Haushaltes beteiligt [10, 49, 50]. Vom Glutamin wird eine  $\text{NH}_3$ -Gruppe abgespalten, welche mit einem weiteren Proton aus der Niere ausgeschieden wird. Diese Reaktion ist bedeutend bei der Kompensation einer Azidose [28]. Als eine osmotisch aktive Substanz wirkt es in der Muskelproteinbilanz [121]. Zudem ist der Skelettmuskel der größte Speicher von Glutamin und gibt im Bedarfsfall die Aminosäure in das Blutplasma ab. Studien von Parry-Billings et al. [105] und Yaqoob et al. [145] zeigten, dass dies ein glukokortikoidsensitiver Prozess ist. Daher setzt die Glutaminsynthese im Stress verstärkt Glutamin aus dem Muskel frei [60]. Eine neue Überlegung geht davon aus, dass Glutamin nicht nur in großen Mengen im Darm verbraucht wird, sondern auch im Bedarfsfall von dort freigesetzt werden kann [88]. Der Prozess der Freisetzung aus dem Muskelgewebe ist in katabolen Stresssituationen bedeutend. In diesen Fällen kann Glutamin zu einer semiesentiellen Aminosäure werden [2].

Eine Verwendung für Glutamin findet unter anderem in RPMI Kulturnährmedien statt. Dass die Aminosäure Glutamin ein wichtiger Bestandteil in den Zellkulturmedien ist, schilderten zuerst Ehrensvar et al. 1949 [35]. Später folgte dazu eine ausführliche Untersuchung von Eagle et al. [34] im Jahre 1956. Deren Ergebnisse führten zu einer Entwicklung eines Nährmediums mit Wachstumsfaktoren, 19 nichtessentiellen sowie essentiellen Aminosäuren in physiologischer Zusammenstellung sowie einer überaus hohen Glutaminkonzentration von  $2000 \mu\text{mol/l}$  [96, 97].

Lange Zeit konnte man Glutamin aufgrund der physikalisch-chemischen Eigenschaften nicht in der parenteralen Ernährung einsetzen. Erst als Dipeptid, wie Anlyl-Glutamin und Glycyl-Glutamin, wurde eine Langzeitstabilität erreicht, die eine kommerzielle Verwendung in der TPN zuließ. Dabei zeigt eine Studie von Kirchner et al. [66], dass das Dipeptid die gleiche Wirkung wie das Glutamin selbst erzielt.

### 2.2.2 Die Bedeutung von Glutamin im Immunsystem

Die meisten Studien erfassen die Reaktionen von Immunzellen nur anhand *in vitro* Beobachtungen, bei denen ein künstlicher Überfluss oder Mangel an Glutamin herbeigeführt wurde. Durch verschiedene Konzentrationen des Glutamins konnte der Einfluss auf die Zellproliferation dokumentiert werden [2]. Erst in den 80er Jahren des 20. Jahrhunderts erkannte man, dass ruhende und aktivierte Immunzellen nicht nur in der Lage waren Glukose, sondern auch Glutamin zu verstoffwechseln [2, 25, 66, 96]. Zuvor ging man davon aus, dass dieses nur in der Leber, Zellen des Intestinums und in Tumoren verbraucht wurde [96].

*In vitro* Versuche bewiesen, dass Monozyten und Lymphozyten einen hohen Glutaminumsatz besitzen. Makrophagen, welche phagozytieren können und eine hohe Proteinsekretion betreiben, sind trotz des hohen Glutaminverbrauches nicht in der Lage, dieses zu synthetisieren [96]. Dadurch wird ihre Nukleinsäuresynthese, Phagozytosefähigkeit und Interleukinausschüttung limitiert [135]. Auch die Expression der MCH-II-Klasse HLA-DR-Antigene, die gleichzeitig die Aktivität dieser Zellen anzeigt, ist von der Glutamin-Plasma-Konzentration abhängig. Dies belegten Parry-Billings et al. [105] durch *in vitro* Studien mit peritonealen Makrophagen von Mäusen. Gleichzeitig bewiesen sie die Glutaminabhängigkeit der Lymphozytenaktivität beim Menschen [79].

Unter anderem gelang der Nachweis einer gesteigerten Lymphozytenproliferation (*in vitro*), einer erhöhten Lymphozytenzahl (*in vivo*) sowie einer gesteigerten Expression von den Oberflächenantigene „cluster of differentiation“ (CD) 3, 4, 8 und 19 bei einer zusätzlichen enteralen Glutamingabe [123]. Eine optimale Lymphozytenfunktion wurde bei einer Glutaminkonzentration zwischen 600 – 2000  $\mu\text{mol/l}$  ermittelt. Chang et al. [22] beobachteten die lymphozytenmodulierende Funktion von Glutamin auf die peripheren T-Lymphozyten, die durch Ionomycin und Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA) stimuliert wurden. Diese fördert die Expression der Bcl-2 und reduziert die CD95-Marker, welche die Apoptose der T-Zellen steuern und in diesem Fall den Zelltod hinauszögern. Unter anderem verändert eine inadäquate Glutaminkonzentration das  $\text{CD4}^+ / \text{CD8}^+$ -Zellenverhältnis durch Abnahme der  $\text{CD4}^+$ Lymphozyten [108, 145]. Hohe Konzentrationen von Glutamin über 1000  $\mu\text{mol/l}$  führten zu einer verminderten Lymphozytenproliferation in den *in vitro* Versuchen. Eine Erklärung dafür ist, dass Metaboliten des Glutamins, wie Glutamat und Ammoniak, einen immunsuppressiven Effekt bewirken [128]. Ferner konnte eine ansteigende Produktion von Interleukin-2, Interleukin-10 und Interferon- $\gamma$  in menschlichen Lymphozyten und eine erhöhte Aktivität der

natürlichen Killerzellen sowie B-Zell-Differenzierung festgestellt werden [22, 97, 108, 145]. Bekannt ist auch, dass die Zellen des Immunsystems den Glutaminstoffwechsel beeinflussen. Chakrabarti et al. [20] zeigten in Muskelzellkulturen, dass die TNF- $\alpha$ -Ausschüttung von Makrophagen die Glutaminsynthasegenexpression induzierte. Daher ist es nicht überraschend, dass der Glutaminkonzentration im Plasma und deren Einfluss auf das Immunsystem bei kritisch Erkrankten eine bedeutende Rolle zukommt [97]. Dagegen war bisher in den Studien noch kein negativer Effekt durch eine Glutaminsubstitution nachzuweisen.

### **2.2.3 Parenterale Glutaminnutrition im katabolen Stress**

Es konnte in verschiedenen Untersuchungen gezeigt werden, dass eine zusätzliche enterale oder parenterale Gabe von mindestens 20 g/d Glutamin das Auftreten von Infektionen und die Morbiditätsrate bei Patienten senkt [52, 60, 102, 107]. Zusätzlich wird über eine verringerte Intensiv- und Krankenhausverweildauer berichtet [99]. Glutamin und dessen Wirkung ist daher besonders interessant bei der Ernährung und für den Metabolismus bei kritisch Erkrankten [52]. Steinau et al. [123] sahen in einer enteralen Glutaminsubstitution folgende Zielvorstellungen:

1. Reduktion des Autokannibalismus  
(verbesserte Stickstoffbilanz durch körpereigene Proteinkonservierung)
2. Protektion der intestinalen Barrierefunktion  
(verminderte Mukosaatrophie und konsekutiv reduzierte Bakterientranslokation)
3. Steigerung der zellulären Immunabwehr
4. Steigerung der antioxidativen Kapazität des hepatischen Glutathionsystems.

Das Konzept der Ernährungssupplementierung von lebensnotwendigen Nährstoffen zur Unterstützung und Stärkung des Immunsystems ist als Immunonutrition bekannt und stellt eine besondere Form der Ernährungstherapie dar [41].

Während der Zeit, in welcher der Organismus hyperkatabolen und hypermetabolen Krankheitszuständen unterliegt, wird Glutamin zu einer semiessentiellen Aminosäure [10]. Die Glutaminkonzentration im Blutplasma sinkt durch verschiedene inflammatorische Prozesse wie Sepsis, Verletzungen und Infektionen oder auch bei Ausdauerübungen sowie bei übermäßigem Training [4, 84, 96, 105, 111]. Aber auch Patienten im höheren Alter mit einer ausgeprägten Kachexie, pulmonaler Dysfunktion oder schwierigem

Verlauf nach operativen Eingriffen zeigen einen besonders ausgeprägten Glutaminmangel [46, 102]. Wilmore et al. [141, 142] konnten beweisen, dass der Glutaminverbrauch unter anderem von der Größe des operativen Eingriffs abhängig ist. Im katabolen Stress ist der Organismus nicht mehr in der Lage, Glutamin in ausreichender Form zu synthetisieren oder aus dem Skelettmuskel freizusetzen. Der erhöhte Bedarf führt trotz der verstärkten Mobilisierung zu einer erniedrigten Blutplasmakonzentration. Diesen Vorgang konnten Stinnnett et al. [125] und Parry-Billings et al. [105] bei Patienten mit Verbrennungen aufzeigen. Bei gesunden Probanden liegt die Glutamin-Plasma-Konzentration bei 600  $\mu\text{mol/l}$ , bei kritisch Erkrankten wurde eine Konzentration von 200  $\mu\text{mol/l}$  ermittelt. Die erniedrigte Konzentration führt zu abnehmenden Zellmediatoren und folglich zu einer reduzierten Immunantwort, welche wiederum die Wahrscheinlichkeit für Infektionen erhöht [22]. Durch eine zusätzliche enterale oder parenterale Nutrition konnten diese Folgen in einigen Studien verringert werden. Unerwünschte Nebenwirkungen wurden bisher noch nicht dokumentiert.

In den meisten Studien erfolgte die Glutamingabe durch eine totale parenterale Nutrition. Nur einige wenige erfassten die Auswirkung durch eine enterale Supplementierung. Die Studie von Houdijk et al. [58], in der eine enterale Gabe von Glutamin bei Patienten mit Polytraumen erfolgte, wies eine eindeutig verringerte Anzahl an Pneumonien, Bakteriämie und Sepsis nach. Gleichzeitig konnte belegt werden, dass die systemische inflammatorische Antwort durch das TNF- $\alpha$  eindeutig niedriger ausfiel. Auch konnte ein positiver Effekt auf das Körpergewicht und Körperzellmasse bei AIDS-Patienten durch eine enterale Nutrition mit 40 g/d Glutamin bewiesen werden [10].

Eine Untersuchung von Hammerquist et al. [51, 52], bei der eine parenterale Nutrition mit Glutamin erfolgte, demonstrierte, dass der Glutaminabbau aus dem Skelettmuskel deutlich verringert war. Bei Knochentransplantationen konnten Ziegler et al. [147] eine reduzierte Häufigkeit der bakteriellen Infektionen vorweisen und Griffith et al. [46] erreichten eine erhöhte 6-Monats-Überlebenszeit mit einer 18 g/d Gabe von L-Glutamin. Weiterhin verringerten sie in ihrem Kollektiv durch eine parenterale Supplementierung das Risiko für Pilzinfektionen. Morlion et al. [89] konnten darlegen, dass die Lymphozytenanzahl am dritten postoperativen Tag bei Bauchoperationen in der Patientengruppe bei einer TPN mit Glutamin im Normalbereich lag, während in der Kontrollgruppe eine sinkende Zellzahl auftrat. O'Riordain et al. [101] zeigten unter einer parenteralen Glutamingabe in der postoperativen Patientengruppe eine ansteigende T-Zell-DNA-Produktion. Ferguson et al. [38] beobachteten, dass ein reduzierter  $T_H-1 / T_H-2$  Quotient

von 0,46 (bei gesunden Probanden 2,5) und eine vorherrschende Dominanz der  $T_H$ -2-Zytokine, welche die Folgen eines Glutamindefizits waren, eine Infektion begünstigen [95].

Durch den Vergleich der unterschiedlichen Studien erwies sich die parenterale Glutaminnutrition als eine ausgezeichnete Lösung für Patienten im katabolen Stress. Dagegen gewährleistete die enterale Nutrition eine Erhaltung der Barrierefunktion des Darmes und somit die Funktion des darmassoziierten lymphatischen Gewebes [39, 55].

## **2.3 Kardiochirurgie**

### **2.3.1 Die Anfänge der Herz-Lungen-Maschine**

Verschiedene angeborene oder erworbene Defekte des Herzens erfordern einen operativen Eingriff. Während der Operation ist eine extrakorporale Zirkulation (EKZ) durch die Herz-Lungen-Maschine (HLM) erforderlich. Indikationen für ein kardiologisches Einschreiten stellen ein Herzklappenersatz, Rekonstruktion von Herzklappen, Korrektur kongenital bedingter Herzfehler, Operationen an der Aorta und die Bypasschirurgie dar. Eine EKZ ermöglicht, dass das Herz und die Lunge vollständig aus dem Blutkreislauf genommen werden, ohne dass die Versorgung des Körpers mit Blut während der Operation unterbrochen wird [8, 72, 126].

Die Chirurgie am Herzen spielte bis zum Ende des 2. Weltkriegs im Jahr 1945 keine große klinische Rolle. Der Beginn der Herzchirurgie in Deutschland wird oft mit der ersten erfolgreichen Naht einer Herzwunde durch Ludwig Rehn 1896 festgelegt. Operationen der Pericarditis constrictiva wurden schon in den 20er und 30er Jahren des 20. Jahrhunderts durchgeführt. Die erfolgreiche pulmonale Embolektomie durch Martin Kirschner 1924 und die Operationstechnik von Friedrich Trendelenburg 1908 waren einzelne Erfolge. Die erste geglückte Herzwandaneurysmaoperation durch Ferdinand Sauerbruch 1931 und der Verschluss eines persistierenden Ductus Botalli durch Emil Karl Frey 1938 waren einzelne erfolgreiche Resultate. Diese Eingriffe fanden noch ohne eine extrakorporale Zirkulation statt [87]. Wichtig für den erfolgreichen Einsatz der Herz-Lungen-Maschine war die Entdeckung des Heparins durch McClean 1916. Weitere Voraussetzungen waren die Entwicklung der noch heute benutzten Rollenpumpen für den Bluttransport im Jahr 1934 und die Entdeckung der Technik der Sauerstoffanreicherung im Jahre 1944. Die Konstruktion eines Oxygenators um 1955 reduzierte die

Gefahr der Luftembolie. Erst 14 Jahre später erreichte der noch heute eingesetzte Membranoxygenator die Marktfähigkeit [8, 87].

Im Jahr 1937 gelang dem Amerikaner John Gibbon im Experiment die erste vielversprechende extrakorporale Zirkulation. Die dagegen am 5. April 1951 von Clarence Dennis in Minneapolis versuchte erste Herzoperation mit einer Herz-Lungen-Maschine blieb ohne Erfolg. Erst am 6. Mai 1953 glückte Gibbons eine 45-minütige Operation eines Vorhofseptumdefektes an einem achtzehnjährigen Mädchen unter dem Einsatz der EKZ [43]. Damit war die moderne Ära der Herzchirurgie eingeleitet. Nun bestand die Möglichkeit für Operationen am offenen sowie zeitweise stillgelegten Herzen [8].

### **2.3.2 Folgen des kardiochirurgischen Eingriffs auf den Organismus**

Im Jahr 2004 wurden 1 168 Menschen pro Million Einwohner in Deutschland am Herzen operiert. In den 78 hochspezialisierten Zentren wurden 96 340 Eingriffe unter Einsatz der Herz-Lungen-Maschine durchgeführt [23]. Ursachen für die hohe Quote an Herzoperationen sind zum einen das immer ältere werdende Patientenkollektiv und zum anderen die steigende Inzidenz der koronaren Herzerkrankungen und deren Folgen, die in den Industrieländern die führende Todesursache darstellt [5, 123].

Schon während der Anfänge der Herz-Lungen-Maschinen-Operationen bemerkte man postoperative Komplikationen, welche auf die EKZ zurückgeführt wurden. Die Beeinträchtigung der unterschiedlichsten Organsysteme durch die nicht-physiologischen Bedingungen der EKZ hat eine erhöhte postoperative Letalität der Patienten zu Folge.

Diskutiert wurden seither verschiedene Auslöser der Komplikationen nach kardiochirurgischen Eingriffen. Unter anderem bedachte man Fehler bei der Diagnosefindung und im Operationsverfahren als auch pulmonale, kardiovaskuläre, hämatologische und zerebrale Komplikationen sowie ein mangelhaftes Säure-Basen-Management. Neben den Erklärungen der Eiweißdenaturierung und Mikroembolien hielt man diese Faktoren für die Hauptursachen der hohen Letalität [65, 73, 109].

#### **➤ Inflammatorische Antwort**

Kardiochirurgische Operationen provozieren eine starke inflammatorische Antwort, welche bedeutend für den klinischen Ausgang ist. Laffey et al. [71] diskutierten, dass zu den unspezifischen Faktoren der Immunaktivierung, die im engen Zusammenhang mit dem „*systemic inflammatory response syndrome*“ (SIRS) steht, unter anderem die Hypothermie durch die niedrige Perfusionstemperatur [57], der Blutverlust als auch die

Bluttransfusion gehören. Ebenfalls ist das gesetzte Trauma im Operationsfeld ein Auslöser der Immunabwehraktivierung und ist somit für die Inflammation mit den postoperativen Komplikationen, wie Fieber, Infektionen (Wundinfektion oder Sepsis mit 12 % aller Komplikationen), Lungenversagen (Pneumonien 7 %), Schmerzen sowie einer gestörten Leberfunktion und Gerinnung (hämorrhagische und embolische Vorfälle mit 7 %), myokardialer, renaler und neurologischen Dysfunktionen verantwortlich. Zuletzt kann ein Multiorganversagen eintreten [5, 56, 57, 100].

Das SIRS ist durch die Ausschüttung von vorwiegend proinflammatorischer Zytokine und anderer Entzündungsmediatoren gekennzeichnet [9]. Es kommt zu einer überschießenden Reaktion des Organismus. Diese besteht aus der Aktivierung aller beteiligten Kaskadensysteme des Entzündungsablaufs, einer Dysregulation der zellvermittelten Immunantwort sowie einer Veränderungen von Produktion und Ausschüttung von Mediatoren der Immunantwort [18]. Besonders Interleukin-6 und TNF- $\alpha$  sind bei der Entstehung des SIRS bedeutend [71, 74].

Durch die Festlegung der amerikanischen Gesellschaften „*American College of Chest Physicians (ACCP)*“ sowie der „*Society of Critical Care Medicine (SCCM)*“ besteht ein SIRS, wenn mindestens zwei der folgenden Kriterien vorliegen:

1. Körpertemperatur  $<36^{\circ}\text{C}$  oder  $>38^{\circ}\text{C}$
2. Tachykardie mit einer Herzfrequenzen über 90/min
3. Atemfrequenz  $> 20/\text{min}$  oder Hyperventilation  $\text{PaCO}_2 < 33 \text{ mmHg}$
4. Leukozytenzahl  $< 4000/\text{mm}^3$  oder  $> 12000/\text{mm}^3$   
oder  $> 10 \%$  unreife neutrophile Granulozyten im Differentialblutbild.

Über spezifische Faktoren, die als Auslöser eines unspezifischen generalisierten inflammatorischen Prozesses in Frage kommen, berichten zum Beispiel Dodrill et al. [32]. Schon 1958 vermutete man, dass mechanische Faktoren wie der Kontakt des Blutes mit den Fremdoberflächen der HLM und der damit auftretenden Scherkräfte zu einer Aktivierung von Inflammation und Gerinnung und somit zu der erhöhten Entzündungszellaktivität führen. Diese sogenannte „*postpump*“-Inflammationsantwort zeigt einen erhöhten Plasmaspiegel der unterschiedlichsten Entzündungsmediatoren [13, 86, 134]. Einen weiteren Auslöser stellen die Endotoxine selbst dar, welche durch Bakterien des Magen-Darm-Traktes freigesetzt werden und die Mukosabarriere zerstören und dann durchwandern [64, 71]. Des Weiteren tragen die Ischämierereperfusionsschäden, die infolge der Umstellung der extrakorporalen auf die physiologische Zirkulation am Ende

der Operation (Bildung von O<sub>2</sub>-Radikalen, Lipid-Peroxidation) auftreten, zu den postoperativen Komplikationen bei.

Über den Zusammenhang zwischen Inzidenz, Heftigkeit, klinischem Outcome und der inflammatorischen Antwort existieren drei Erklärungen. Eine davon ist das komplexe Zusammenspiel zwischen der humoralen proinflammatorischen und antiinflammatorischen Reaktion. Auch wird das „*multiple-hit*“-Szenario beschrieben, welches sich nach der Operation als ein Ergebnis gegenläufiger Ereignisse entwickelt. Zuletzt wird ein fundamentales Missmanagement in der inflammatorischen Antwort diskutiert [71].

Verschiedene Studien, in denen ein Vergleich zwischen konventionellen Herzoperationen mit und ohne HLM-Einsatz durchgeführt wurde, wiesen eine signifikante Expression von Immunaktivierungsmarkern und Adhäsionsmolekülen bei Patienten nach konventionellen Herzoperationen auf. Die Auswirkungen der systemischen Entzündungsreaktion auf das zelluläre Immunsystem zeigen sich unter anderem in einem Anstieg der CD8<sup>+</sup> und einer Verminderung der CD4<sup>+</sup>-T-Zellen [27]. Weiterhin kommt es zur Sekretion von verschiedenen Zytokinen, wie IL-6 und TNF- $\alpha$  [9, 58]. Die Ausschüttung der Zytokine erfolgt von unterschiedlichen Quellen, wie dem Endothel, Monozyten, Makrozyten und dem Myokard. Auch die T-Lymphozyten sind bedeutend bei der Veränderung des Zytokinspiegels. Gerade bei großen Wunden, der Sepsis und dem Schock scheinen diese schädigend zu wirken. Zudem erklären die proinflammatorischen Mediatoren die pyrogene Wirkung der klinischen Symptome wie Leukozytose und Lymphopenie.

Während und nach der EKZ steigt die Konzentration von TNF- $\alpha$  im Blut an [137]. Laut Miller et al. [85] erreicht diese den ersten Maximalwert 2 h nach Beginn der EKZ und den zweiten Maximalwert 18-24 h später. TNF- $\alpha$  selbst induziert die Bildung von IL-1 und IL-6 sowie von Leukotrienen, PAF und der Akutphaseproteine der Leber. Es spielt daher in der Mediatorenkaskade der Sepsis eine wichtige Rolle. Bei mikrovaskulären Thrombosen ist TNF- $\alpha$  ein Trigger. Durch die Gabe von Anti-TNF- $\alpha$  konnte ein geringeres Auftreten des Multiorganversagens erreicht werden [9, 31]. Das IL-6 erreicht seinen maximalen Plasmaspiegel 4 h nach Beginn der EKZ. Die Arbeitsgruppe Wan et al. [137] beobachtete, dass das IL-6 vom ischämischen und wiederdurchbluteten Herzmuskel gebildet wird. In verschiedenen Studien konnte bewiesen werden, dass ein erhöhter IL-6 Spiegel mit einer erhöhten Letalität einhergeht [9, 53]. In der Sepsistherapie ist IL-6 ein Marker für die Immundefunktion und hat sich als ein Outcomeparameter für das Multiorgan-Dysfunktionssyndrom bewährt [64, 113].

### **2.3.3 Modifikation des postoperativen kardiochirurgischen Verlaufs**

Obwohl zahlreiche intensive Untersuchungen über die Mechanismen der generalisierten Entzündungsreaktion durch die EKZ stattfanden, konnte man den klinischen postoperativen Verlauf bis jetzt noch nicht wesentlich beeinflussen.

Auch zukünftig werden weitere neue Diagnostikmöglichkeiten und Therapien gesucht, um das Risiko für Komplikationen und negativen klinischen Outcome zu senken [104]. Eine Vielfalt an unterschiedlichen Strategien halfen in den letzten Jahren das Auftreten von SIRS und die postoperativen Komplikationen bei kardiochirurgischen Patienten zu verringern. Dazu gehören neue pharmakologische Zusätze, Studien über den Einfluss verschiedener Pharmazien auf das Immunsystem sowie technisch verbesserte EKZ-Komponenten und optimierte chirurgische Techniken.

Zu den schlecht beeinflussenden Risiken der Modulation der inflammatorischen Antwort gehören diabetische sowie kardiale Erkrankungen. Dagegen ist die Dauer des operativen Eingriffs variabel. Auch die Zeitspanne der Ischämieperfusion sowie Kontaktaktivierung lassen sich minimieren. Eine endotoxische Komplikation lässt sich unter anderem durch eine Dekontamination des Darmes mit nicht resorbierbaren Antibiotika verringern [99].

Die enterale Ernährung und Immunonutrition beeinflussen über die Funktion des Immunsystems unter anderem die Mortalität, Morbidität und Krankenhausliegezeiten der Patienten [71]. Tepaske et al. [130] verabreichten fünf Tage vor dem operativen kardiochirurgischen Eingriff eine orale immunfördernde Ernährungsergänzung. Diese frühzeitige Immunonutrition mit L-Arginin, Purinnukleotiden und Omega-3-Fettsäuren reduzierte bei kritisch erkrankten Patientenkollektiven die Anzahl an Organdysfunktionen sowie Krankenhausliegezeit [130].

Für kardiochirurgische Eingriffe sowie mögliche postoperative Komplikationen, bei denen eine parenterale Glutaminsupplementation erfolgte, liegen bisher noch keine Ergebnisse vor [71].

## 2.4 Zytokine

Das Immunsystem ist ein Organsystem, das körperfremde Substanzen wie Fremdproteine, Zellen, Bakterien und Viren oder anomale Körperzellen erkennen und abwehren soll. Zu den Organen des Immunsystems gehören die primären Teilsysteme wie Knochenmark und Thymus. Als sekundäre Organe gelten Milz, Lymphknoten und das diffuse lymphatische Gewebe wie Tonsillen, Appendix und Peyer'sche Plaques. Die im Körper verteilten Zellen und Moleküle des Immunsystems tragen zur unspezifischen und spezifischen Abwehr bei [63].

Zu den humoralen Mechanismen (pH-Verhältnisse, Lysozyme und C-reaktives Protein) gehören die unspezifischen löslichen Abwehrmechanismen wie Komplementsystem und Zytokine (Tumor-Nekrose-Faktor, Interleukine und Interferone).

Eine angeborene Basisabwehr ist prinzipiell unabhängig vom Erreger und reagiert schnell sowie schon beim Erstkontakt. Verschiedene Faktoren tragen zur Abwehr bei [63]. Anatomische Gegebenheiten (Plattenepithel der Haut, Faszien und Blut-Hirn-Schranke) sowie physikalische Faktoren (Schleimproduktion, Zilienbewegung und Peristaltik) verhindern ein Eindringen von Erregern. Auch Fieber, ausgelöst durch exogene Pyrogene und deren Induktion von endogenen Pyrogenen der Makrophagen, kann eine Keiminvansion verhindern [33, 61].

Diese spezifizierete und zytokinvermittelte Aufgabe wird durch die humorale und zelluläre Abwehr übernommen, zu welchen die B- und T-Lymphozyten gehören [63]. Die durch die T-Lymphozyten vermittelten Immunmechanismen sind die Elimination von Keimen und Viren, Transplantatabstoßung sowie die Tumorüberwachung. Nach der Edukation im Thymus besitzen die reifen T-Zellen einen charakteristischen CD3- und T-Zellrezeptor an ihrer Oberfläche. Aufgrund weiterer Oberflächenstrukturen werden T-Zellen nach Differenzierungsantigenen mit dem CD-System in zwei Subpopulationen unterteilt: die CD4- und CD8-Zellen. Die CD4<sup>+</sup>-T-Zellen können nur mit Hilfe von Wirtszellen aktiviert werden, die das Antigen zusammen mit erkenntungsvermittelten Oberflächenmolekülen, den MHC-Klasse-II-Molekülen, präsentieren. Dringt ein Antigen in die Wirtszelle ein, wird dieses ebenfalls in antigene Epitope zerlegt, aber durch ein MHC-Klasse-I-Molekül den CD8<sup>+</sup>-Zellen präsentiert [33, 61].

Der induktive Stimulus wird von den T-Helferzellen auf die Zielzelle durch die löslichen Interleukine ausgelöst. Interleukin-2 und Interferon- $\gamma$  werden hauptsächlich von den T<sub>H</sub>-1-Zellen sezerniert. Diese sind an der zellvermittelnden Immunantwort gegen Viren, intrazelluläre Bakterien und Protozoen ausschlaggebend beteiligt. Die T<sub>H</sub>-2-Hel-

ferzellen produzieren vorwiegend IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 und IL-13. Durch diese wird die humorale Immunität über die B-Lymphozyten und Makrophagen gesteuert [2]. Zytokine sind biologisch aktive Moleküle und kontrollieren die Aktivität von verschiedenen Zellen und können alle Aspekte einer Immunantwort beeinflussen. Es existieren mehrere heterogene Gruppen von löslichen Proteinen (~ 5-70 kDa) und Peptiden, die im nano- und picomolaren Bereich als humorale Regulatoren agieren. Zytokine sind antigenunspezifisch und wirken auf unterschiedliche Zielzellen, jedoch auf spezielle Oberflächenrezeptoren. Ihre Wirkung ist funktionsspezifisch, obgleich unterschiedliche Zytokine die gleiche Reaktion hervorrufen können [33, 61]. Die temporäre Produktion und Freisetzung der Zytokine (autokrin oder parakrin), die auf einen bestimmten Stimulus erfolgt, findet durch verschiedene Zellen (aktivierte T-Lymphozyten, Makrophagen oder Monozyten) statt. Je nach Ursprungszelle kann ein Zytokin als Lymphokin (von Lymphozyten) oder Monokin (von Monozyten) bezeichnet werden [63]. Entsprechend ihrer dreidimensionalen Struktur sowie Rezeptoren werden sie in verschiedene Gruppen zusammengefasst. Die drei Hauptfamilien gliedern sich in Hämatopoetine (Interleukine und Wachstumsfaktoren), Tumor-Nekrose-Faktoren und Chemokine. Besonders die proinflammatorischen wirkenden Zytokine weisen eine eigene Struktur auf [33, 61]. Es existieren bisher über 50 beschriebene Zytokine und somit auch unterschiedliche schützende oder zerstörende Funktionen. Diese wirken anti- oder proinflammatorisch und beeinflussen nicht nur das Immunsystem, sondern auch die Hämatopoese. In der Pathogenese des SIRS sowie der Sepsis spielen die produzierten proinflammatorischen Zytokine wie IL-6, IL-8 und TNF- $\alpha$  eine spezielle Rolle. Bei einem erhöhten Plasmaspiegel zeigt sich eine positive Korrelation mit einem Anstieg der Mortalität bei Patienten [9, 53]. Andere Zellen, wie Fibroblasten, werden in ihrer Reifung und im Wachstum gefördert oder gehemmt. Auch eine antiinfektiöse, chemotaktische, antivirale und pyogene Wirkung ist möglich [97]. Die in dieser Studie untersuchten Zytokine werden in der Tabelle 1 aufgeführt.

**Tabelle 1: Zytokine** [33, 61, 63, 71]

	<b>Zytokin</b>	<b>Größe [kD]</b>	<b>Herkunft</b>	<b>Zielzellen</b>	<b>Wirkung</b>	<b>Effekt</b>
<b>Hämatopoetine</b>	<b>IL-4</b> (BCGF-1, BSF-1)	18-20, Monomer	T-Zellen, Epithelzellen des Thymus	B-und T- Zellen, Mastzellen	B-Zellaktivierung IgE-Wechsel, Hemmung Typ1-Polari- sation	↓ IgE-Syn- these
<b>Hämatopoetine</b>	<b>IL-6</b> (IFN-β2, BSF-2)	21-26, Monomer	T-Zellen, Makrophagen, Endothelzellen	T-Zellen, Makrophagen	Akutphaseprotein- produktion B-Zellproliferation Lymphozytenaktivator	↓Immunant- wort ↓IgA-Produk- tion
<b>Tumor-Nekrose-Faktor</b>	<b>TNF-α</b> (Cachectin)	17,3 Trimere	T- und B-Zellen, Makrophagen, Mastzellen, Monozyten, NK-Zellen	Endothel- zellen, Makrophagen	Entzündungsmediator, Makrophagenaktivator Endothelaktivator	Resistenz gegen septi- schen Schock
<b>Interferon</b>	<b>IFN-γ</b>	90, Homodimer	T-Zellen, NK-Zellen, Makrophagen	Makrophagen, B-Zellen	Makrophagenaktivierung, Klassenwechsel zu IgG2a und IgG3 Hemmung Typ2- Polarisation	↓Resistenz gegen Bakterien und Viren

## 2.5 Fragestellung

Die bedeutende Rolle der HLM bei der Induktion einer systemischen Entzündung als zusätzlicher Trigger ist offensichtlich. Der Einsatz der HLM ist ein Stresszustand u.a. für die T-Zellen [27]. Verschiedene Untersuchungen haben gezeigt, dass durch diesen Stress der Verbrauch an Glutamin, welches unter anderem der Hauptenergielieferant für die zellulären Komponenten des Immunsystems ist, rapide ansteigt.

Appliziert man nun einer Patientengruppe zusätzlich parenteral Glutamin im Vergleich zu zwei anderen Untersuchungsarmen, von denen die eine Gruppe eine glutaminfreie, isonitrogene Aminosäurelösung und die andere eine Kontrolllösung aus 0,9 % NaCl erhält, stellt sich die Frage hinsichtlich einer Veränderung des klinischen Outcomes und des funktionellen Zustands der T-Zellen. Daher ist auch zu hinterfragen, ob der Einsatz von Glutamin nicht nur wie bisher untersucht die antiinflammatorische Antwort, sondern auch die Inflammation unterstützt.

Um diese Überlegung zu überprüfen, wurde in dieser Studie den Patienten mit einer elektiven, kardiochirurgischen Operation eine perioperative Glutamingabe mit einer Dosis von 0,5 g/kg/Tag verabreicht. Um ein Risikoklientel zu wählen, wurden die Patienten in jene eingegrenzt, die lymphopen waren.

Es ergeben sich folgende Fragestellungen:

- Ergibt sich eine Veränderung der zellulären Immunantwort bei der Detektion intrazellulärer Zytokine nach Stimulation von T-Lymphozyten bei der proinflammatorischen Antwort von Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$ , Interleukin-6, Interferon- $\gamma$  und der antiinflammatorischen Antwort des Interleukin-4?
- Welchen Einfluss hat die parenterale Applikation von Glutamin auf den Glutamin-Plasma-Spiegel?
- Sind dabei Auswirkungen auf die Inzidenz von Organdysfunktionen des Patientenkollektivs zu beobachten?

### 3. Patienten und Methoden

Nachdem die lokale Ethikkommission diese Studie (Nr. 41/03) genehmigt hatte, konnte diese prospektive, randomisierte und doppelt verblindete Studie mit drei Untersuchungsarmen der Klinik für Anaesthesiologie, Intensivmedizin und Schmerztherapie der Justus-Liebig-Universität Gießen im Jahr 2003 durchgeführt werden. Die Gruppen unterschieden sich in der parenteralen Substitution (Kapitel 3.2). Das Patientenkollektiv, welches sich aus der Klinik für Herz-, Kinderherz- und Gefäßchirurgie des Universitätsklinikums Gießen und Marburg, Standort Gießen sowie aus der Herzchirurgie der Kerckhoff-Klinik Bad Nauheim zusammensetzte, umfasste 79 Patienten. Alle Teilnehmer wurden über die Studie informiert, aufgeklärt und gaben ihr schriftliches Einverständnis zur Teilnahme. Um eine Übereinstimmung der verschiedenen Operationsabläufe als auch -techniken zu gewährleisten, wurden in beiden Kliniken die einflussnehmenden Faktoren gegenübergestellt und angenähert. Durch diese Maßnahmen wurde eine Vergleichbarkeit der Daten erreicht.

#### 3.1 Patientenauswahl

Für die Patienten dieser Studie gelten folgende Kriterien:

- **Einschlusskriterien**
  - Absolute Lymphozytenzahl unter 1,2 Giga/l  
(Diese Patienten gehören einer besonderen Risikogruppe an)
  - Elektive Herzchirurgie mit extrakorporaler Zirkulation
  - Ejektionsfraktion  $\leq 40\%$  und / oder Alter  $\geq 70$  Jahre
- **Ausschlusskriterien**
  - Alter  $\leq 21$  Jahre
  - Frauen in der Schwangerschaft oder Stillzeit
  - Diagnostiziertes Malignom
  - Kortikoid- oder immunsuppressive Therapie
  - Patienten mit einer Autoimmunerkrankung oder Diabetes mellitus
  - Nichtsteroidale antiinflammatorische Medikation (Langzeittherapie)
  - Schwere Leber- (GOT, GPT  $> 300$  U/l, CHE  $< 1000$  U/l) und / oder Nierenerkrankung (Kreatinin  $> 2$  mg/dl, Harnstoff  $> 180$  mg/dl)
- **Abbruchkriterien**
  - Tod des Patienten

### 3.2 Studienentwurf

Das Kollektiv, bestehend aus 79 Patienten, setzte sich aus 26 weiblichen und 53 männlichen Patienten zusammen. Der Altersbereich lag zwischen 48 und 83 Jahren. Die Patientengruppe wurde in drei Untersuchungsarme unterteilt, welche sich in der intra- und postoperativen parenteralen Ernährung unterschieden:

- **Glutamingruppe**

Glutamin (Dipeptamin®, Fa. Fresenius Kabi, Bad Homburg):

0,735 g/kg L-Alanyl-L-Glutamin (= 0,5 g/kg Glutamin) plus 0,1 g/kg standardisierte Aminosäurelösung plus 0,4 g/kg Glukose ad 1000 ml NaCl 0,9 %

- **Aminosäuregruppe**

Aminosäuren (Aminoplasma®-10 %, Fa. B. Braun Melsungen AG):

0,835 g/kg standardisierte Aminosäurelösung plus 0,4 g/kg Glukose ad 1000 ml NaCl 0,9 %

- **Kontrollgruppe**

Natriumchlorid: 1000 ml NaCl 0,9 %

- **Applikationsschema**

In allen drei Untersuchungsarmen wurden die Nährlösungen intra- und postoperativ bis zum zweiten Tag nach der Operation parenteral substituiert. Der Beginn der ersten intravenösen Infusion erfolgte bei der Narkoseeinleitung mit einer intraoperativen Flussrate von 100 ml/h von insgesamt 1000 ml Infusionsgemisch. An den beiden postoperativen Tagen (PoT) erhielten die Patienten täglich jeweils 1000 ml der Infusionslösung.

- **Zeitpunkte der Blutabnahmen**

Zur Ermittlung der zu untersuchenden Kriterien wurden zu fünf festgelegten Zeitpunkten 20 ml Blut in Natrium-Heparinat-Röhrchen abgenommen (Tabelle 2).

Anschließend wurden diese bei Raumtemperatur transportiert und nach einem standardisierten Arbeitsablauf (Tabelle 17 und 18, Kapitel 8.2) aufbereitet und gemessen.

**Tabelle 2:** Zeitpunkte der Blutabnahmen

	<b>Zeitpunkt 1</b>	<b>Zeitpunkt 2</b>	<b>Zeitpunkt 3</b>	<b>Zeitpunkt 4</b>	<b>Zeitpunkt 5</b>
<b>Zeit</b>	Narkosebeginn	Operationsende	1. PoT, 8.00 Uhr	2. PoT, 8.00 Uhr	3. PoT, 8.00 Uhr

**PoT** – Postoperativer Tag

### ➤ **Zielkriterien**

Folgende Zielkriterien wurden festgelegt:

1. Veränderung der zellulären Immunantwort in bezug auf die Detektion intrazellulärer Zytokine nach Stimulation von T-Lymphozyten (vor und nach der Operation sowie am ersten, zweiten und dritten postoperativen Tag):
  - a) proinflammatorischen Antwort: Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$   
Interleukin-6  
Interferon- $\gamma$
  - b) antiinflammatorische Antwort: Interleukin-4
2. Plasma-Glutamin-Spiegel
3. Organdysfunktion (SOFA-Score)

### ➤ **Begleitkriterien**

Weiterhin wurden beobachtet:

- Intensivliegezeit [Tage]
- Krankenhausliegezeit [Tage]
- C-reaktives Protein [mg/l]
- Art der Kardioplegie
- Beatmung [Stunden]
- Herz / Kreislauf: Katecholamine (Anzahl sowie Dauer in Stunden), „Assist-Device“ (Dauer in Stunden)
- Leber: GOT [U/l], GPT [U/l]
- Neurologie: Desorientiertheit [Tage]
- Niere: Kreatinin [mg/dl], Harnstoff [mg/dl], Diuretika (kumuliert) [mg]
- Transfusionsmenge (Anzahl an Erythrozytenkonzentraten, Frischplasmen, Thrombozytenkonzentraten)

## ✦ **Prä- und intraoperativer Ablauf**

### **Prämedikation**

Am Vorabend der Operation erhielten die Patienten jeweils 2 mg Flunitrazepam. Eine Stunde präoperativ erfolgte die Gabe von 2 mg Flunitrazepam mit 30 mg Morphin.

### **Narkoseeinleitung und Narkoseaufrechterhaltung**

Die Narkose wurde bei allen Patienten intravenöse mit Midazolam (0,05 - 0,1 µg/kg Körpergewicht), Pancuroniumbromid (0,1 µg/kg Körpergewicht) und Sufentanil (0,2 - 0,3 µg/kg Körpergewicht) eingeleitet. Die Intubation erfolgte orotracheal. Das Beatmungsgerät (Servo 900 C, Siemens, Erlangen) wurde im Beatmungsmodus „volumenkontrolliert“ eingestellt. Der paCO<sub>2</sub> lag im Bereich von 34 - 44 mmHg. Im 30-Minuten-Intervall erfolgte eine Applikation von 25 µg Sufentanil und bei Bedarf Propofol.

### **Monitoring**

Über eine Kanüle in der Arteria radialis erfolgte das invasive hämodynamische Monitoring zur Blutdruckmessung. Ebenso wurde ein Pulmonalarterienkatheter (PA-VIP-Katheter, Edward Lifescience, Irvine, USA) verwendet. Der systemische Mittelblutdruck lag zwischen 40 und 80 mmHg.

### **Antikoagulation und EKZ-Technik**

Vor dem Beginn der extrakorporalen Zirkulation wurde eine Antikoagulation mit 300 U/kg Heparin vorgenommen.

Die moderate Hypothermie (rektale Temperatur 33°C) erfolgte mit einem nonpulsatilen Fluss (2,4 l/min/m<sup>2</sup>) und einer monoarteriellen Kanüle. Der Gasaustausch wurde über einen Membranoxygenator (Maxima Plus, Medtronic, Anaheim, CA) durchgeführt. Das pH-Management folgte der alpha-stat-Methode. Der Hämatokritwert wurde während der EKZ zwischen 20 % und 30 % stabilisiert. Die Herz-Lungen-Maschine wurde mit 2000 ml Ringerlösung sowie 250 ml 5 %-iger Albuminlösung angefüllt. Zur Kardioplegie wurde Brettschneider-, Calafiore-Lösung oder Blutkardioplegie verwendet.

### **Weaning**

Vor dem „Weaning“ von der EKZ wurden die Patienten mit dem integrierten Wärmeaustauscher des Oxygenators und mit einer Wärmematte bis zu einer rektalen Temperatur von 35°C aufgewärmt. Die Reperfusionzeit des Herzens davor betrug ein Drittel der Ischämiephase. Die Entwöhnung von der EKZ wurde durch ein graduelles Füllen des Herzens bis zu einem systolischen Blutdruck von 90-100 mmHg oder einem maximalen diastolischen Pulmonalarteriendruck von 20 mmHg und der sukzessiven Rücknahme des EKZ-Flusses durchgeführt.

## **Medikamente**

Inotropika wurden dann verwendet, wenn die kardiale Kontraktilität während des Weaning und danach eingeschränkt war. Diese Beurteilung wurde entweder durch direkte visuelle Inspektion des rechten Ventrikels und / oder durch transösophageale Echokardiographie vorgenommen. Des Weiteren wurden Inotropika eingesetzt, wenn der mit Thermodilution gemessene Herzindex unter  $2 \text{ l/min/m}^2$  lag. Die Heparinwirkung wurde mit Protamin im Verhältnis 1:1 zur Heparindosis antagonisiert.

## **3.3 Methode der Vollblutaufbereitung**

### **3.3.1 Überblick der Arbeitsschritte zur Probengewinnung**

Die Aufbereitung des heparinisierten Vollblutes und die anschließende Messung der Detektion der intrazellulären Zytokine lassen sich in folgende Phasen unterteilen:

#### **Blutabnahme**

Zu den festgelegten Messzeitpunkten wurden den Patienten jeweils 20 ml Vollblut in Natrium-Heparinat-Röhrchen abgenommen und bei Zimmertemperatur transportiert.

#### **Aktivierung**

Verschiedene Regelmechanismen im Immunsystem des menschlichen Körpers verhindern eine unkontrollierte und überschießende Immunreaktion. Die T-Lymphozyten produzieren und setzen unter physiologischen Bedingungen nur wenige bis gar keine Zytokine frei. Demzufolge müssen diese *in vitro* stimuliert werden. Die hier verwendeten Substanzen Ionomycin und Phorbol-12-Myristat-13-Acetat setzen eine intrazelluläre, signalinduzierte Kaskade frei und fördern die Produktion und Akkumulation intrazellulärer Zytokine im Golgiapparat.

Durch die Zugabe von Brefeldin A (BFA) wurde gewährleistet, dass der intrazelluläre Transport der Zytokine in den T-Lymphozyten gehemmt wird. Infolgedessen ist später eine quantitative Messung der zytokinproduzierenden T-Lymphozyten möglich.

#### **Inkubation**

Anschließend wurde das mit PMA, Ionomycin, BFA und der Nährlösung RPMI versetzte Vollblut einer achtstündigen Inkubationszeit in einem abgedunkelten Brutschrank bei  $37 \text{ C}^\circ$  und einer  $\text{CO}_2$ -Luftkonzentration von 7 % ausgesetzt.

## **Markierung und Reinigung**

Den stimulierten und unstimulierten Blutproben wurde der fluoreszierende Antikörper CD3 Peridin Chlorophyll Protein (CD3PerCP) zugesetzt. Dieser bindet nur an den CD3-Rezeptor der T-Lymphozyten. Dadurch erreicht man eine eindeutige Identifizierung der zytokinpositiven T-Lymphozyten in der Messung. Um eine Reinigung der Blutprobe von den Erythrozyten und eine Fixierung der T-Lymphozyten zu erreichen, verwendete man eine FACS-Lysing-Solution. Dieses wirkt durch das hypotone Milieu lysierend auf die Erythrozyten und hält die Lymphozyten in ihrem derzeitigen Ist-Zustand, so dass diese keine weitere Protein bzw. Zytokinsynthese betreiben.

Anschließend folgte die Zentrifugation der Proben (Tabelle 17 und 18, Kapitel 8.2). Bei diesem Schritt setzen sich die intakten Lymphozyten ab und die lysierten Erythrozyten verbleiben im Überstand, der verworfen wurde.

Die hinzugegebene FACS-Permeabilising-Solution führt zu einer Permeabilisierung der Lymphozytenmembran, wodurch die fluoreszenzmarkierten Antikörper eindringen können. Um die Lymphozytenlösung von den noch enthaltenen Zellbestandteilen zu reinigen, wurde die Waschsubstanz „*phosphate buffered saline*“ (PBS) zugeführt. Die Proben wurden erneut zentrifugiert und der Überstand verworfen.

Die durch die anfängliche Stimulation produzierten und in der Zelle gebundenen Zytokine wurden durch Zytokinantikörper markiert. Ein letzter Waschvorgang mit PBS beendet die Aufbereitung des Vollblutes.

## **Messung und Analyse**

Messung und Analyse der Patientenproben (Kapitel 3.4.2 und 3.4.3).




### **3.3.2 Aufbereitung der Blutproben**

Dieser Arbeitsprozess gliedert sich in zwei Phasen, der Aktivierungs- und der Markierungsphase, welche durch eine achtstündige Inkubationszeit unterbrochen werden.

#### **➤ Aktivierung des Vollblutes**

Von dem heparinisierten Vollblut werden 5 ml entnommen und mit 5 ml der RPMI-Nährlösung verdünnt. Anschließend wird diese Vollblutlösung auf drei 50 ml Falcon-Röhrchen verteilt; den Falcon-Röhrchen werden die Reagenzien BFA, PMA und Ionomycin hinzugegeben (Tabelle 3).

**Tabelle 3:** Aktivierungsprozess der heparinisierten Vollblutproben

	<b>Vollblutlösung [ml]</b>	<b>BFA [µg]</b>	<b>PMA [µg]</b>	<b>Ionomycin [µg]</b>
 <b>Falcon-Röhrchen „stimuliert“</b>	2	40	20	40
 <b>Falcon-Röhrchen „unstimuliert“</b>	2	40	-	-
 <b>Falcon-Röhrchen „aktiviert“</b>	1	-	10	20

An den Messzeitpunkten 2 bis 5 (Tabelle 2) wird nur die Hälfte des Vollblutes und BFA für die unstimulierten Proben angesetzt. Nachfolgend werden die Proben vorsichtig mit dem Vortexer gemischt und acht Stunden im Brutschrank bei Dunkelheit und einer Temperatur von 37 °C und 7 % CO<sub>2</sub> inkubiert.

#### ➤ **Markierung mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern und Reinigung**

Nach der vorgegebenen Inkubationszeit werden die Proben aus dem Brutschrank entnommen und jeweils vorsichtig gemischt.

Es werden folgende Ansätze angefertigt:

- **Aktivierungskontrolle**  
Zur Überprüfung der erfolgreichen Stimulation der Zellen
- **Patientenproben**  
Zur Bestimmung der T-Lymphozyten
- **Permeabilitätskontrollen**  
Zur Überprüfung der erfolgreichen Zellwandpermeabilisierung
- **FACS-Kontrollen**  
Zur optimalen Einstellung des Fluoreszenzdurchflusszytometers

Die Arbeitsschritte der nun anschließenden Markierung werden in den Tabellen 17 und 18 (Kapitel 8.2) dargestellt. Die Verarbeitung der Aktivierungs-, Geräte- und Permeabilitätskontrollen sowie der Patientenproben erfolgt parallel.

### 3.4 Fluoreszenzdurchflusszytometer (FACS)

#### 3.4.1 Prinzip des Fluoreszenzdurchflusszytometers

Die Durchflusszytometrie stellt eine Methode zur Analyse von Zellsuspensionen auf Einzelzellniveau („*single cell analysis*“) dar. Die Messung des prozentualen Anteils und die Analyse der T-Lymphozyten, welche intrazelluläre Zytokine produzieren, erfolgten an einem FACSCalibur (Becton & Dickinson, Heidelberg). Das Fluoreszenzdurchflusszytometer (FACS, „*fluorescent activated cell sorter*“) (Abb. 1) ist ein optisches Messsystem, welches durch Streulicht- und Fluoreszenzsignale einzelne Partikel analysiert. Demzufolge ist eine quantitative Bestimmung einer großen Anzahl von Zellen innerhalb kurzer Zeit möglich. Durch fluoreszenzfarbstoffmarkierte Antikörper können bestimmte Eigenschaften der Zellen, zum Beispiel Oberflächenmoleküle oder intrazelluläre Proteine, mit Hilfe von physikalischen und biochemischen Parametern auf der Einzelzellebene analysiert werden. Eine Voraussetzung für die Messung und Analyse ist, dass die zu analysierende Probe in Form einer Einzelzellsuspension mit einer Konzentration von 0,5 bis 20 Millionen Zellen/ml Lösung vorliegt. In dieser Studie wurden die T-Lymphozyten bestimmt, welche die Zytokine TNF- $\alpha$ , IL-6, IFN- $\gamma$  und IL-4 produzieren.

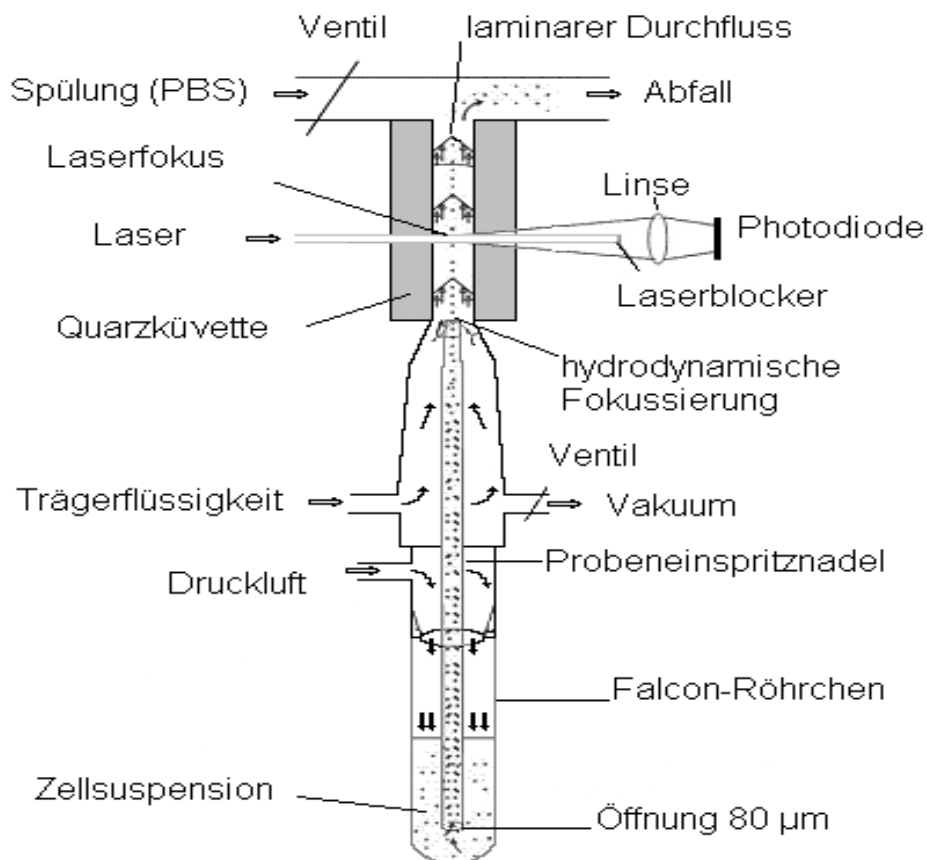
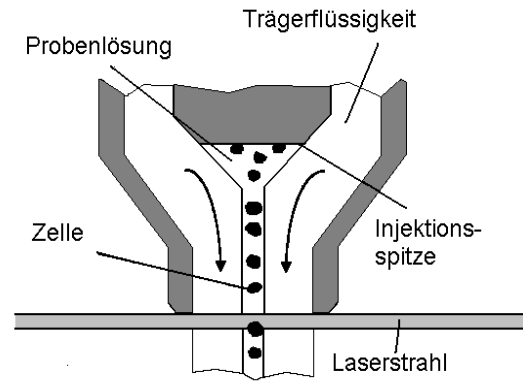


Abb. 1: Aufbau des Fluoreszenzdurchflusszytometers (modifiziert nach facslab.toxicologie)

### ➤ **Das Flüssigkeitssystem**

Durch das Injektorprinzip wird die Zelllösung in die Kapillare eingesaugt. Die in einer Leitung zugeführte partikelfreie Trägerflüssigkeit wird mit der zweiten Leitung, welche die Probenlösung enthält, zusammengeführt (Abb. 1 und 2). Die Zellen reihen sich perlenkettenartig, von einem laminaren Hüllstrom umgeben, auf. Gleichzeitig werden die Zellen beschleunigt. Der Effekt wird durch den abnehmenden Küvettendurchmesser hervorgerufen. Die Flussgeschwindigkeit wird von anfangs wenigen Zentimetern pro Sekunde auf ungefähr sieben Meter pro Sekunde erhöht. Durch diese Fokussierung ist gewährleistet, dass sich die T-Lymphozyten als Einzelzellen im Laserstrahl befinden und erfasst werden können (Abb. 2).



**Abb. 2:** Hydrodynamische Fokussierung  
(modifiziert nach Groettrup)

### ➤ **Das optische System**

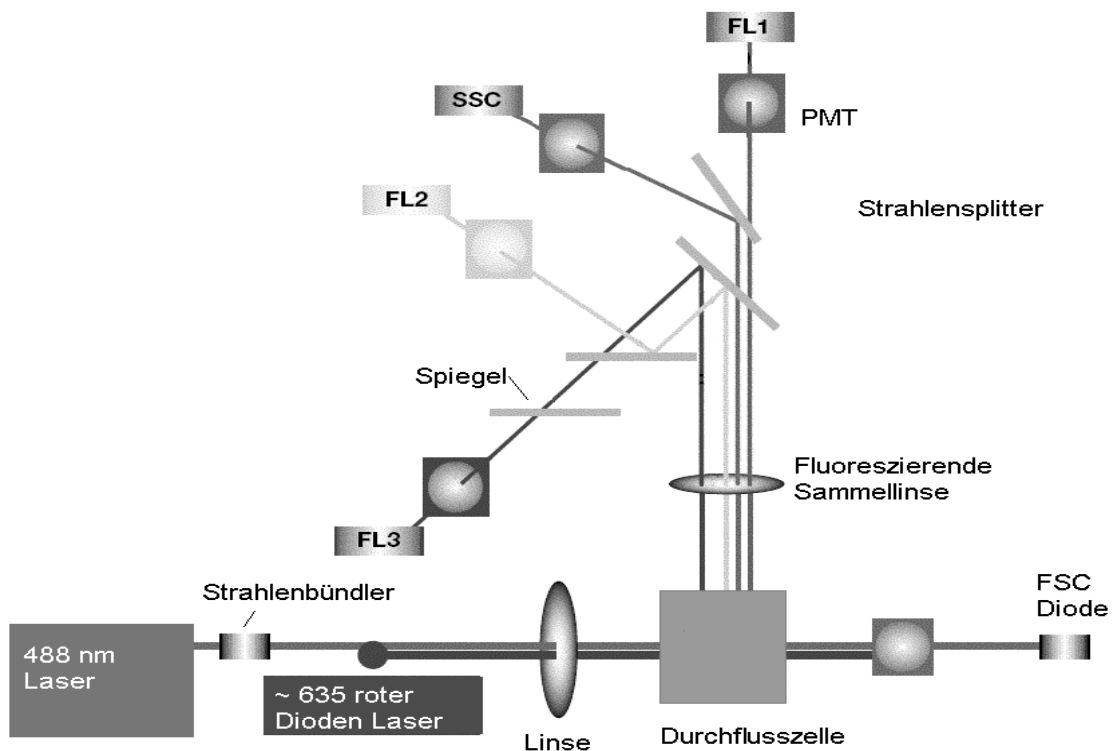
Das Durchflusszytometer verfügt über eine dreidimensionale, orthogonale, optische Geometrie, in welcher der Flüssigkeitsstrahl, die Beleuchtung, der Lichtstrahl und die mikroskopischen Achsen lotrecht zueinander stehen (Abb. 3).

#### **Anregungsteil**

- **Beleuchtungsoptik:** Diese besteht aus einem Argon-Ionen-Laser mit einer Wellenlänge von 488 nm. Dieser erfüllt die Kriterien einer hohen Intensität und konstanter Strahlungsleistung. Gleichfalls liegt die Wellenlänge der Fluorochrome im Absorptionsbereich des Lasers. Eine ideale Lichtquelle stellt der Laser aufgrund des monochromatischen Lichtes, der hohen Energiedichte und der kohärenten Eigenschaften dar.

#### **Detektionsteil**

- **Vordere streusammelnde Optik** (siehe FCS):  
Dieses Mikroskop, mit einer niedrigen numerischen Öffnung, sammelt das Streulicht, welches aus dem Flüssigkeitsstrom abgelenkt wird.
- **Fluoreszierende und seitliche streusammelnde Optik** (siehe SSC):  
Dieses zweite Mikroskop deckt den Flüssigkeitsstrom von der Seite, rechtwinklig zur vorderen, streusammelnden Optik ab.



**FITC** - Fluoreszein-Isothiocyanat, **FL**- Fluochrom, **FL1** - FITC, **FL2** –PE, **FL3** – PerCP  
**FSC**- Forwardscatter, **PerCP**- Peridin Chlorophyll Protein, **PE**- Phycoerythrin, **PMT**- Photo Multiplier Tube, **SSC**- Sidescatter

**Abb. 3:** Optische Anordnung des FACSCalibur (modifiziert nach facslab.toxilogie)

Der Laserstrahl mit einer Wellenlänge von 488 nm wird durch die Zelllösung geleitet. Trifft dieser auf eine Zelle, wird der Strahl in verschiedene Richtungen abgelenkt, je nach Beschaffenheit der Zelle. Diese Störung durch die Zelle wird auch als „Event“ bezeichnet. Das „Event“ wird durch eine Lichtverstärkungsrohre (PMT) mit Filter von einer Photodiode erfasst, welche die Intensitätsveränderung des Laserstrahls erkennt. Da das Streulicht in verschiedenen Winkeln reflektiert wird, benötigt man zur Erfassung mehrere Photodioden, welche die Lichtsignale in elektrische Signale umwandeln (Abb. 3). Zur Analyse steht eine große Summe von Einzelmessungen (über  $10^4$  Zellen/min) zur Verfügung. Es können nicht nur Lymphozyten, sondern auch neutrophile Granulozyten und Monozyten sowie deren Größe, Struktur und innere Beschaffenheit unterschieden werden.

- **Forwardscatter (FCS)**

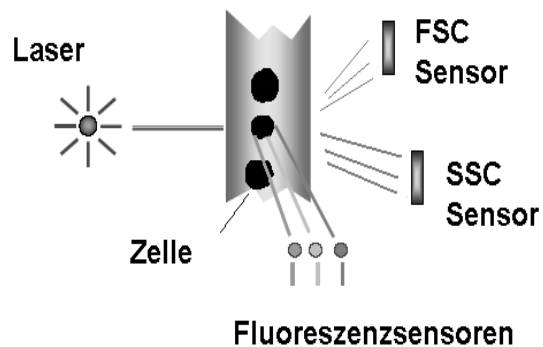
Das in einem kleinen Winkel (zwischen  $0,5^\circ$  und  $5^\circ$ ) vorwärts gestreute Licht („*forwardscatter*“) in Richtung des Laserstrahls korreliert mit der Größe der Zelle (Abb. 4).

- **Sidescatter (SSC)**

Bei einem größeren Winkel (zwischen  $15^\circ$  und  $150^\circ$ ) gibt das Seitstreulicht („*sidescatter*“) Auskunft über die innere Struktur der Zellen. Dieses wird rechtwinklig aus der Geradeausrichtung abgelenkt und wird als Granulität bezeichnet.

- **Emission der Fluorochrome (FL)**

Wenn der Laserstrahl auf die fluoreszenzmarkierte Zelle trifft, werden die Elektronen in der Markierung auf ein höheres energetisches Niveau gehoben. Unter Energieabgabe fallen diese auf das Ursprungsniveau zurück. Beim Rücksprung zum Grundniveau emittiert das Elektron ein Photon. Das dabei in verschiedenen Winkeln ausgesendete Fluoreszenzlicht hat eine längere Wellenlänge als das absorbierte Licht, da ein Teil der Energie als Wärme verloren geht. Dieser Effekt ist als „*stokes shift*“ bekannt. Die hier verwendeten Fluorochrome liegen im Exzitationsbereich des Lasers (Tabelle 4). Jedes Fluorochrom besitzt ein typisches Emissionsspektrum. Dadurch wird eine Mehrfarbenfluoreszenzanalyse mit bis zu sieben Parametern möglich, die das Anwendungsspektrum erhöhen. Da die Signale teilweise recht schwach sind, wird eine Signalverstärkung vorgenommen. Dies erfordert eine elektronische Schwelle („*Treshhold*“), die das Hintergrundrauschen, erzeugt durch Zelltrümmer und Debris, ausselektiert und nur den getriggerten Parameter erfasst. Technische Grenzen sind durch die spektrale Überlappung gesetzt. Eine spektrale Überlappung tritt dann auf, wenn es zur Überschneidung der Emissionsspektren der Fluoreszenzfarbstoffe kommt, falls mehrere Fluoreszenzfarbstoffe gleichzeitig verwendet und registriert werden. Die Korrektur erfolgt durch Subtraktion der sich überlappenden Fluoreszenzanteile, welches die Software korrigiert. Zusammen mit dem emittierten Licht des Fluoreszenzfarbstoffs und dem Streulicht, die in elektrische Signale umgewandelt werden, können diese Daten am Analysecomputer aufbereitet und dargestellt werden.



**Abb. 4:** Streulichtdarstellung (modifiziert nach Purdue University Cytometer Laboratories)

**Tabelle 4:** Absorptions- und Emissionsmaxima der verwendeten Fluoreszenzen

Fluorochrom \ Wellenlänge [nm]	Absorptionsmaximum	Emissionsmaximum
<b>Fluoreszein-Isothiocyanat (FITC)</b>	495	519
<b>Peridin Chlorophyll Protein (PerCP)</b>	490	675
<b>Phycoerythrin (PE)</b>	480; 565	578

### 3.4.2 Auswertung und Messung der Proben

Zur Analyse und Auswertung stand ein Macintosh Quadra 650<sup>®</sup> der Firma Apple zur Verfügung. Die Analysen wurden mit dem Software-Programm CellQuest<sup>™</sup> der Firma Becton & Dickinson vorgenommen. Bei jeder Probenmessung wurden 5000 T-Lymphozyten ausgewertet.

Jede erfasste Zelle wird im Streuhistogramm („Dot Plot“) als Punkt dargestellt. Hierdurch erhält man ganze Wolkenansammlungen, die sich in verschiedene Zelltypen aufteilen. Auf der Ordinate der Graphik wird der SSC, der Auskunft über die innere Beschaffenheit der Zelle gibt, eingetragen. Die Abszisse stellt den FSC dar und erfasst somit die Größe der Zelle (Abb. 6, oben rechts). Während der Messung werden nicht nur die T-Lymphozyten, sondern auch alle anderen Zellen erfasst. Es handelt sich dabei um B-Lymphozyten, Granulozyten, Monozyten sowie um Zelltrümmer. Die gesuchten Lymphozyten werden durch ein „Gate“ isoliert (Abb. 6) und alle anderen Zellen werden somit aus der Analyse herausgefiltert. Das Durchflusszytometer misst nicht den Zytokinspiegel, sondern ermittelt den prozentualen Anteil an T-Lymphozyten, die intrazellulär Zytokine produzieren.

Damit die T-Lymphozyten von den anderen Lymphozyten unterschieden werden können, wurden diese in der Aufbereitung mit dem Fluoreszenzfarbstoff Peridin Chlorophyll Protein (PerCP), der an den CD3-Antikörper gebunden war, markiert. Da nur die T-Lymphozyten das CD3-Oberflächenmolekül besitzen, können sie mit der Hilfe des PerCP-Farbstoffs in der Analyse getrennt von den B-Lymphozyten dargestellt werden (Abb. 6, oben links). Die PerCP-markierten T-Lymphozyten erscheinen nun neben den B-Lymphozyten als eigene Wolke und können mit einem „Gate“ markiert und anschließend ausgewertet werden.

Durch weitere Messungen von der Aktivierungs- und Permeabilitätskontrollen werden eine effektive Stimulation sowie Permeabilisation überprüft. Die Messung der Isotypen wird als Standard genommen, an denen sich alle anderen Proben der Messreihe anlehnen. Anschließend erfolgt die Messung der Patientenproben. In dieser Studie wurden die Zytokine TNF- $\alpha$ , IL-6, IFN- $\gamma$  und IL-4 untersucht.

Die Analyse der gewonnenen Daten erfolgt nach Abschluss der Messungen. Nach dem Aufrufen des Analysenverzeichnisses, in welchen die ermittelten Daten übertragen werden, erscheinen vier Dot Plots:

### **Erster Dot Plot**

Hier ist die Fluoreszenzintensität von CD3PerCP auf der Abszisse gegen den „*Sidescatter*“ aufgetragen. Die CD3<sup>+</sup>-T-Lymphozyten sind mit einem „*Gate*“ zu versehen. Somit werden die CD3<sup>-</sup>-Lymphozyten aus der weiteren Analyse entfernt (Abb. 6, oben links).

### **Zweiter Dot Plot**

Auf der Abszisse ist der FSC und auf der Ordinate der SSC dargestellt. Erneut wird die Lymphozytenwolke gegen die anderen Leukozyten mit einem „*Gate*“ abgegrenzt (Abb. 6, oben rechts).

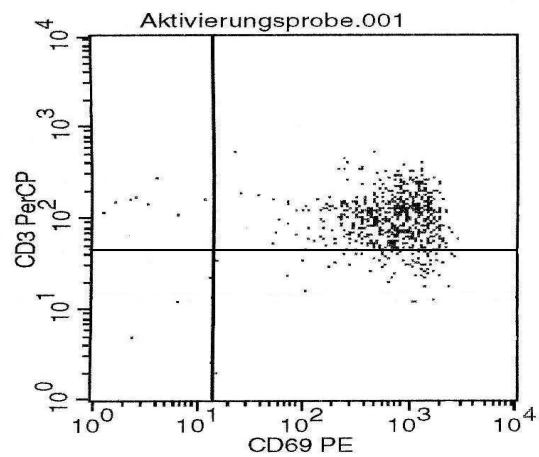
### **Dritter Dot Plot**

Auf der Abszisse ist die Fluoreszenzintensität von CD3PerCP aufgetragen. Dagegen wird die Fluoreszenzintensität des für jede Messung spezifischen PE-gebundenen Antikörpers auf der Ordinate aufgezeichnet. In diesen Dot Plot befindet sich ein verschiebbares Kreuz, welches vier Quadranten erzeugt.

In der linken Feldhälfte (Abb. 5) befinden sich CD3PerCP<sup>-</sup>-Zellen. Die CD3PerCP<sup>+</sup>-Zellen sind in der rechten Feldhälfte vorzufinden. Durch die Vorselektion in den davor abgehaltenen Mess- und Analyseschritten sind in der linken Feldhälfte keine Zellpunkte, also keine CD3<sup>-</sup>-Zellen, mehr zu finden. Im Beispiel für die Aktivierungsprobe stellt die obere Hälfte über der horizontalen Linie die Zellen dar, an die sich der jeweils für die Probe spezifische PE-markierte Antikörper gebunden hat.

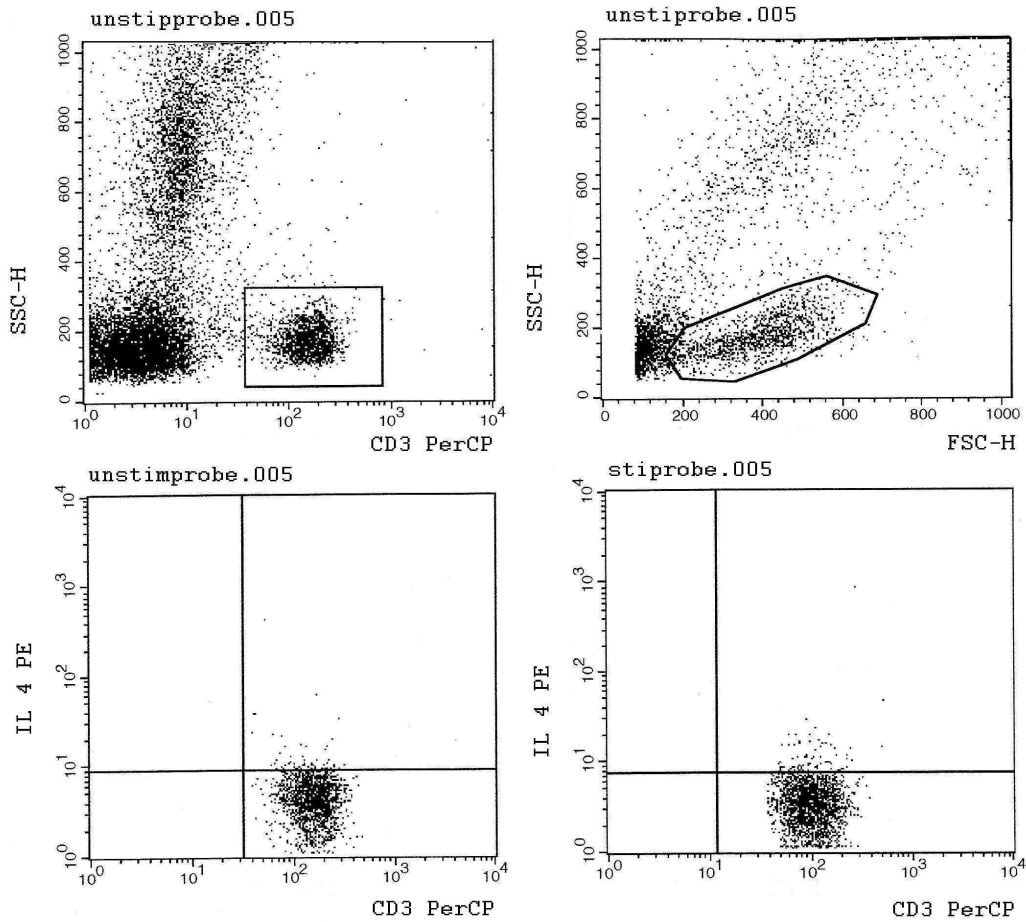
In der unteren Feldhälfte befinden sich entsprechend die Zellen, die negativ für diesen Antikörper sind. Die Anpassung des verschiebbaren Kreuzes sollte so erfolgt sein, dass die beiden Linien als ein optimal eingestellter Grenzwert für negative und positive Zel-

len zu bewerten sind. Bei der Aktivierungskontrolle befinden sich 90 % der CD69PE<sup>+</sup>-Zellen im Bereich „upper right“ (UR), so dass die Messreihe als korrekt stimuliert gewertet werden kann. Dies gilt auch für die stimulierte Permeabilitätskontrolle. In der Analyse der Proben stellt der UR-Wert den prozentualen Anteil an T-Lymphozyten dar, welche das markierte Zytokin produziert haben. Dieser Wert bildet das Endergebnis jeder einzelnen Messung.



**Abb. 5:** Aktivierungskontrolle

Die Abbildung 6 zeigt einen Ausdruck einer IL-4-Messung am dritten postoperativen Tag. Zu sehen sind drei Dot Plots mit einem weiteren Vierten, welcher eine zusätzliche Messung einer unstimulierten Probe aufzeigt. Auf der Abszisse ist die Fluoreszenzintensität von CD3PerCP und auf der Ordinate ist die Fluoreszenzintensität des IL-4 aufgetragen. Unter der graphischen Darstellung befindet sich die Auflistung der gemessenen Daten für beide unstimulierten und stimulierten Dot Plots. Für den Quadranten „upper right“ wurde für die unstimulierte Probe der Wert 3,98 % und für die stimulierte Probe 4,30 % ermittelt.



Acquisition Date: 16-Jan-3

Sample ID: unstimprobe

Quad	% Gated
UL	0.00
UR	3.98
LL	0.00
LR	96.02

Sample ID: stimprobe

Quad	% Gated
UL	0.00
UR	4.30
LL	0.00
LR	95.70

Page 1

**CD3 PerCP-** CD3 Peridin Chlorophyll Protein, **FSC-** Forwardscatter, **ID-** Identifikation, **LL-** Lower Left, **LR-** Lower Right, **Quad-** Quadranten, **stimprobe-** stimulierte Probe, **UL-** Upper Left, **UR-** Upper Right, **unstimprobe-** unstimulierte Probe, **SSC-** Sidescatter

Abb. 6: Analyse der Patientenprobe mit markierten IL-4

### 3.5 Fluoreszenz-Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie (F-HPLC)

Die hochauflösende Fluoreszenz-Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie (F-HPLC) ermöglicht die Bestimmung der Glutaminkonzentration im Blutplasma. Um eine längerfristige Aufbewahrung der Proben bis zur Derivatisierung zu ermöglichen, wurde eine Lyophilisierung der Plasmaproben durchgeführt (Gefriertrocknung unter Hochvakuum bei  $-80^{\circ}\text{C}$ , CIT-2<sup>®</sup>, Heraeus, Hanau).

#### 3.5.1 Prinzip der F-HPLC

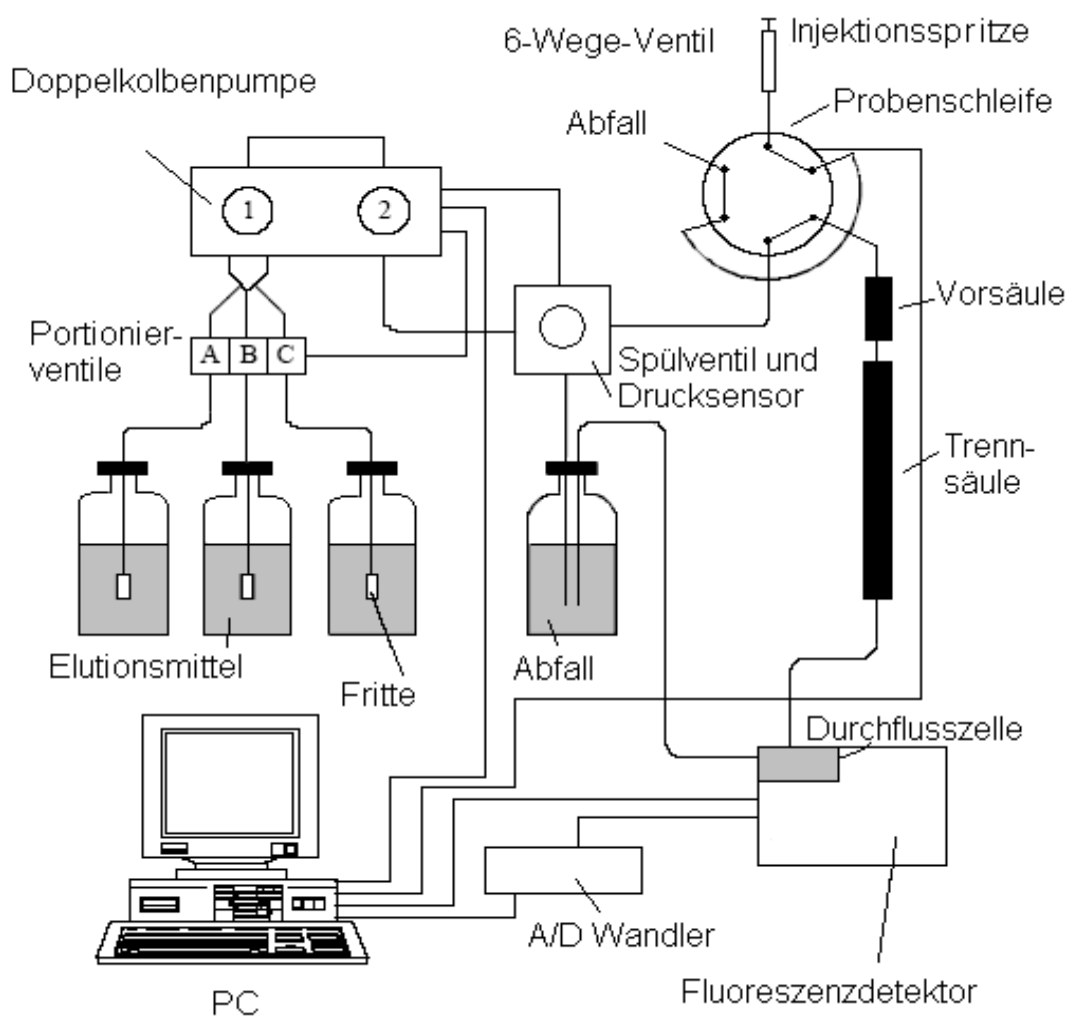
Die Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC, „*high performance liquid chromatography*“) oder die Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC, „*high pressure liquid chromatography*“) ist eine Methode der Flüssigkeits-Chromatographie, bei der die Trennung des zu untersuchenden Materials unter hohem Druck (bis 300 bar bei einem Fluss von typischerweise 1 ml/min) abläuft. Einmal kann eine Unterscheidung nach der verwendeten stationären und mobilen Phase getroffen werden. Eine andere Möglichkeit ist der Trennmechanismus, der eine Unterteilung in die verschiedenen flüssigkeitschromatographischen Trennverfahren zulässt.

Die Verwendung von stationären Phasen mit geringem Teilchendurchmesser mit ca. 3 bis 10  $\mu\text{m}$ , ist für die HPLC charakteristisch. In der mobilen Phase wird ein hoher Widerstand entgegengesetzt, so dass je nach Viskosität Drücke bis zu 350 bar notwendig sind, um zu ausreichenden Flussraten zu gelangen. Für die Hochleistungstrennungen sind sehr kleine Packungsteilchen notwendig, da die Trennleistung von flüssigchromatographischen Säulen mit geringer werdenden Teilchendurchmesser des Packungsmaterials zunimmt.

#### ✦ Aufbau eines F-HPLC

Hauptbestandteil des F-HPLC ist die Trennsäule (Abb. 7), die von einer Vorsäule vor Verschmutzungen geschützt wird. Die meisten HPLC-Säulen bestehen aus austenitischem Chrom-Nickel-Molybdän-Stahl, der druck- und korrosionsbeständig ist. Zur Förderung des Elutionsmittels kommen am häufigsten zeitversetzte Doppelkolbenpumpen zum Einsatz. In Verbindung mit einer Mikroprozessorsteuerung des Schrittmotors wird eine beinahe vollkommene Pulsationsdämpfung erreicht. Die Fließgeschwindigkeit der mobilen Phase ist daher relativ konstant und lässt sich im Bereich von 0,1 bis 10 ml/min variieren. Die Probenzuführung passiert unter der Verwendung von 6-Wege-Ventilen.

Anschließend wird durch das Umschalten in die inject-Position die Probe in das Trennsystem injiziert und dann wird das Elutionsmittel durch die Probenschleife gepumpt. Das Eluentenmittel wird bei allen HPLC-Detektoren durch eine Durchflusszelle geleitet. Dort wird die Änderung einer physikalischen oder chemischen Eigenschaft der Probensubstanzen gemessen. Der übliche Detektor für die F-HPLC ist der Fluoreszenzdetektor. Dieser liefert eine quantitative bzw. qualitative Information über die Probe. Eine einfache Möglichkeit zur Auswertung, Bearbeitung, Speicherung und Ausgabe von Chromatogrammen bietet die Onlinedatenerfassung durch eine spezielle HPLC-Software. Diese erfolgt zumeist unter der Verwendung eines Zwischendetektors mit einem A/D-Wandlers, welcher an einen Computer angeschlossen ist. Zwischen Pumpe und Injektionssystem ist üblicherweise ein Spülventil angeordnet, das für einen raschen Eluentenwechsel sorgt.



**Abb. 7:** Funktionsschema eines F-HPLC (modifiziert nach Zinn-Ruhr-Uni-Bochum)

### ✦ **Stationäre Phase**

Es existiert eine Vielzahl von stationären Phasen, so dass ein gegebenes Packungsmaterial an seiner Oberfläche modifiziert und dadurch chemisch gezielt verändert werden kann. Nahezu 80 % aller HPLC-Trennungen im „*reversed phase*“-Modus werden auf chemisch gebundenen stationären Phasen durchgeführt. Von „*reversed phase*“-Chromatographie (RPC) wird immer dann gesprochen, wenn die stationäre Phase weniger polar als die mobile Phase ist. Die chemisch gebundene Phase wird als stationäre Phase bezeichnet. Meist findet man chemisch modifizierte Kieselgele, welche eine hydrophobe funktionelle Gruppe tragen. Bedeutend sind zwei verschiedene Retentionsmechanismen:

- **Adsorptionsmechanismus:** An den unpolaren Anteile der stationären Phase wird die Probe adsorbiert.
- **Verteilungsmechanismus:** Die Proben werden zwischen der hydrophoben, stationären Phase und der polaren, mobilen Phase verteilt.

### ✦ **Mobile Phase**

Als mobile Phase in der RPC werden Gemische aus dem polaren Lösungsmittel Wasser und einem unpolaren, organischen, wasserlöslichen Lösungsmittel verwendet. Zu diesen gehören Modifier wie: Methanol, Ethanol, n-Propanol, Acetonitril, und Tetrahydrofuran. Außer den isokratischen Trennungen (konstante Eluentenzusammensetzung während der Trennung) werden in der RPC oft Gradiententrennungen durchgeführt. Bei diesen wird die Elutionskraft der mobilen Phase während der Trennung erhöht. Zwei oder mehr geeignete Eluenten werden mit Hilfe des Gradientensystemens so gemischt, dass sich die Konzentration des organischen Zusatzes erhöht. Hierdurch werden annehmbare Analysezeiten erreicht. Zur Konstanthaltung des pH-Wertes der mobilen Phase werden in der RPC sehr oft Phosphat- oder Acetat-Puffer eingesetzt.

In manchen Fällen eignet sich der Einsatz von ternären Lösungsmittelgemischen um eine Optimierung der Trennbedingungen zu erreichen.

### **3.5.2 Automatisierte Vorsäulenderivatisierung**

Vor der Vorsäulenderivatisierung wurden die lyophilisierten Proben manuell durch Aufpipettieren von 280 µl Standardextraktionspuffer gelöst und dadurch in einen methanolischen Extrakt überführt.

Der Standardextraktionspuffer besteht aus einem Gemisch (zu 80 % „Methanol für die HPLC“ und 20 % „H<sub>2</sub>O für die HPLC“). Dieses beinhaltet zusätzlich zur internen Standardisierung der Analytik das in physiologischen Aminosäurengemischen nicht vorkommende Homoserin (Konzentration von 4 µg/ml). Der Standardextraktionspuffer ermöglicht die kurzfristige Lagerungsfähigkeit der resuspendierten Aminosäure-lyophilisate bis zur anschließenden automatisierten Vorsäulenderivatisierung. Nach der Zentrifugation werden 200 µl des Extrakts in ein spezielles Probengefäß gebracht und hinterher automatisch mit 0,5 M Boratpuffer auf einen pH = 9,5 gepuffert. Danach wird das o-Phtaldialdehyd-Mercaptoethanol-Reagenz (OPA-Thiol-Reagenz) zur Fluoreszenzmarkierung der Aminosäuren zugesetzt.

Die Derivatisierung wird nach exakt 120 Sekunden durch Neutralisierung mittels 0,75 N HCl gestoppt. Dadurch wird die Stabilität der fluoreszenzmarkierten Aminosäuren im alkalischen Medium gewährleistet. Dieser Ansatz wird weiterhin mit dem Elutionspuffer A 1:4 verdünnt und 50 µl dieser Lösung in das System injiziert [108].

### **3.5.3 Gradientenelution**

Nach sorgfältiger Äquilibration der Analytik über vier Stunden, erfolgt der Prozess der Gradientenelution. Zur Verwendung kommt ein binäres Eluentensystem mit Methanol-Acetat-Puffern. Die Elutionspuffer werden in das F-HPLC-System mit einer Flussrate nach der in Tabelle 16 (Kapitel 8.1.5) beschriebenen Mischungsverhältnissen eingespeist. Die von der Gradientenpumpe erzeugte Flussrate beträgt 1 ml/min. Der aufgrund dieser Flussrate im System entstehenden Arbeitsdruck beträgt je nach Puffermischungsverhältnis zwischen 2900 und 3500 PSI (200-241 bar).

Die zur Fluoreszenzdetektion der Aminosäuren verwendete Anregungswellenlänge liegt bei 330 nm und die Emissionswellenlänge bei 450 nm.

### **3.5.4 Qualitätskontrolle der plasmatischen Glutaminmessung**

Die Überwachung der Analytik erfolgt ununterbrochen mittels externen sowie internen Standardisierungsverfahren. Auf diese Weise werden die Reproduzierbarkeit und die Qualität der Messergebnisse im Rahmen der F-HPLC Quantifizierung der Aminosäuren gewährleistet. Die Variationskoeffizienten für die Reproduzierbarkeit der Methodik (Variationskoeffizienten der Flächen) betragen bei Reihenanalysen von Standardamino-säurenproben im Durchschnitt gewöhnlich zwischen 0,86 % und 2,34 %. Bei den „Tag-zu-Tag“-Analysen lag diese zwischen 1,88 % und 4,69 %. Bei den Reihenanalysen lag

die Reproduzierbarkeit der Retentionszeiten im Mittel zwischen 0,02 % und 0,23 % und die „Tag-zu-Tag“-Analysen zwischen 0,04 % und 0,72 %. Wie die Ergebnisse der Reihen- aber auch der „Tag-zu-Tag“-Untersuchungen zeigten, gewährleistet der verwendete Standardextraktionspuffer (80 % zu 20 % Methanol-H<sub>2</sub>O-Gemisch) die kurzfristige Lagerfähigkeit. Es kam nach der Resuspendierung der lyophilisierten Standardaminosäurenproben zu keiner weiteren chemischen Umwandlung und auch zu keinem Verlust der Fluoreszenzaktivität. Bei den Aminosäurenstandardproben und den Plasmaproben für die untersuchten Aminosäuren betrug die Wiederfindungsrate 100 %.

### **3.6 Routinelaborparameter**

Die Routinelaborparameter wurden für alle Patienten im Zentrallabor des Instituts für Klinische Chemie und Pathobiochemie der Universitätsklinik Gießen und Marburg, Standort Gießen unter der Leitung von Prof. Dr. med. N. Katz erfasst. Die mikrobiologischen Untersuchungen erfolgten im Institut für Medizinische Mikrobiologie der Universitätsklinik Gießen unter der Leitung von Prof. Dr. med. T. Chakraborty. Das mikrobiologische Monitoring der Patienten umfasste den Nachweis von grampositiven und gramnegativen Bakterien, von Pilzspezies und den Nachweis von atypischen Erregern aus aeroben und anaeroben Abstrichen wie auch aus Blutproben. Alle weiteren aufgeführten Laborparameter wurden an Laborarbeitsplätzen der Klinik für Anästhesiologie, Intensivmedizin und Schmerztherapie des Universitätsklinikums Gießen und Marburg GmbH, Standort Gießen bestimmt.

### **3.7 Statistische Berechnungen**

#### **➤ Randomisation**

Die Patienten wurden in drei Behandlungsgruppen in einer zufälligen Zuordnung im Verhältnis  $X_1:X_2:X_3$  eingeordnet. Die Randomisation wurde nach einem vorher erstellten Randomisationsplan durchgeführt. Einen nicht in die Studie involvierten Arzt lagen dazu durchnummerierte Umschläge vor. Diese ethielten die Zuordnung zu dem entsprechenden Therapiearm. In der Reihenfolge wie die Patienten in die Studie aufgenommen wurden, wie diese die Einschlusskriterien erfüllten oder nicht, wurden die Umschläge geöffnet.

### ✦ **Schätzung des Stichprobenumfangs der klinischen Untersuchung**

Zur Ablehnung der Null-Hypothese für beide Hauptzielparameter muss der Stichprobenumfang der Schätzung für TNF- $\alpha$ -Produktion das Maximum betragen. Für die Betrachtung des Stichprobenumfangs wird von folgenden Konstellationen ausgegangen: Bei der „TNF- $\alpha$  Produktion“ geht man von einer relevanten Differenz von 9 % aus. Bei einer beobachteten Standardabweichung der Synthese von 10 %, einem  $\alpha$  von 0,05 und einer Power von 0,8 ergab sich daraus ein Stichprobenumfang von  $n=20$  pro Gruppe. In der Untersuchung zur Immunnutrition bei herzchirurgischen Patienten von Tepaske et al. wurde in der Kontrollgruppe eine Infektionsrate von 54 % und in der Behandlungsgruppe eine von 17 % festgestellt. Es ist anzunehmen, dass bei einer Infektionsrate von 20 % eine Differenz von 15 % durch die Behandlung auftritt. Daraus lässt sich ein Stichprobenumfang von  $n=21$  pro Gruppe ableiten.

### ✦ **Statistische Verfahren**

Durch das arithmetische Mittel und die Standardabweichung erfolgte die deskriptive Darstellung der Ergebnisse tabellarisch. Als weitere Lage- und Streuungsmaße wurden der Median (50 %-Quartil) und der Stichprobenumfang bestimmt. Mit dem Shapiro-Wilk-Test wurden die Daten auf Normalverteilung überprüft. Der Gruppenvergleich erfolgte mit einer Varianzanalyse und dem Scheffé-Test als multiplem Anschlussstest oder dem Chi<sup>2</sup>-Test. Fragestellungen zum zeitlichen Verlauf wurden mit einer Varianzanalyse für Messwiederholungen („*repeated measures analysis*“) analysiert. Im Anschluss wurden multiple Vergleiche zum vorhergehenden Messzeitpunkt durchgeführt. Das Signifikanzniveau, das auf 0,05 festgelegt war, wurde dabei nach Bonferroni korrigiert. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm SPSS für Windows Version 11.0.1 durch das Statistikbüro Mogk & Partner, Gießen.

## 4. Ergebnisse

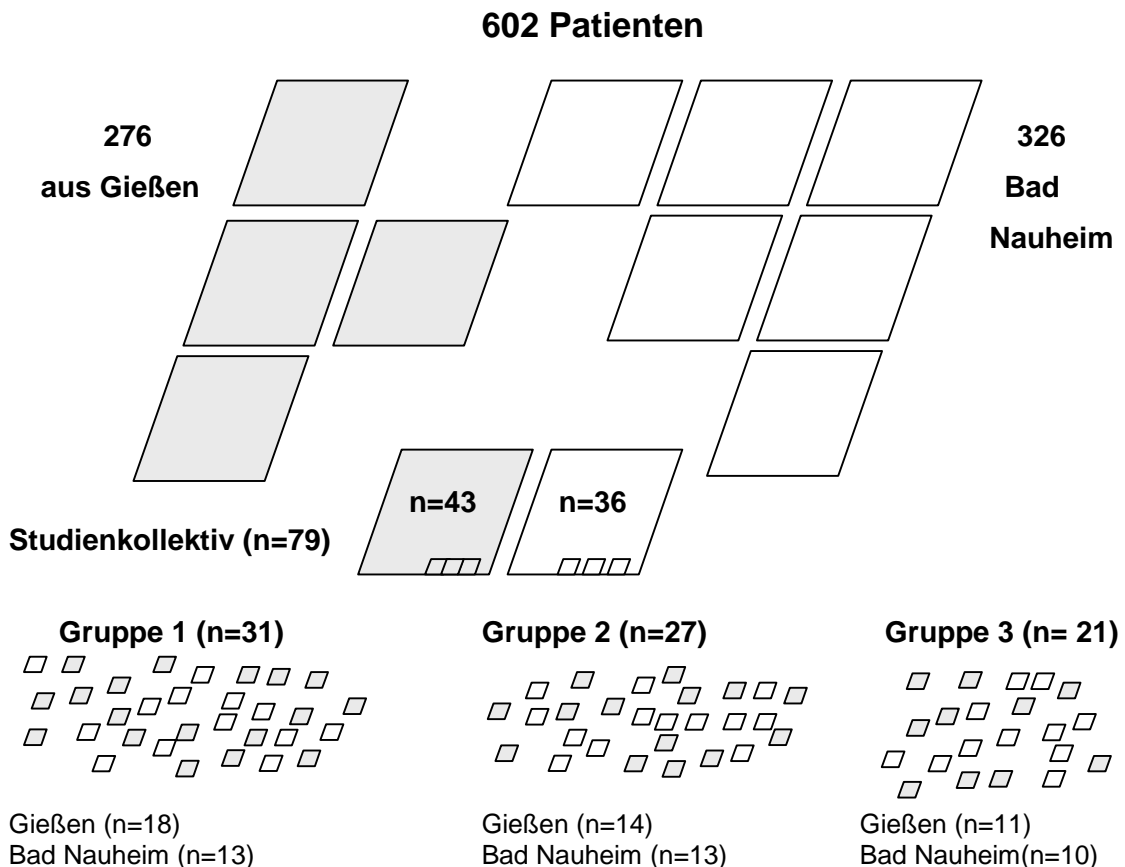
### 4.1 Patientenkollektiv, Neben- und Begleitkriterien

#### 4.1.1 Patientenkollektiv- und Operationencharakteristika

##### ✦ Patientencharakteristika

Für diese Studie im Jahr 2003 wurden Patienten aus der Klinik für Herz-, Kinderherz- und Gefäßchirurgie des Universitätsklinikums Gießen - Marburg und aus der Herzchirurgie der Kerckhoff-Klinik Bad Nauheim einem „*Screening*“ unterzogen. Die gesuchten Patienten entsprachen den Kriterien aus Kapitel 3. Schließlich wurden aus 602 Patienten 79 Personen selektiert, bei denen das Kriterium Lymphozytenzahl unter 1,2 Giga/l zutraf. Von diesen aufgenommenen lymphopenen Patienten kamen 43 aus Gießen und 36 aus Bad Nauheim. In dieser prospektiven, randomisierten und doppelt verblindeten Studie wurde das Patientenkollektiv in drei Untersuchungsarme unterteilt (Abb. 8).

- **Gruppe 1:** glutaminhaltige Dipeptaminlösung mit 31 Patienten
- **Gruppe 2:** glutaminfreie Aminosäurelösung mit 27 Patienten
- **Gruppe 3:** aminosäurefreie NaCl-Lösung mit 21 Patienten



**Abb. 8:** Untersuchungsprofil des Patientenkollektivs

Zwischen den einzelnen Gruppen Gießen und Bad Nauheim besteht kein Unterschied in den einzelnen Patientencharakteristika (Tabelle 5). Die Einteilung der Tabelle erfolgte nach Gruppen sowie den durchschnittlichen Werten für Alter in Jahren, Geschlecht, BMI (Body mass Index) in Kilogramm pro Quadratmeter, ASA (Score der „*American Society of Anesthesiologists*“), EF (Ejektionsfraktion) in Prozent, LVEDP (linksventrikulärer enddiastolischer Druck) in mmHg und der Anzahl von präoperativen Myokardinfarkten pro Patient. Ebenfalls sind in der Darstellung der Untersuchungsarme keine Unterschiede in den Patientencharakteristika erkennbar (Tabelle 6).

### ➤ **Operationscharakteristika**

In dieser Studie wurden während der Operationen verschiedene Parameter bestimmt (Tabelle 7). Dazu gehören die durchgeführten Operationsverfahren und auch die Art der Kardioplegie. Weiterhin wurden folgende Zeitwerte in Minuten erfasst: Operationsdauer mit den Zwischenschritten, extrakorporale Perfusions- und Ischämiezeit.

Für folgende Parameter, welche die untersuchten Herz-Kreislauf-Parameter darstellen, konnten keine Unterschiede festgestellt werden: den Cardiac Index (CI, Pumpleistung des Herzens in Liter pro Minute pro Quadratmeter) vor und nach der extrakorporalen Zirkulation, den systemischen Gefäßwiderstand [ $\text{dyn}/\text{sec}/\text{cm}^5$ ] vor und nach der EKZ und die EKZ Bilanz in Milliliter.

Zusätzlich wurden ermittelt: die minimal erreichte Körperkerntemperatur in Grad Celsius, der maximale Blutzuckerspiegel und der Blutlaktatwert in Millimol pro Liter unter der extrakorporalen Zirkulation. Des Weiteren wurde die Anzahl von Erythrozytenkonzentraten und Frischplasmen, kristalloide und kolloide Infusionslösung in Milliliter, Insulineinheiten, Aprotinin in Millionen Einheiten und Katecholamine (Adrenalin, Noradrenalin, Dopamin, Milrinone in Mikrogramm), die im Durchschnitt pro Patientengruppe verabreicht wurden, festgehalten. Weiterhin konnten keine Hyperglykämien oder ein erhöhter Insulinbedarf beobachtet werden.

**Tabelle 5:** Patientencharakteristika nach einzelnen Untersuchungsorten

Patientencharakteristika		Gießen n=43	Bad Nauheim n=36	p-Wert
Patientenalter [Jahre]		70,6 ± 8,6	68,4 ± 7,3	p = 0,229
Geschlecht	männlich	27	26	p = 0,615
	weiblich	16	10	p = 0,509
Body mass Index [kg/m <sup>2</sup> ]		27,0 ± 4,1	26,1 ± 2,9	p = 0,272
ASA		3,1 ± 0,3	3,0 ± 0,2	p = 0,092
EF [%]		55,7 ± 7,2	59,2 ± 9,8	p = 0,082
LVEDP [mm Hg]		17,8 ± 9,4	15 ± 8,3	p = 0,168
Anzahl präoperativer Myokardinfakte pro Patient		0,35 ± 0,52	0,31 ± 0,46	p = 0,721

ASA (Score der American Society of Anesthesiologists),  
EF (Ejektionsfraktion), LVEDP (Linksventrikulärer enddiastolischer Druck)

**Tabelle 6:** Patientencharakteristika nach Untersuchungsarmen

Patientencharakteristika		Glutamin n=31	Aminosäuren n=27	Kontrolle n=21	p-Wert
Patientenalter [Jahre]		71,3 ± 7,4	68,3 ± 9,3	68,7 ± 7,6	p = 0,323
Geschlecht	männlich	21	15	17	p = 0,488
	weiblich	10	12	4	p = 0,509
Body mass Index [kg/m <sup>2</sup> ]		26,4 ± 3,2	26,2 ± 3,5	27,1 ± 4,3	p = 0,676
ASA		3,1 ± 0,2	3,0 ± 0,2	3,0 ± 0,2	p = 0,101
EF [%]		57,4 ± 11,8	59,5 ± 11,6	53,4 ± 17,3	p = 0,295
LVEDP [mm Hg]		17,6 ± 10,2	16,6 ± 7,8	12,6 ± 8,2	p = 0,132
Anzahl präoperativer Myokardinfakte pro Patient		0,32 ± 0,48	0,33 ± 0,55	0,33 ± 0,48	p = 0,999

ASA (Score der American Society of Anesthesiologists),  
EF (Ejektionsfraktion), LVEDP (Linksventrikulärer enddiastolischer Druck)

**Tabelle 7:** Operationscharakteristika

Operationscharakteristika		Glutamin n=31	Aminosäuren n=27	Kontrolle n=21	p-Wert
Operationszeit [min]		213 ± 67	222 ± 70	229 ± 67	p = 0,795
Extrakorporale Perfusionszeit [min]		104 ± 42	113 ± 46	120 ± 41	p = 0,414
Kardiale Ischämiezeit [min]		68 ± 23	71 ± 30	72 ± 28	p = 0,851
Art der Operation					
	ACB [n]	15	13	15	p = 0,996
	AKE [n]	8	5	2	p = 0,173
	MKE [n]	0	1	0	p = 0,991
	ACB + AKE [n]	5	4	4	p = 0,996
	ACB + MKE [n]	3	2	0	p = 0,263
	AKE + MKE [n]	0	2	0	p = 0,497
Art der Kardioplegie					
	Brettschneider [n]	16	9	7	p = 0,258
	Blutkardioplegie [n]	8	10	4	p = 0,213
	Calafiore [n]	7	8	10	p = 0,081
EKZ-Bilanz [ml]		984 ± 1067	950 ± 1119	1302 ± 970	p = 0,466
CI vor EKZ [l/min/m <sup>2</sup> ]		1,7 ± 0,4	1,9 ± 0,5	1,9 ± 0,5	p = 0,179
CI nach EKZ [l/min/m <sup>2</sup> ]		2,7 ± 0,9	2,7 ± 0,3	2,6 ± 0,6	p = 0,841
SVR vor EKZ [dyn/sec/cm <sup>5</sup> ]		1729 ± 960	1526 ± 607	1529 ± 435	p = 0,494
SVR nach EKZ [dyn/sec/cm <sup>5</sup> ]		1014 ± 343	1081 ± 422	1067 ± 335	p = 0,769
Minimale Temperatur unter EKZ [°C]		31,5 ± 2,2	31,9 ± 2,0	31,3 ± 2,4	p = 0,620
Blutzucker [Maximalwert] [mmol/l]		8,8 ± 2,7	9,5 ± 3,3	8,1 ± 2,7	p = 0,261
Laktat [Maximalwert] [mmol/l]		2,2 ± 1,1	2,3 ± 1,3	1,7 ± 0,5	p = 0,127
Insulin [I.E.]		0,6 ± 2,4	2,3 ± 6	2,7 ± 5,3	p = 0,219
EK [n]		1,6 ± 1,8	1,7 ± 2,3	1,2 ± 1,7	p = 0,659
FFP [n]		0,6 ± 1,2	0,8 ± 1,7	0,4 ± 1,1	p = 0,604
Aprotinin [Mio E.]		0,9 ± 0,9	0,8 ± 0,8	1,0 ± 1,0	p = 0,744
Kristalloide [ml]		1758 ± 693	1685 ± 574	2109 ± 887	p = 0,105
Kolloide [ml]		387 ± 264	350 ± 268	435 ± 265	p = 0,548
Katecholamine					
	Adrenalin [µg]	41 ± 135	30 ± 77	58 ± 229	p = 0,817
	Noradrenalin [µg]	69 ± 159	33 ± 91	86 ± 324	p = 0,640
	Dopamin [µg]	2282 ± 4407	3249 ± 3813	3078 ± 3639	p = 0,623
	Milrinone [µg]	467 ± 1404	600 ± 1603	1001 ± 3286	p = 0,205

ACB (Aortokoronarer Bypass), AKE (Aortenklappenersatz), MKE (Mitralklappenersatz), CI ("Cardiac Index"), EKZ (Extrakorporale Zirkulation), SVR (Systemischer Gefäßwiderstand), EK (Erythrozytenkonzentrat), FFP ("Fresh Frozen Plasma"), TK (Thrombozytenkonzentrat)

#### 4.1.2 Klinische Parameter

Die Messung der klinischen Parameter erfolgte präoperativ und postoperativ sowie am ersten, zweiten und dritten postoperativen Tag. Die Anordnung (Tabelle 8) ist nach den einzelnen Gruppen aufgelistet und beinhaltet den arithmetischen Mittelwert und die dazugehörige Standardabweichung der einzelnen ermittelten Werte.

Folgende klinische Parameter unterscheiden sich nicht in den einzelnen Gruppen:

- CRP-Spiegel [Milligramm pro Liter]
- Anzahl, Menge in Milligramm und die Dauer in Stunden der eingesetzten Katecholamine
- Beatmungsdauer [Stunden]
- Auftreten neurologischer Komplikationen [n]
- Nierenfunktion, bestimmt über Serumkreatinin und Serumharnstoff [Milligramm pro Deziliter]
- Gabe des Diuretikums [Milligramm]
- Leberzellschädigung ermittelt über GOT und GPT [Units pro Liter]
- „*Sepsis-related Organ Failure Assessment*“-Score (SOFA) wurde von Experten der „*European Society for Intensive Care Medicine*“ (ESICM) festgelegt und dient der objektiven Beschreibung der Organdysfunktion. Dieser Score setzt sich aus der Summe der Wertung von sechs Organsystemen zusammen, wobei jedes Organ nach funktionellem Zustand mit Punkten von null bis vier beurteilt wird.

**Tabelle 8:** Erhobene Parameter

		Glutamin n=31	Aminosäuren n=27	Kontrolle n=21	p-Wert
CRP [mg/l]	präoperativ	12 ± 15	13 ± 22	16 ± 21	p = 0,287
	postoperativ	10 ± 15	15 ± 25	8 ± 9	p = 0,372
	PoT 1	78 ± 38	93 ± 52	92 ± 32	p = 0,326
	PoT 2	92 ± 82	107 ± 107	94 ± 88	p = 0,810
	PoT 3	114 ± 85	129 ± 118	136 ± 97	p = 0,717
Katecholamine (kumuliert)					
Applikationsdauer [Stunden]		11,7 (0-68)	11 (0-79)	14,2 (0-78)	p = 0,802
Adrenalin [µg]		62 (0-801)	31 (0-295)	63 (0-1129)	p = 0,768
Noradrenalin [µg]		73 (0-917)	46 (0-512)	89 (0-1536)	p = 0,765
Dopamin [mg]		13,2 (0-116)	16,4 (0-57)	9,5 (0-24)	p = 0,481
Dobutamin [mg]		0,61 (0-8,44)	0,62 (0-15,1)	0,09 (0-1,00)	p = 0,635
Milrinone [mg]		10 (0-83)	7 (0-90)	25 (0-226)	p = 0,157
"Assist Device" [Tage]		0,1 (0-4)	0	0,4 (0-3)	p = 0,184
Postoperative Beatmung [Stunden]		12 (3-57)	12 (5-79)	11 (2-78)	p = 0,971
Neurologie [Tage]		1,4 (0-4)	0,8 (0-4)	1 (0-4)	p = 0,145
Kreatinin [mg/dl]					
	präoperativ	1,1 ± 0,3	1,1 ± 0,4	1,0 ± 0,2	p = 0,469
	postoperativ	1,0 ± 0,3	1,1 ± 0,4	1,1 ± 0,3	p = 0,441
	PoT 1	1,0 ± 0,2	1,0 ± 0,3	1,0 ± 0,3	p = 0,999
	PoT 2	1,1 ± 0,3	1,2 ± 0,8	1,2 ± 0,4	p = 0,264
	PoT 3	1,2 ± 0,4	1,4 ± 1,0	1,2 ± 0,6	p = 0,252
Harnstoff [mg/dl]					
	präoperativ	43 ± 16	52 ± 25	42 ± 8	p = 0,098
	postoperativ	49 ± 13	53 ± 18	45 ± 9	p = 0,154
	PoT 1	58 ± 18	54 ± 24	48 ± 9	p = 0,171
	PoT 2	71 ± 24	66 ± 30	59 ± 21	p = 0,256
	PoT 3	70 ± 26	83 ± 43	63 ± 21	p = 0,089
Furosemid (kumuliert) [mg]		25 (0-100)	63 (0-720)	48 (0-375)	p = 0,278
GOT [U/l]					
	präoperativ	24 ± 14	27 ± 16	24 ± 14	p = 0,629
	postoperativ	42 ± 24	44 ± 22	34 ± 13	p = 0,236
	PoT 1	56 ± 32	69 ± 57	45 ± 30	p = 0,146
	PoT 2	38 ± 18	46 ± 31	31 ± 18	p = 0,089
	PoT 3	37 ± 19	39 ± 19	34 ± 20	p = 0,676
GPT [U/l]					
	präoperativ	26 ± 21	31 ± 27	32 ± 28	p = 0,638
	postoperativ	—	—	—	
	PoT 1	35 ± 15	36 ± 29	30 ± 12	p = 0,566
	PoT 2	24 ± 14	30 ± 28	25 ± 19	p = 0,527
	PoT 3	29 ± 19	35 ± 28	26 ± 20	p = 0,371
SOFA-Score					
	präoperativ	0,2 ± 0,2	0,2 ± 0,2	0,2 ± 0,2	p = 0,999
	postoperativ	6,8 ± 3,4	6,9 ± 3,1	7,9 ± 3,1	p = 0,439
	PoT 1	3,5 ± 1,9	3,5 ± 1,8	4,0 ± 2,5	p = 0,632
	PoT 2	2,5 ± 1,8	2,5 ± 2,1	2,8 ± 2,5	p = 0,855
	PoT 3	1,9 ± 1,7	2,0 ± 2,0	2,0 ± 2,0	p = 0,973

PoT (Postoperativer Tag), CRP (C-reaktives Protein), GOT (Glutamat-Oxalacetat-Transaminase), GPT (Glutamat-Pyruvat-Transaminase), SOFA ("Sequential Organ Failure Assessment")

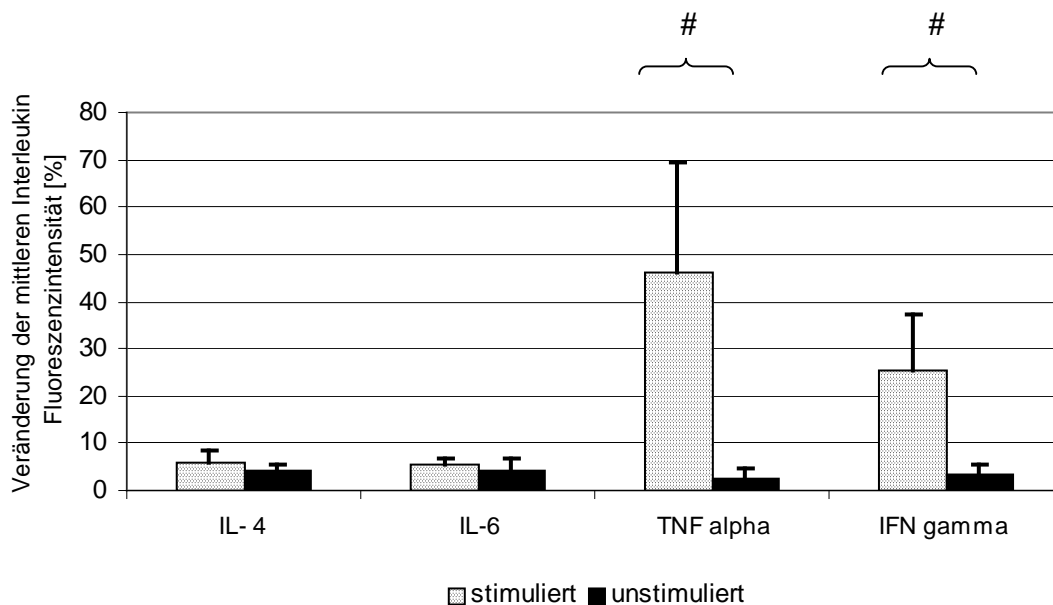
## 4.2 Zytokine, Glutamin-Plasma-Spiegel und Klinik

In den Abbildungen 9 bis 13 sind die Ergebnisse der Zytokindetektion als Balkendiagramm dargestellt. Die Glutamingruppe wird als gestrichelter, die Aminosäuregruppe als grauer und die Kontrollgruppe als schraffierter Balken aufgezeichnet.

Auf der Ordinate ist der prozentuale Anteil an stimulierten  $CD3^+$ -T-Lymphozyten vermerkt, bei denen eine intrazelluläre Zytokinproduktion nachweisbar war, sowie die Zytokinart. Die Abszisse zeigt fünf verschiedene Messzeitpunkte: präoperativ, postoperativ sowie erster, zweiter und dritter postoperativer Tag (PoT). Die Standardabweichung wird durch eine vertikale Linie über den Balken repräsentiert.

Zwischen den mit Klammern und Rauten verbundenen Gruppen war im zeitlichen Verlauf eine signifikante Veränderung an Interleukin produzierenden T-Zellen messbar. Die Richtung der Veränderung wird im Text angegeben. Die tabellarische Auflistung der Ergebnisse wird im Anhang (Kapitel 8) aufgeführt.

### 4.2.1 Ausgangswerte der intrazellulären Zytokindetektion



**Abb. 9:** Unstimulierte und stimulierte Ausgangswerte der Fluoreszenzintensität (%) vor Narkoseeinleitung

Gezeigt wird die Veränderung der unstimulierten und stimulierten T-Lymphozyten und deren Detektion von Interleukine-4, Interleukin-6, TNF- $\alpha$  und Interferon- $\gamma$  (Abbildung 9, Tabelle 9). Der Zeitpunkt der Messung wurde präoperativ durchgeführt. Die vertikale Linie stellt die Standardabweichung der Mittelwerte dar.

## 4.2.2 Intrazelluläre Zytokindetektion

### ✦ Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )

Es ergab sich kein signifikanter Unterschied in der Detektion der TNF- $\alpha$ -produzierenden Lymphozyten zwischen den einzelnen Gruppen zu den fünf Messzeitpunkten (Abb. 10 Tabelle 10). Indessen war im zeitlichen Verlauf eine Veränderung ( $p=0,001$ ) zu beobachten. Es bestand keinen Unterschied der Zytokinmenge in den ersten zwei Messzeitpunkten. Ein Abfall der TNF- $\alpha$ -erzeugenden Zellen konnte vom ersten postoperativen Tag auf den zweiten postoperativen Tag beobachtet werden.

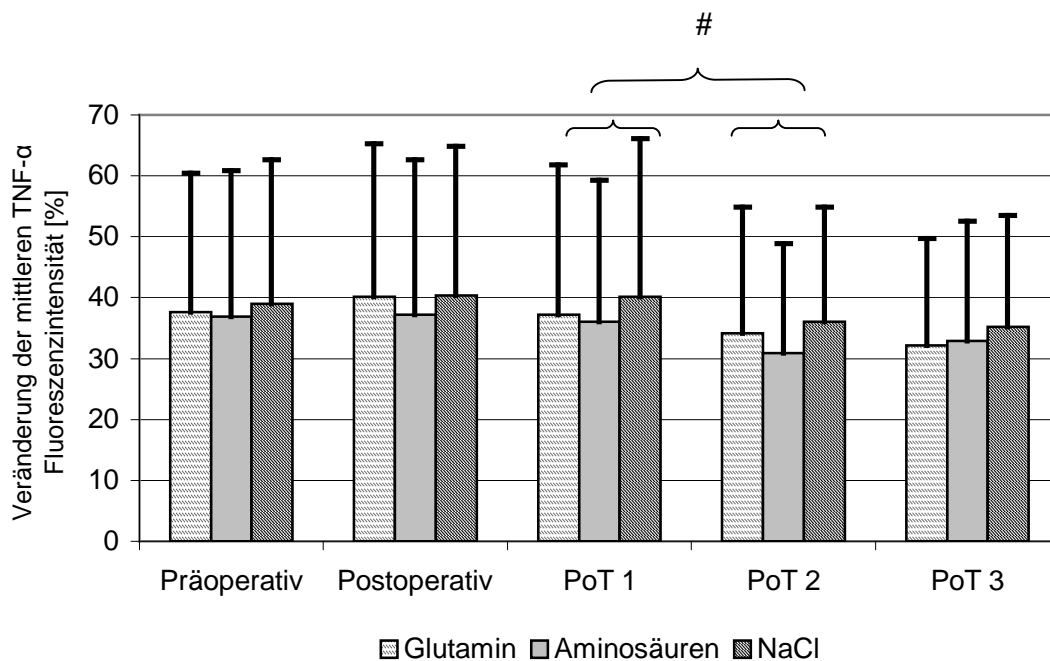


Abb. 10: Verlauf Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$

### ✦ Interleukin-6 (IL-6)

Die Produktion des Interleukin-6 wurde weder durch die Zugabe des Glutamins noch der Aminosäurelösung unter den Gruppen signifikant verändert. Im zeitlichen Verlauf ergab sich aber ein Anstieg der Zytokine am ersten postoperativen Tag (Abbildung 11, Tabelle 11). Am letzten Tag wurden die präoperativen Werte erreicht. Ein Gruppenunterschied war nicht zu verzeichnen.

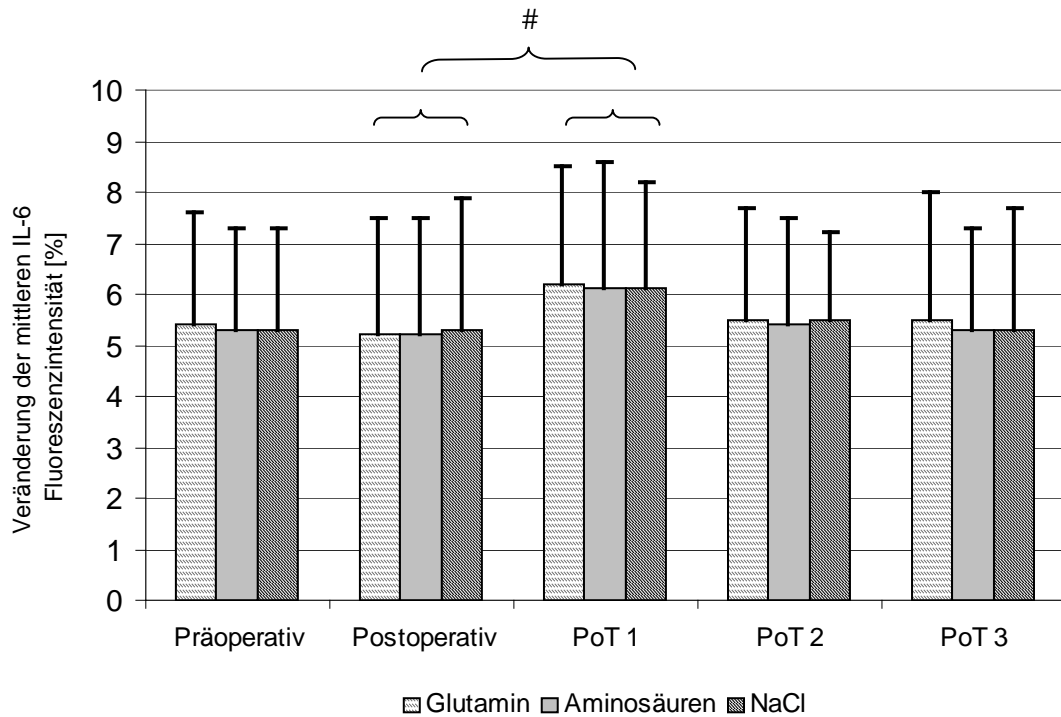


Abb. 11: Interleukin-6

### ➤ Interferon- $\gamma$ (IFN- $\gamma$ )

Zwischen den Gruppen kam es weder nach der Glutamin- noch nach der Aminosäurelösungsapplikation zu einer signifikanten Veränderung der IFN- $\gamma$ -Produktion im zeitlichen Verlauf (Abbildung 12, Tabelle 12).

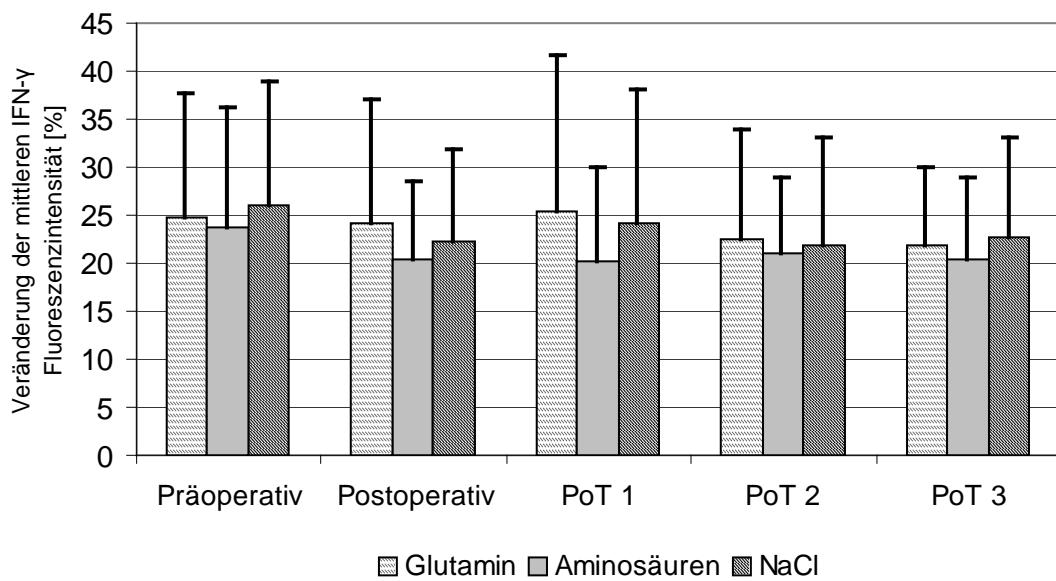


Abb. 12: Interferon- $\gamma$

## ➤ Interleukin-4 (IL-4)

Zwischen den einzelnen Gruppen konnten keine signifikanten Unterschiede bei der Detektion der IL-4-produzierenden Zellen (Abbildung 13, Tabelle 13) aufgezeigt werden. Allerdings war eine Reduktion der IL-4-produzierenden Zellen vom zweiten auf den dritten postoperativen Tag zu beobachten.

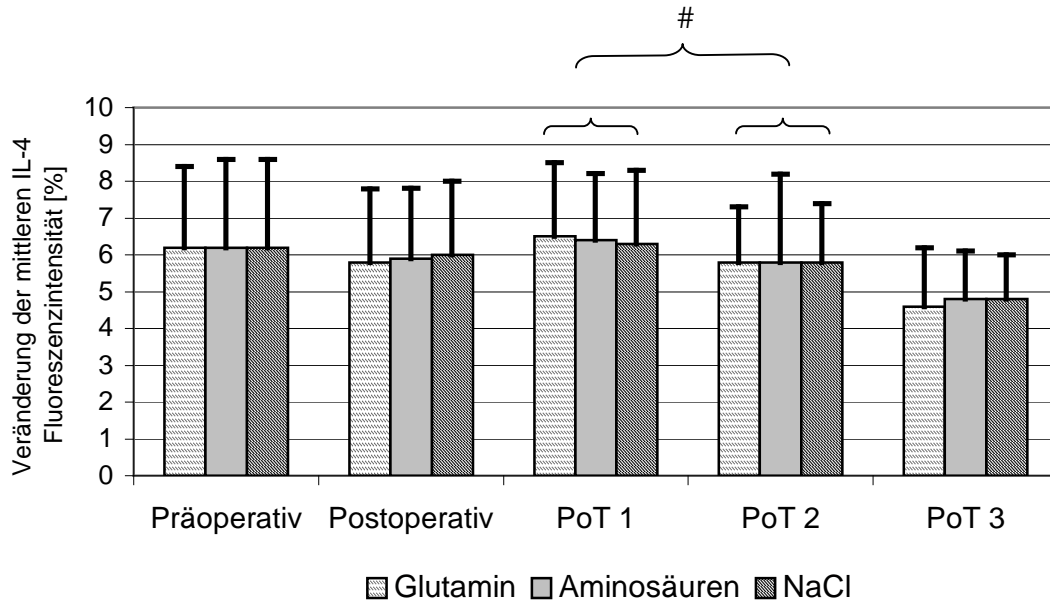


Abb. 13: Interleukin-4

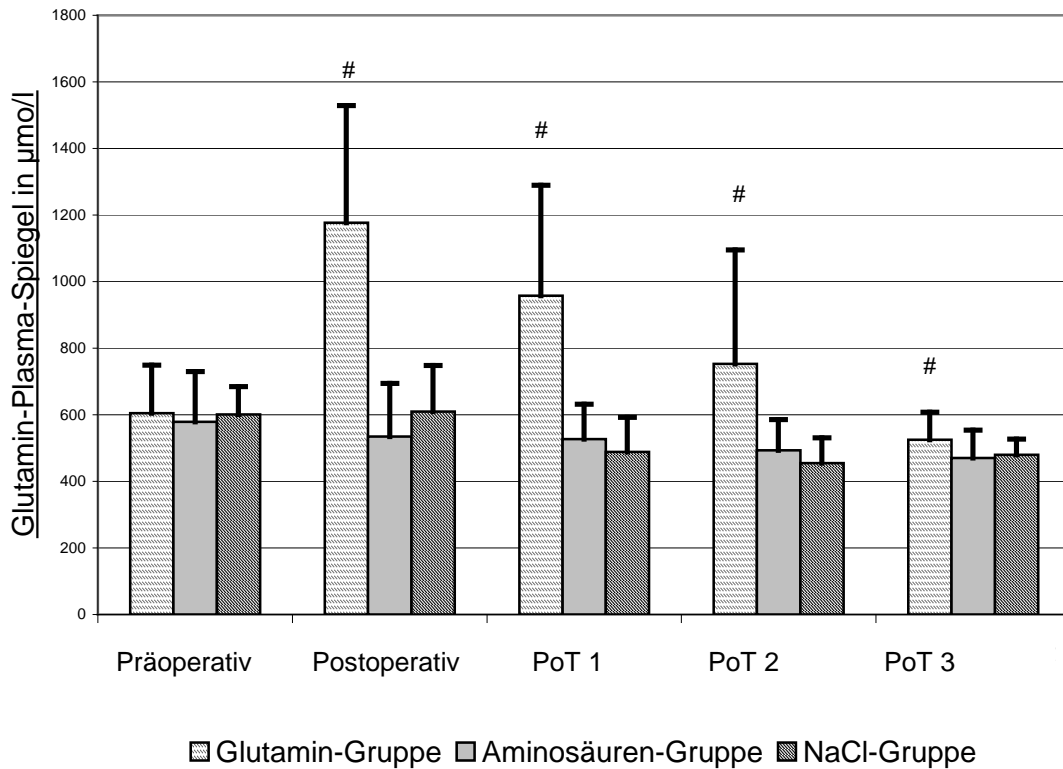
### 4.2.3 Glutamin-Plasma-Spiegel

Der zeitliche Verlauf des Glutamin-Plasma-Spiegels innerhalb der drei Patientengruppen zeigt deutliche Unterschiede vom präoperativen bis zum zweiten postoperativen Tag auf. Der Glutamin-Plasma-Spiegel der Glutamingruppe ist im Vergleich zu den beiden anderen Gruppen zu allen Messzeitpunkten signifikant höher (Abbildung 14, Tabelle 14).

### 4.2.4 Klinisches Outcome

Die Untersuchungsparameter, welche den klinischen Verlauf beschreiben, werden hier dargestellt (Abbildung 15, Tabelle 15). Zwischen den einzelnen Gruppen ergab sich kein signifikanter Unterschied bei folgenden Parametern:

- Dauer des Aufenthaltes auf der Intensivstation [d]
- Absolute postoperative Krankenhausaufenthaltszeit [d]



#  $\leq 0,05$  im Gruppenvergleich

Abb. 14: Verlauf des Glutamin-Plasma-Spiegels

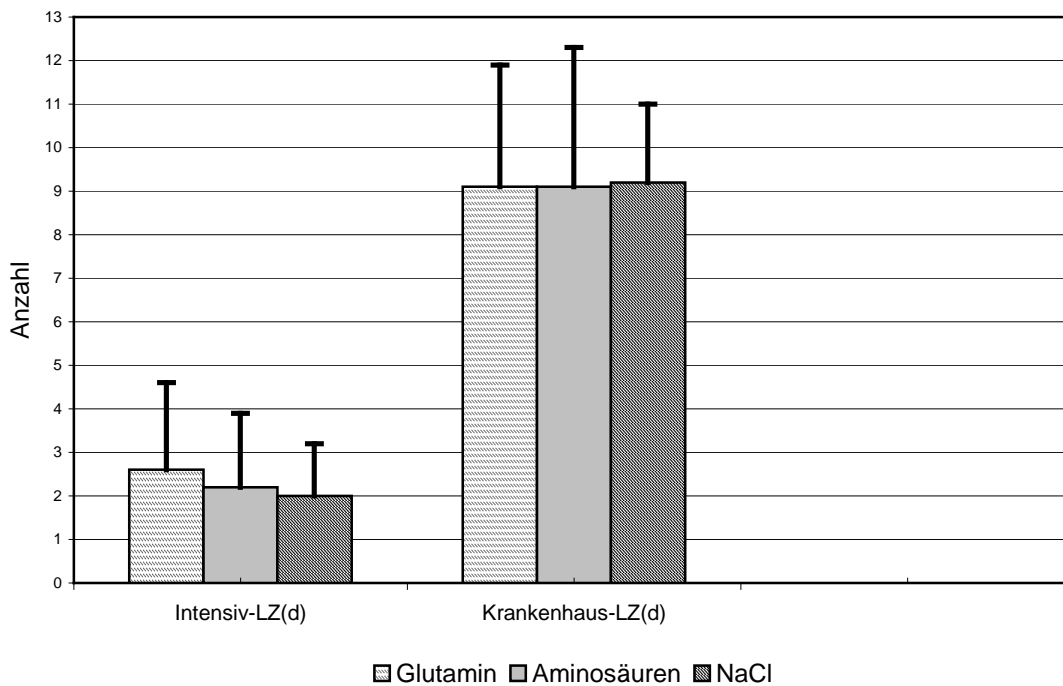


Abb. 15: Klinisches Outcome

## 5. Diskussion

### 5.1 Methoden

#### ✦ Laborchemische Registrierung

Die quantitative und qualitative Bestimmung von Zytokinen ist durch verschiedene Untersuchungsverfahren wie ELISA („enzyme linked immunosorbant assay“) oder RIA („radio immuno assay“) sowie Westernblot-Technik möglich. Diese Methoden gestatten eine laborchemische Erfassung der schon sezernierten Zytokinmenge im Plasma oder aus dem Überstand von Zellkulturen [83, 107, 136]. Die in den letzten Jahren häufig genutzten Verfahren bergen zahlreiche Möglichkeiten für Fehlbestimmungen. Unter anderem ergeben sich diese aus den biochemischen Eigenschaften der Zytokine selbst oder deren Wechselwirkungen im Milieu.

Bei den bisher verwendeten Verfahren zur Registrierung der Zytokine ist keine Aussage über die Herkunftszellen mehr möglich. Da nicht nur T-Lymphozyten Zytokine produzieren, sondern auch Makrophagen und Endothelzellen, kann dies zu falsch erhöhte Werten führen. Ebenfalls ist zu bedenken, dass die Zytokinkonzentration im Plasma durch Freisetzung aus Myokardzellen nach einer Ischämiephase erhöht wird [144]. Somit ist mit diesen Methoden nur eine Aussage über die generelle Zytokinkonzentration möglich. Isoliert man die Zellpopulationen mittels Dichtegradienten oder immunologischer, magnetischer Beads, lassen sich die danach sezernierten Zytokine den einzelnen Zellen zuordnen. Durch die Auftrennung der Zellen kommt es zu einem veränderten Milieu der Probenlösung, welches nicht mehr den physiologischen Bedingungen entspricht. Diese Veränderung führt meist zu einer *ex vivo* Stimulation der Zellen, wodurch wiederum falsch erhöhte Messwerte zustande kommen können [81]. Weiterhin kann es bei der Sortierung der Zellen nicht nur zu einer Veränderung des prozentualen Anteils der Zellsubpopulationen kommen, sondern es zeigten sich im Vergleich mit einer lysierten Vollblutmethode und der von Ficoll-Hypaque separierten Zellen signifikant verschiedene Prozentzahlen an positiv markierten Zellen [12].

Ein anderes Problem stellt die relativ kurze Halbwertszeit der Zytokine selbst dar. Diese erfordert nicht nur eine schnelle Probengewinnung, sondern auch eine zügige Messung, welche bei einer verlängerten Stimulationszeit wiederum zu falsch niedrigen Ergebnissen bis hin zu Nullwerten führen kann [133]. Ein weiterer Nachteil besteht darin, dass nicht nur die biologisch aktiven Zytokine nachgewiesen werden, sondern auch jene, welche durch Bindung an einem Rezeptor ihre Wirkungsfähigkeit verloren haben. Ebenfalls er-

schweren Blutbestandteile wie Erythrozyten, welche zum Beispiel IL-8 oder andere Mediatoren aus dem Serum entziehen, eine genaue Erfassung der Zytokine [11, 14, 18].

Eine Reduktion der gerade geschilderten Nachteile bietet die in dieser Studie verwendete Fluoreszenzdurchflusszytometrie. Bei dieser Methode wird der prozentuale Anteil an Zellen bestimmt, die ein bestimmtes Zytokin intrazellulär produziert haben, welches zuvor durch einen fluoreszenzmarkierten Antikörper markiert wurde. Zusätzlich wird über die oberflächenspezifischen Antikörper eine einzelne Zelllinie erfasst, in diesem Fall die T-Lymphozyten. Ebenso ist es mit dieser Technik möglich, zwischen nicht- und zytokinproduzierenden Zellen zu unterscheiden [17].

Weitere Vorteile stellen die schnelle Auswertung von mehreren tausend Zellen in kurzer Zeit und die Erfassung sämtlicher intrazellulären Zytokine dar. Im Vergleich zu den anderen Methoden ist damit ein überschaubarer und geringerer Arbeitsaufwand verbunden. Auch spricht für die Fluoreszenzdurchflusszytometrie, dass die Zellen im Vollblut vorliegen und somit das Verhältnis der relativen Zellanteile zum Milieu im Patienten nicht verändert ist. Ein weitestgehend physiologisches Verhältnis wird durch die Zusammensetzung des Mediums gewahrt. Dadurch sollte eine *in vitro* Stimulation unterbunden werden. Durch die Erfassung des relativen Anteils an zytokinproduzierenden Zellen ist keine Aussage über die absolute Menge an produzierten Zytokinen möglich [17, 81].

Letztendlich kann die Art des Messverfahrens eine größere Auswirkung auf die Ergebnisse haben als die Operationsbedingungen. Dies erklärt die Unterschiede in der Interpretation der Resultate der Zytokinproduktion und deren Freisetzung während und nach einem kardiochirurgischen Eingriff.

#### ➤ **Stimulation der T-Lymphozyten**

Durch eine gezielte Stimulation lässt sich die Zytokinproduktion der Lymphozyten unter *in vitro* Bedingungen steigern. Dieser Schritt ist erforderlich, da die Zytokinkonzentration ohne einen Aktivierungsreiz meist bedingt niedrig ist. Weiterhin ermöglicht die Stimulierung eine Beurteilung der Zellfunktion unter Stresssituationen, wie Erkrankungen oder chirurgische Interventionen [3]. Zu berücksichtigen ist, dass dieses Forschungsverfahren keine Zytokinspiegel misst und dadurch die Vergleichbarkeit zu anderen Studien meist nicht möglich ist.

Die Stimulation der Lymphozyten wird durch verschiedene Störfaktoren beeinflusst. Durch Fremdmaterialkontakt oder Kontamination kann es zu einer Aktivierung der Zel-

len sowie zu einem Verlust dieser an der Fremdoberfläche kommen. Schon diese aufgezählten Einflüsse zeigen, dass die Zytokinexpression einem starken dynamischen Verlauf unterworfen ist. Verschiedene Agenzien induzieren nur bei bestimmten Zelltypen eine optimale Wirkung und lösen unterschiedliche Reaktionen auf der Zellebene aus.

Auch können abhängig von der Art der Stimulation und Stimulationsdauer die Ergebnisse der Interleukinbestimmung bzw. die Menge der freigesetzten Interleukine abweichen. Untersuchungen bewiesen, dass die T-Lymphozyten nur geringfügig auf das bakterielle Lipopolysaccharid reagieren, obgleich es bei einer 24-stündigen Inkubationszeit ein erfolgreicher Stimulator von Monozyten, Makrophagen und B-Lymphozyten ist. Dagegen ist Concanavalin A (Con A) bei einer Inkubationszeit von 24 h und einer Glutaminkonzentration von mindestens 0,1 mM ein idealer Stimulus für die Zytokinproduktion [145]. Ein Beispiel für die unterschiedliche Auswirkung auf die Subtypen einer Lymphozytenpopulation ist das Bazillus Calmette-Guérin, das nur die T<sub>H</sub>-1-Zell-Subpopulation anregt, im Gegensatz zu dem Masernvirus, das nur die T<sub>H</sub>-2-Zellen beeinflusst. Das Phytohämagglutinin aktiviert gleichermaßen die T<sub>H</sub>-1- und T<sub>H</sub>-2-Zellen [22].

Unter *in vivo* Verhältnissen werden die T-Lymphozyten von anderen Zellen des Immunsystems aktiviert. Im Gegensatz zu den B-Lymphozyten können die T-Zellen ein spezifisches Antigen nur im Komplex mit MHC-Molekülen, welche auf den Oberflächen von körpereigenen Zellen präsentiert werden, erkennen [45]. Zudem wird ein zusätzliches ko-stimulatorisches Signal für ein weiteres Rezeptor-Liganden-Paar benötigt [136]. Durch die Stimulation mit Ionomycin und PMA kann der gewöhnliche T-Zell-Aktivierungsweg *in vitro* umgangen werden. Es ist bekannt, dass Ca<sup>2+</sup>-Ionophore wie das Ionomycin eine Erhöhung des intrazellulären Ca<sup>2+</sup> induzieren [26]. Diese Erhöhung ist entscheidend, um eine weitere Proteinphosphorylierung zu vermitteln. PMA wirkt auf die später im Signaltransduktionsweg stehende Protein-Kinase C direkt ein. Beide pharmakologischen Agenzien stellen nicht den physiologischen Aktivierungsweg dar, werden aber generell als eine zuverlässige Methode zur Lymphozytenstimulation angesehen [92, 101, 115]. Dadurch gelingt eine vollständige T-Zellaktivierung, so wie sie *in vivo* Verhältnissen durch Ligation des T-Zell-Rezeptorkomplex und der ko-stimulatorischer Moleküle resultiert [139]. In dieser Studie wurde jenes Verfahren verwendet. Für die optimale Inkubationsdauer wird ein Zeitraum von vier bis acht Stunden beschrieben [78, 80]. Diese Inkubationszeit liegt wie bei Yaqoob et al. [145] unter 24 h, ebenso wie bei Rohde et al. [108], die LPS und Con A oder PHA benutzen. In dieser Studie wurde die empfohlene Inkubationszeit von 8 Stunden eingehalten.

## 5.2 Zytokindetektion

### ✦ Zytokine

Während eines kardiochirurgischen Eingriffs kommt es zu einer Veränderung der Zytokinkonzentration der T-Lymphozyten. Dies wird unter anderem durch den Einsatz des kardiopulmonalen Bypasses selbst sowie durch den Einfluss von Medikamenten ausgelöst. Es konnte eine Verschlechterung der T-Zellfunktion und der damit verbundenen verminderten Produktion des proinflammatorischen IFN- $\gamma$  dargestellt werden [93, 94]. Zytokine gehören wie die Sauerstoffradikale zu den am besten untersuchten Molekülen, die eine systemische Inflammation auslösen können. Daher ist auch bekannt, dass die Blockade eines Mediators nicht notwendigerweise das Outcome verbessert. Einen einzelnen verantwortlichen Faktor ausfindig zu machen, ist durch die Redundanz des Zytokinnetzwerks erschwert. Hier wurde speziell die Sekretion und der Verlauf der Zytokine TNF- $\alpha$ , IL-4, IL-6 sowie IFN- $\gamma$  bei kardiochirurgischen Eingriffen mit einer parenteralen Gabe von Glutamin, Aminosäuren beziehungsweise NaCl beobachtet.

In dieser Studie traten am postoperativen im Vergleich zum präoperativen Messzeitpunkt leicht erniedrigte Werte bei der IFN- $\gamma$  Detektion auf. Dagegen waren die IL-4 und IL-6 Werte geringfügig erhöht. Insgesamt zeigte sich keine signifikante Veränderung der IFN- $\gamma$ -Produktion im Verlauf. Es konnte ein Abfall der IL-4 produzierenden Zellen an den letzten zwei Messzeitpunkten nachgewiesen werden. Gruppenunterschiede konnten in den einzelnen Zytokinklassen nicht ermittelt werden.

Die in anderen Studien beobachtete früh ansteigenden Konzentrationen frei zirkulierenden Zytokine wie IL-6 sowie TNF- $\alpha$  nach kardiochirurgischen Eingriffen lassen sich durch andere Herkunftszellen erklären [2,14,15]. Unter anderem können proinflammatorische Zytokine aus dem Endothelium oder dem Myokard ausgeschüttet werden [14]. Eine durch die Glutamingabe verstärkte inflammatorische Antwort konnte für die T-Lymphozyten nicht nachgewiesen werden.

### 5.2.1 Die proinflammatorische Antwort

Der Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$ , Interleukin-6 sowie das Interferon- $\gamma$  sind proinflammatorischen Zytokine.

#### ➤ Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$

Der Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$ , auch als Kachektin bekannt, wurde indirekt 1893 von dem Chirurgen William Coley entdeckt. Dieser Botenstoff der Zellen des Immunsystems wird von Makrophagen, Monozyten sowie T- und B-Lymphozyten und Mastzellen gebildet [24, 32, 68]. Gelegentlich wurde das Molekül als „Kachektin“ bezeichnet aufgrund der bei Krebspatienten beobachteten appetitunterdrückenden sowie fett- und muskelabbauende Wirkung [68]. Dieses Interleukin ist durch weitreichende Effekte gekennzeichnet, wie bei der inflammatorischen Antwort, wo es als einer der ersten Mediatoren erscheint und die pathophysiologischen Effekte des SIRS provoziert. Auch ist es bedeutend bei der Blutbildung, der Angiogenese und dem Tumorzellenwachstum. Dabei ist es dem Interleukin-1 in seiner Wirkungsweise sehr ähnlich. TNF- $\alpha$  wirkt als autokriner und parakriner Regulator von Leukozyten und Endothelzellen mit einer starken proinflammatorischen Wirkung in Entzündungsherden [68]. Zudem setzt es den respiratorischen Burst bei Monozyten, Makrophagen und neutrophilen Granulozyten herauf und fördert die zytolytische Aktivitäten gegen bestimmte Tumore über die Förderung der Phagozytose [32]. Gleichzeitig induziert es die Expression von Adhäsionsmolekülen, wie E-Selektin und dem vaskulären Adhäsionsmolekül-1, auf Endothelzellen. Dies führt zur verstärkten Adhäsion von neutrophilen Granulozyten, Monozyten und T-Zellen [23, 68]. Ebenso verstärkt es die mikrobizide Aktivität von neutrophilen Granulozyten, Monozyten und Makrophagen [68]. Die TNF- $\alpha$ -Produktion selbst wird von Prostaglandin- E<sub>2</sub> sowie den Zytokinen IL-4 und IL-6 supprimiert [48]. Die Menge des ausgeschütteten Zytokins ist bei jedem Individuum unterschiedlich. Dabei bleibt die Höhe der Zytokinproduktion in jedem Individuum konstant. Ursache hierfür ist der Einfluss der einzelnen Nukleotid-Polymorphismen in der Promoterregion der Gene [48, 6]. Bei einem Auftreten von hohen Konzentrationen des TNF- $\alpha$  werden auch systemische Effekte beobachtet. Die Freisetzung des Corticotropin-Releasing-Hormons im Hypothalamus wird stimuliert, in der Leber setzt es das C-reaktive Protein (CRP) frei und induziert Fieber [48]. Zusätzlich scheint mit einem erhöhten TNF- $\alpha$ -Spiegel das „*Capillary-Leakage-Syndrome*“ gekoppelt zu sein, welches verstärkt nach einer extrakorporalen Zirkulation auftritt. Dieses ist durch eine Ansammlung von interstitieller

Flüssigkeit sowie einer erhöhten Kapillarpermeabilität gekennzeichnet. Ebenfalls induziert TNF- $\alpha$  in Kombination mit IL-1 Veränderungen des Endothels. Es bewirkt neben der Hyperkoagulation durch eine Inhibition antikoagulatorischer Mechanismen auch eine Erhöhung der Chemotaxis [33, 72].

TNF- $\alpha$  wird als zentrales Geschehen für die Induktion der inflammatorischen Gewebezerstörung, Sepsis und des septischen Schocks angesehen [24, 35, 68]. Die Infusion von TNF- $\alpha$  im Tiermodell zeigte eine Manifestation des Sepsissyndroms inklusive der disseminierten intravasalen Gerinnung und einer reduzierten Kontraktilität des Myokards [77, 118]. Wie schon zuvor erwähnt, wird es in der schweren Sepsis und dem SIRS als erstes Zytokin produziert. Anhaltende hohe Serumspiegel von TNF- $\alpha$  und TNF-Rezeptoren korrelieren mit prolongierten postoperativen Verläufen und zeigen den Einfluss der proinflammatorischen Zytokine bei einem überschießenden SIRS nach einem HLM-Einsatz [71].

Andere Studien zeigten, dass erhöhte TNF- $\alpha$ -Konzentrationen mit einer erhöhten Mortalität einhergehen [48]. In einer Studie von Grimble et al. [48] wurde bei einer zusätzlichen Gabe von Fischöl, welches Omega-3-Fettsäuren enthält, eine deutlich verringerte TNF- $\alpha$ -Konzentrationen im Plasma ermittelt und somit unterschiedliche antiinflammatorische Effekte bei Erkrankten beobachtet. Ob ein ähnlicher Effekt mit einer parenteralen Glutamingabe erreicht werden kann, wurde in dieser Studie überprüft.

Nach anfänglich erhöhtem Spiegel des TNF- $\alpha$  konnte am zweiten postoperativen Tag ein Absinken des Zytokinpiegels beobachtet werden, was auf eine supprimierte proinflammatorische Antwort hinweist. Auch El Azab et al. [36] konnten bei herzchirurgischen Patienten intraoperativ sowie am ersten Tag nach der Operation ein Abfallen der TNF- $\alpha$ -Konzentration beobachten.

Die erfasste Abweichung zwischen der herabgesetzten zellulären Syntheseleistung und dem gleichzeitig erhöhten TNF- $\alpha$  Plasmaspiegel wird auch bei anderen inflammatorischen Zytokinen beobachtet. Dies lässt sich dadurch erklären, dass die Leukozyten während der operativen Phase nicht ausschließlich für den Zytokinanstieg verantwortlich sind, sondern auch Zellen aus dem Myokard und Endothel sowie Fibroblasten [144]. Somit konnte kein Einfluss auf die proinflammatorische Antwort aufgezeigt werden.

## ✦ **Interleukin-6**

Das Interleukin-6 ist ein zentrales Regulatormolekül in Immun- und Entzündungsprozessen und wird relativ früh innerhalb einer Entzündungsreaktion freigesetzt. T- und B-Lymphozyten, Monozyten, Makrophagen und Endothelzellen sind die Herkunftszellen dieses proinflammatorischen Zytokins, welches der  $T_H$ -2-Antwort angehört [33]. Erhöhte IL-6 Plasmaspiegel wurden bei Patienten, die sich im Stadium eines SIRS oder einer Sepsis befanden, aufgezeigt werden. In der Sepsistherapie hat sich das IL-6 als ein Marker für die Immundefunktion und Outcomeparameter für das MODS bewährt [29]. Die IL-6-Produktion wird durch IL-1 und TNF- $\alpha$  angeregt, aber gleichzeitig inhibiert es die Synthese dieser Botenstoffe und funktioniert somit als antiinflammatorische regulierende Komponente [22]. Zudem wirkt es an der Aktivierung und Differenzierung von T-Zellen mit. In der späten Differenzierungsphase stellt es für aktivierte B-Zellen und antikörperproduzierenden Plasmazellen einen Wachstumsfaktor dar. Schon in geringen Konzentrationen wirkt es autokrin sowie parakrin. Bei einer verstärkten Produktion und erhöhten Konzentration im Plasma wirkt es sogar endokrin [48]. Durch exogene Reize wie Traumen, Infektionen, Operationen und Verbrennungen induziert es im Leberparenchym die Bildung und Freisetzung von Akut-Phase-Proteinen [24]. Auch nach kardiochirurgischen Eingriffen sind erhöhte IL-6-Plasmaspiegel aufgetreten. Wie bei septischen Krankheitsbildern, kann IL-6 ebenfalls nach herzchirurgischen Operationen als Maßstab für ein Entzündungsgeschehen dienen [29]. Auch wird dem IL-6 eine veränderte Auswirkung der linksventrikulären Kontraktilität und erhöhte Inzidenz an ischämischen Episoden zugeschrieben. Neben den erhöhten Parametern wie C-reaktives Protein, Procalcitonin, Leukozyten und Körpertemperatur treten mit dem Ende des cardiopulmonalen Bypasses ebenfalls Spitzenwerte für IL-6 auf. Dieser Peak wird 6 bis 24 Stunden nach dem Eingriff beschrieben [29, 113]. Wie bei allen anderen Parametern der Akut-Phase-Reaktion zeigt dieses Interleukin einen ansteigenden Verlauf bis zum zweiten postoperativen Tag auf [113]. Am ersten postoperativen Tag zeigte sich synchron zu der  $T_H$ -2-Antwort eine erhöhte Anzahl an IL-6 produzierenden Zellen. Diese Ergebnisse stimmen mit einer Studie von Naldine et al. [93] überein, während bei Markewitz et al. [79] am zweiten postoperativen Tag die Freisetzung der Interleukine von monokularen Zellen unverändert blieb. Bei Sbrana et al. [114] wiesen die Monozyten dagegen postoperativ eine reduzierte intrazelluläre IL-6-Produktion auf. Im Vergleich zu den anderen Gruppen ergaben sich durch die parenterale Substitution keine signifikanten Unterschiede. Ein proinflammatorischer Effekt blieb dementsprechend aus.

### ➤ **Interferon- $\gamma$**

Das Interferon- $\gamma$  gehört zu der  $T_H$ -1-Antwort und wird von Lymphozyten, Makrophagen, Monozyten und NK-Zellen produziert. Dieses Typ-II-Interferon wirkt antiviral und immunregulierend. Zu den Zielzellen gehören unter anderen Makrophagen, deren Synthese von proinflammatorischen Zytokinen sowie die Expression von MHC-Klasse-I-Molekülen verstärkt wird [24]. Durch die Induzierung von MHC-Klasse-II-Molekülen wird die Immunreaktion gesteigert. Zudem werden das Wachstum und die Differenzierung der B- und T-Lymphozyten stimuliert, wodurch sich die peripheren T-Zellen zu  $T_H$ -1-Zellen differenzieren und die Proliferation von  $T_H$ -2-Zellen inhibiert wird. INF- $\gamma$  aktiviert mononukleäre Phagozyten, neutrophile Granulozyten und die zytotoxische Aktivität von NK-Zellen. Weiterhin steigert es die Phagozytose und das intrazelluläre „Killing“ [32, 68]. Für das IFN- $\gamma$  gibt es wenige Erkenntnisse in der Kardiochirurgie. Die IFN- $\gamma$  produzierenden Zellen zeigen kaum eine Schwankung im zeitlichen Verlauf auf und keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Dies kann mit der Polarisierung der vorwiegenden  $T_H$ -2-Antwort erklärt werden, wie auch einer konstanten Zellzahl, die mit der Stimulation der B-Zellen verkettet zu sein scheint. Eine verminderte IFN- $\gamma$  Freisetzung beschreiben Naldine et al. [93] nach Stimulation von peripheren mononukleären Zellen mit PHA, was wiederum einer  $T_H$ -2-Antwort entspricht.

### **5.2.2 Die antiinflammatorische Antwort**

Das Zytokin IL-4 gehört zur antiinflammatorischen Antwort.

### ➤ **Interleukin-4**

Dieses Kurzketten-Typ-I-Zytokin, welches 1982 zum ersten Mal beschrieben wurde, wird unter anderen von Lymphozyten und den  $T_H$ -2-polarisierten T-Zellen synthetisiert [33]. Seine Wirkung ist vielfältig. Es induziert die Proliferation der B-Lymphozyten, weshalb dieses Zytokin zuerst als B-Zell-stimulierender Faktor I bezeichnet wurde. Außerdem veranlasst es die Expression von MHC-Klasse-II-Molekülen und die IgE-Produktion. Drössler et al. [33] zeigten, dass es die Vermehrung von Thymozyten und hämopoetischen Vorläuferzellen steigert. Auch aktiviert es die NK-Zellen. Interleukin-4 begünstigt die Differenzierung von T-Helferzellen zum  $T_H$ -2-Phänotyp. Dagegen hemmt es die Synthese der proinflammatorischen Zytokine der Makrophagen [24, 33, 68]. Indessen wird IL-4 von IFN- $\gamma$  neutralisiert, welches von  $T_H$ -1-Zellen sezerniert wird. Im Normalfall kommt es bei einer  $T_H$ -2-Antwort zu keiner Reduktion der IL-4-

produzierenden Zellen, was aber in dieser Studie am dritten postoperativen Tag eintrat. Eine gesteigerte antiinflammatorische Tätigkeit ist in diesem Abschnitt nicht mehr erforderlich. Muret et al. [91] konnten darlegen, dass eine unveränderte IL-4-Freisetzung nach einer Stimulation des Vollblutes mit PHA und Con A eintrat. Ähnliche Ergebnisse sind in der Literatur nicht oft beschrieben worden.

### **5.3 Glutamin-Plasma-Spiegel**

#### **5.3.1 Die parenterale Glutaminsubstitution und die Veränderung des Glutamin-Plasma-Spiegels**

Bei der Beobachtung von kritisch Erkrankten fiel auf, dass der Glutamin-Plasma-Spiegel auf 50 % und der intrazelluläre Glutaminspeicher im Skelettmuskel auf 75 % des Ausgangswertes sanken. Weitere Ursachen des Glutaminmangels sind in einer Mangelernährung, einen gesteigerten Verbrauch oder einer einseitigen parenteralen Ernährung zu finden. Der letzte Aspekt lässt sich dadurch erklären, dass die herkömmlichen Aminosäurelösungen kein Glutamin enthalten. Aufgrund dessen scheint zunächst eine ergänzende enterale Ernährung vorteilhafter zu sein, da der Plasmaspiegel um das zwei- bis dreifache erhöht werden kann [41, 42, 69, 75, 89,143].

Eine zusätzliche intravenöse Gabe von Glutamin bereitet aufgrund der ungünstigen physikalischen und chemischen Eigenschaft Schwierigkeiten. Aufgrund der Hitzeinstabilität ist eine Sterilisation nicht möglich. Ebenfalls ist das Molekül in Wasser gelöst sehr instabil und zerfällt auch bei einer Lagerung bei 4°C nach ein bis zwei Tagen in das toxische Pyrroglutamat unter der Freisetzung von Ammonium. Die schlechte Wasserlöslichkeit (35 g/l bei 20 C°) der Aminosäure ermöglicht eine Herstellung von einer maximal 1,5 %-igen Lösung [41, 42, 64]. Um eine ausreichende Glutaminmenge zuzuführen, wäre dies mit einer erheblichen Volumengabe verbunden. Diese Faktoren verhindern einen problemlosen Einsatz beim Menschen [45, 46, 92]. Für die intravenöse Anwendung wurden deswegen verschiedene synthetische glutaminhaltige Dipeptide wie L-Alanyl-L-Glutamin, L-Glycyl-L-Glutamin oder L-Tyrosyl-L-Glutamin mit verbesserten pharmakologischen Eigenschaften entwickelt [16, 41, 42, 76, 138]. Diese heben sich durch höhere Hitzestabilität, Löslichkeit und geringere Produktionskosten hervor. Die Nierengängigkeit ist geringer und eine gleichmäßige Verteilung im Plasma wird schneller erreicht. Auch zeigen diese Dipeptide deutlich weniger Nebenwirkungen wie allergische Reaktionen und irreversible Gewebeakkumulation auf [16, 41, 122, 138]. In Studien wurden L-Glycyl-L-Glutamin (Gly-Gln) und L-Alanyl-L-Glutamin (Ala-Gln) un-

tersucht. Grundsätzlich konnten auch bei L-Glycyl-L-Glutamin die unter L-Alanyl-L-Glutamin beobachteten Wirkungen beobachtet werden. Ein unterschiedlicher Effekt der einzelnen Dipeptide auf die zellulären Komponenten des Immunsystems ist bisher noch nicht bekannt. Beide lassen sich praktisch ohne Komplikationen und Nebenwirkungen in wässriger Lösung einsetzen. Zudem sind beide hitzestabil und zerfallen nicht in toxische Produkte [41]. Die Wasserlöslichkeit liegt bei L-Alanyl-L-Glutamin mit 568 g/l H<sub>2</sub>O erheblich über der von Glutamin mit 36 g/l H<sub>2</sub>O und L-Glycyl-L-Glutamin mit 154 g/l [45]. Beide Dipeptide scheinen das Ischämierereperfusionssyndroms zu vermindern [129]. Ein anderes Entscheidungskriterium stellt die Hydrolysefähigkeit der Dipeptide dar. Nach Eintritt in den Blutkreislauf unterliegen diese Dipeptide der Hydrolyseaktivität des Plasmas sowie der membranständigen Hydrolasen [122]. Diese liegt bei L-Alanyl-L-Glutamin über der von L-Glycyl-L-Glutamin mit 9 nMol/ml/min [42]. In dieser Studie wurde das Dipeptid L-Alanyl-L-Glutamin verwendet. Dessen Halbwertszeit lag bei gesunden Probanden bei drei bis vier Minuten. Damit ist ein signifikanter Glutaminkonzentrationsanstieg um das Zwei- bis Dreifache möglich, was auch hier bestätigt werden konnte [40].

Im Vergleich der parenteralen gegenüber der enteralen Applikation weist letztere einige Nachteile auf. Bei einer enteralen Gabe füllt sich der Glutaminpool langsamer [39, 41]. Bei einem eingetretenen hyperinflammatorischen Zustand ist diese durch die lange Latenzzeit bis zum Wirkungseintritt der parenteralen Applikation unterlegen. Nach dem Öffnen stellt es zusätzlich einen idealen Nährboden für Mikroorganismen dar. Zudem wird die Verabreichung der genau benötigten Dosis durch ungleichmäßige Resorption erschwert. Auch sind die Verträglichkeit, die hohe Volumengabe, die Substitution über lange Zeiträume sowie häufig eingeschränkte Volumentoleranz limitierende Faktoren für den Einsatz. In der Gegenüberstellung der parenteralen und enteralen Gabe war ein günstigerer Effekt der parenteralen Gabe nachweisbar, wobei aber die enterale Gabe einen positiven Einfluss auf die Darmbarriere ausübt. Dies wird generell als Protektion vor einer Hyperinflammation gesehen [37, 59, 104].

Die in dieser Studie beobachteten postoperativen Glutamin-Plasma-Spiegel lagen bei 1177 µmol/l (Glutamingruppe), 535 µmol/l (Aminosäuregruppe) und 610 µmol/l (NaCl-Gruppe). Die Werte sanken vom Operationstag zu dem ersten postoperativen Tag um 19 % auf 958 µmol/l (Glutamingruppe), um 1,5 % auf 527 µmol/l (Aminosäuregruppe) und um 20 % auf 489 µmol/l (NaCl-Gruppe).

In der Glutamingruppe konnte ein signifikant erhöhter Glutamin-Plasma-Spiegel ermittelt werden. Unter physiologischen Bedingungen beträgt der Glutamin-Plasma-Spiegel etwa 600-700  $\mu\text{mol/l}$  [46, 112, 123]. Dies deckt sich mit den präoperativ gemessenen Werten aus dem hier untersuchten Patientenkollektiv mit 605  $\mu\text{mol/l}$  (Glutamingruppe), 579  $\mu\text{mol/l}$  (Aminosäuregruppe) und 602  $\mu\text{mol/l}$  (NaCl-Gruppe) überein. Der durchschnittliche Glutamin-Plasma-Spiegel in der postoperativen Messung der Glutamingruppe zeigte mit 1178  $\mu\text{mol/l}$  eine Verdopplung des präoperativen Wertes auf. Die Kontrollgruppen wiesen deutlich niedrigere Werte von 471  $\mu\text{mol/l}$  (Aminosäuregruppe) beziehungsweise 480  $\mu\text{mol/l}$  (NaCl-Gruppe) am dritten postoperativen Tag auf.

### ✦ **Dosis der Glutaminsupplementierung**

Über die Dosis der Glutaminsupplementierung wurden unterschiedliche Empfehlungen in der Literatur vermerkt. Für große Traumen oder unkomplizierte elektive chirurgische Operationen mit gastrointestinalen Malfunktionen oder Kachexie wird eine tägliche Mindestgabe von 13-20 g Glutamin empfohlen [41]. Bei Patienten mit schwereren Erkrankungen oder Polytrauma und dem damit ablaufenden inflammatorischen Prozess, vermuten Fürst et al. [41], dass eine höhere Dosis erforderlich ist. Kuhlmann et al. [70] berichten über einen Glutaminverlust bis zu 4 g/Tag bei katabolen Patienten, daher erscheint eine Glutaminsubstitution von 0,3-0,5 g/kg/Tag empfehlenswert. In dieser Studie wurde den Patienten eine Dosis von 0,5 g Glutamin pro Kilogramm Körpergewicht pro Tag parenteral verabreicht.

Die hochnormalen Glutaminkonzentrationen, welche bei einigen Studien verwendet wurden, lassen sich dadurch begründen, dass besonders Patienten mit schweren Traumen oder Erkrankungen davon profitieren. Diese Patienten verbrachten einen deutlichen längeren Zeitraum auf einer Intensivstation und wurden daher auch länger mit glutamin-freien Nährlösungen künstlich ernährt.

Dagegen befand sich das Patientenkollektiv in dieser Studie nur eine relative kurze Zeit mit durchschnittlich 2,6 Tagen (Glutamingruppe), 2,2 Tagen (Aminosäuregruppe) und 2,0 Tagen (NaCl-Gruppe) auf der Intensivstation. Demnach erfolgte nach recht kurzer Zeit ein enteraler Kostaufbau. Somit war das Risiko einer neu auftretenden Mangelerscheinung gering und die physiologischen Glutaminspeicher wurden im Rahmen der katabolen Stoffwechsellage nicht aufgebraucht.

### **5.3.2 Der Einfluss des Glutamin-Plasma-Spiegels auf die T-Zell induzierte inflammatorische Antwort**

Wie schon in der Einleitung geschildert, spielt Glutamin in der Immunabwehr eine erhebliche Rolle. Es ist in zahlreiche Stoffwechselreaktionen eingebunden, wie der Energiebereitstellung, der Proliferation und der Proteinsynthese.

Operationen am Herzen lösen eine starke inflammatorische Antwort mit wichtigen klinischen Auswirkungen aus. Um diese zu minimieren, verfolgt man verschiedenen Strategien. Dazu gehören neben der Optimierung der präoperativen Faktoren wie Einstellung der Grunderkrankung des Patienten auch die intraoperativen Techniken [71]. Es liegen bereits wichtige experimentelle wie klinische Hinweise vor, die darauf hindeuten, dass durch eine geeignete Zufuhr von immunmodulierenden Substraten die Intensität der zu erwartenden Zustandsänderungen im Sinne des SIRS gedämpft werden können. In verschiedenen Studien wurden das Proliferationsverhalten und die Ausschüttung einzelner lymphozytärer Zytokine der T-Lymphozyten mit teilweise unterschiedlichen Glutaminkonzentrationen erfasst. Daneben konnte aber auch eine signifikante Reduktion der proinflammatorischen Zytokine unter septischen Konstellationen durch eine Glutaminsubstitution erreicht werden [119, 123]. Dementsprechend müsste ein therapeutischer Nutzen auf die inflammatorische Antwort durch eine Reduktion der proinflammatorischen Zytokine erreicht werden. Verschiedene Studien konnten den prognostisch ungünstigen Verlauf zwischen hohe IL-6 sowie TNF- $\alpha$ -Spiegel und einem negativen klinischen Outcome aufzeigen [18].

Eine verstärkte proinflammatorische Reaktion wurde am ersten postoperativen Tag durch eine erhöhte Konzentration von an IL-6 gemessen. Dies kann als eine physiologische Reaktion betrachtet werden, da die eingesetzten Medikamente sowie Materialien der extrakorporalen Zirkulation als Antigene wirken. Am zweiten postoperativen Tag konnten erniedrigte TNF- $\alpha$ -Spiegel erfasst werden. Da es zu keiner beobachteten klinischen Veränderung kam, ist von keiner relevanten immunologischen Reaktion auszugehen. Die ermittelten postoperativen Werte der von den T-Zell-abstammenden Zytokine IL-6 und TNF- $\alpha$  zeigten keine Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen auf.

In der Glutamingruppe konnte ein signifikant erhöhter Glutamin-Plasma-Spiegel ermittelt werden, ohne dass ein Effekt auf die T-Zell induzierte inflammatorische Antwort des kardiochirurgischen Patientenkollektivs erzielt werden konnte. Die systemische Inflammation wurde in dieser Studie durch das C-reaktive Protein, dem SOFA-Score als auch der kardiovaskulären Zirkulation, Beatmungszeit und Intensivliegezeit erfasst. Ein Aus-

bleiben einer Reaktion lässt sich dadurch erklären, dass zu keinem Zeitpunkt ein Substratmangel bestand, welcher die Funktion der Zellen beeinträchtigte oder eine Reduktion der proinflammatorischer Zytokine erzielte.

#### **5.4 Auswirkungen der Glutaminnutrition auf das klinische Outcome bei kardiochirurgischen Patienten**

Die Wirkungsweise von Glutamin im Organismus kann anhand von Laborparametern verifiziert werden. Für die Klinik ist es jedoch aufschlussreicher, den klinischen Verlauf zu beobachten und die möglicherweise aufgetretenen Outcomeparameter mit biochemischen Werten in Verbindung zu bringen. Dies kann eine Erklärung über das Entstehen eines klinischen Bildes erbringen, aber auch erneute Fragen aufwerfen, wenn Klinik und biochemische Größen nicht übereinstimmen [47].

Die nach einem HLM-Einsatz ablaufende kontrollierte, selbstlimitierende inflammatorische Antwort hat einen günstigen Effekt auf das Immunsystem. Dies ist bedeutend für die Verhinderung von perioperativen Infektionen und den fördernden Einfluss der Wundheilung. Folglich zeigte eine unkontrollierte Inflammation eine deutlich erhöhte Anzahl an Morbidität und Mortalität bei Patienten, die sich einen kardiopulmonalen Eingriff unterzogen [71]. Diese inflammatorische Reaktion ist postoperativ bei der Pathogenese des vasodilatatorischen Schocksyndroms mit einer Minderperfusion von Lunge, Herz, Gastrointestinaltrakt sowie dem nervalen System involviert. Dies kann wiederum zu einem konsekutiven Organversagen und einem möglichen letalen Resultat führen. Beim Einsatz einer extrakorporalen Zirkulation im Rahmen herzchirurgischer Eingriffe konnte in verschiedenen Studien eine ausgeprägten Inflammation erfasst werden, die jedoch nur bei einem geringen Anteil der Patienten zu klinischen Komplikationen und einer erhöhten Letalität führt. Schmartzs et al. [116] zeigten eine massive Endotoxinämie nach kardiopulmonalem Bypass ohne manifeste, nachteilige klinische Effekte. Wie bei Griffiths et al. [47] und Goeters et al. [44] fiel in dieser Studie keine Veränderung des Kurzzeit-Outcomes sowie der Krankenhausverweil- und Intensivstation-liegedauer auf. Ferner zeigte sich unter der erhöhten perioperativen Glutamingabe keine Veränderung der erhobenen Parameter wie C-reaktives Protein, SOFA-Score, der Beatmungszeit und Intensivstationsliegezeit auf. Durch die Substitution wurde keine Förderung der Inflammation erfasst, da es unter den Gruppen zu keiner signifikanten Veränderung im Outcome kam.

## 5.5 Konklusion

Bisher zeigte Glutamin vor allem bei kritisch Kranken, Verbrennungspatienten und Patienten nach großen Oberbaucheingriffen positive Effekte auf die bestehende Immunsuppression. Daher stellt sich die Frage, ob durch eine Glutaminsubstitution bei kardiochirurgischen Patienten die Inflammation gefördert wird. In dieser Untersuchung konnte keine Auswirkung einer hochdosierten perioperativen L-Alanyl-L-Glutamin-Nutrition auf die Generierung der pro- und antiinflammatorischer Zytokine gezeigt werden. Ein signifikanter Einfluss auf die systemische Inflammation, die Organdysfunktion sowie dem klinischen Outcome blieb aus. In diesem Patientenkollektiv war ein unkomplizierter postoperativer Verlauf ohne eine überschießende systemische Inflammationen durch eine verstärkte Freisetzung von inflammatorischen Zytokinen nachzuweisen.

Die parenterale Dosierung des Glutamins dürfte in dieser Studie einen ausbleibenden Effekt nicht erklären. Mit einer Gabe von 0,5 g/kg/Tag lag diese Dosierung über der von Novak et al. [121] in einer Meta-Analyse genannten mit 0,2 g/kg/Tag und der von Heyland et al. [55] mit 20 g/Tag. In einer Studie von Fürst et al. [41] wird eine Dosis von 13-20 g täglich bei Traumata und elektiven Eingriffen empfohlen, während Wilmore et al. [142] eine Dosis von 0,18-0,4 g/kg KG angibt. Dagegen erhielten hämatologische Patienten 40 g/Tag [106, 147].

Insgesamt ist zu bedenken, dass die Aussagekraft der meisten Studien hinsichtlich der Glutaminwirkung auf die Interleukine eingeschränkt ist, da es sich zumeist um *in vitro* Bedingungen handelt. Eine Übertragbarkeit auf die *in vivo* Verhältnisse ist nur begrenzt möglich. Wechselwirkungen zwischen unterschiedlichen Zellen oder Hormone sowie den veränderten Verhältnissen im Organismus werden *in vitro* nicht beobachtet.

Letztendlich entscheidend für die klinische Prognose ist die Balance zwischen antiinflammatorischen und proinflammatorischen Zytokine. Durch eine Anhebung des Glutaminspiegels konnte kein Effekt auf die T-Zell-induzierte pro- und antiinflammatorische Antwort des kardiochirurgischen Patientenkollektivs erzielt werden. Eine Erklärung für das Ausbleiben einer Reaktion lässt sich durch eine bestehende ausreichende Glutaminabdeckung dieser Zellen erklären. Somit ist der Einsatz der parenteralen Glutaminsubstitution im Rahmen von kardiochirurgischen Eingriffen möglich.

## 6. Zusammenfassung

In den letzten Jahren wurde über die Rolle der Ernährung für das Überleben von kritisch Erkrankten verstärkt diskutiert. Eine unzureichende Abdeckung des Nährstoffbedarfs erhöht die Morbidität und Mortalität. Besonders befasste man sich mit der Immunonutrition bei Patientengruppen nach großen Traumata oder operativen Eingriffen. Besonders vielversprechend erscheint die Aminosäure Glutamin als eine immunmodulierende Substanz. In den bisherigen experimentellen Studien konnte nachgewiesen werden, dass eine zusätzliche Glutaminapplikation die Produktion von T-Zell-abstammenden Zytokinen bei einem bestehenden Glutamindefizit erhöht. Daher stellt sich die Frage, ob durch die Substitution nicht nur eine Reduktion, sondern auch eine Verstärkung der Inflammation gefördert wird.

Herzchirurgische Operationen induzieren eine inflammatorische Antwort, wobei Endothelium, Myokard sowie Leukozyten als Erste reagieren. In dieser Studie wurde beobachtet, ob eine zusätzliche Glutaminapplikation bei Patienten, die sich einem elektiven kardiochirurgischen Eingriff mit einem kardiopulmonalen Bypass unterzogen, die Bildung pro- und antiinflammatorischer Zytokine von T-Zellen beeinflusst. Die Messung des prozentualen Anteils und die Analyse der T-Lymphozyten, welche intrazelluläre Zytokine produzieren, erfolgte an einem Fluoreszenzdurchflusszytometer. Neben der Veränderung des Glutamin-Plasma-Spiegels wurde die Inzidenz von Organfunktionsstörungen als auch das klinische Outcome beobachtet.

Für diese prospektive, randomisierte und doppelt verblindete Studie wurden drei Untersuchungsarme erstellt. Das Patientenkollektiv setzte sich aus 79 Patienten zusammen, von denen sich 31 in der Glutamin-, 27 in der Aminosäuren- und 21 in der Kontrollgruppe befanden. Den jeweiligen Patienten wurde vom Operationstag bis zum zweiten postoperativen Tag 0,5 g/kg KG Glutamin bzw. 0,835 g/kg KG Aminosäurenlösung bzw. NaCl-Lösung intravenös appliziert. Die Infusion wurde mit 1000 ml/ 24 h während der Narkoseeinleitung gestartet. Zu den Einschlusskriterien gehörten Patienten der elektiven Herzchirurgie mit einer extrakorporalen Zirkulation, einem Alter über 70 Jahre oder einer Ejektionsfraktion unter 40 %. Weitere Kriterien waren ein Mitralklappenersatz und eine absolute Lymphozytenzahl unter 1,2 Giga/l. Letzteres diente zur Darstellung einer eingeschränkten Immunkompetenz, wie auch eines potentiellen Ernährungsmangels. Hauptzielkriterium war die Ausschüttung der intrazellulären T-Zell-Zytokine Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), Interleukin-6 (IL-6), Interferon- $\gamma$  (INF-

$\gamma$ ) und Interleukin-4 (IL-4). Weiterhin wurden Nebenzielkriterien wie CRP, SOFA-Score, die Dauer der postoperativen Beatmung und das klinische Outcome beobachtet. Zum Ausgangspunkt war kein Unterschied in der Konzentration der intrazellulären Zytokine darstellbar. Während des Untersuchungsverlaufs zeigten sich keine Abweichung der T-zellabstammenden TNF- $\alpha$ , IL-6, INF- $\gamma$  und IL-4 im Gruppenvergleich.

Es zeigte sich, dass der Glutamin-Plasma-Spiegel in der Gruppe A ( $1177,3 \pm 351,9 \mu\text{M}$  am Ende der Operation und  $958,0 \pm 331,4 \mu\text{M}$  am ersten postoperativen Tag) im Vergleich zu Gruppe B ( $534,8 \pm 159,8 \mu\text{M}$  am Ende der Operation) und Gruppe C ( $610,0 \pm 138,3 \mu\text{M}$  am Ende der Operation) signifikanter angestiegen war.

Somit konnte nachgewiesen werden, dass ein durch parenterale Gabe erhöhter Glutamin-Plasma-Spiegel keinen Einfluss auf das komplexe Gleichgewicht zwischen pro- und antiinflammatorische T-Zell-Antwort und somit keine Konsequenz auf das hiesige Patientenkollektiv hatte. Eine zusätzliche Glutaminnutrition konnte keine signifikante Veränderung im klinischen Outcome aufzeigen. Damit scheint ein Einsatz von Glutamin auch im Rahmen kardiochirurgischer Eingriffe möglich.

#### ➤ **Abstract**

During the last few years there have been a lot of discussions about the role of nutrition for the surviving of critically sick persons. The understanding of the correlation about deficiency nutrition and higher mortality and morbidity was the beginning of immunonutrition in nutrition and critical care medicine. Especially effects of immunomodulatory substances on patients with multiple trauma or major operations were of special interest for a couple of studies. Increasing attention has been paid especially to the amino acid glutamine as an immunomodulating nutrient. Experimental studies gave evidence, that glutamine enhances the cytokine production of T cells in case of a glutamine deprivation. There is the question if high glutamine infusion provokes an inflammatory response.

Cardiac surgery provokes an inflammatory response for which the endothelium, the myocardium, and leukocytes are primarily responsible. In this study patients who had a cardiac surgery with a cardiopulmonary bypass to reveal the changes of anti-inflammatory and inflammatory T cell cytokines by a high-dose perioperative glutamine infusion were under observation. The measurement of the share and the analysis of the T cell and the intracellular interleukines were performed by a FACS. Furthermore the incidence of organ dysfunction and clinical outcome was observed.

For the prospective, randomised and double-blinded study a collective of 79 patients was divided into three groups: 31 persons in a high-dose glutamine group, 27 ones in an isonitrogenous, isocaloric, isovolemic nutritional solution group and 21 persons in a physiological NaCl 0,9 % control group. Starting with the day of operation to each patient received a dosis of 0,5 g/kg KG glutamine solution or 0,835 g/kg KG amino acid solution or NaCl infusion, respectively until the second post-operative day. The infusion started with 1000 ml/ 24 h after the induction of anaesthesia.

Definitions of inclusion criterions were: patients of cardiac surgery with extracorporeal circulation, aged older than 70 years or an ejection fraction less than 40 %, a mitral valve replacement and a lymphocyte number under 1,2 Giga/l. The latter shows a potential by low immunity and a deficiency of nutrition. Primary endpoint was the expression of intracellular T cell cytokines tumor-necrosis-factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin-6 (IL-6), interferon- $\gamma$  (INF- $\gamma$ ) and interleukin-4 (IL-4). Furthermore, the C- reactive protein, SOFA score, postoperative ventilation time, and clinical outcome were observed.

At the beginning of the study we noticed no differences between the concentrations of the intracellular cytokines. Moreover, there was no difference between the groups concerning TNF- $\alpha$ , IL-6, INF- $\gamma$  and IL-4. The other observed variables were comparable between the groups as well.

It was observed that the glutamine plasma level of group A ( $1177,3 \pm 351,9 \mu\text{M}$  at the end of operation and  $958,0 \pm 331,4 \mu\text{M}$  at the first postoperative day) was significantly higher than of group B ( $534,8 \pm 159,8 \mu\text{M}$  at the end of operation) and group C ( $610,0 \pm 138,3 \mu\text{M}$  at the end of operation).

There was no influence of glutamine on the balance of the pro- and antiinflammatory T cell in response to patients undergoing cardiac surgery. A high-dose perioperative glutamine infusion therefore showed no effect on the significant alteration on clinical outcome. Therefore, the use of glutamine in cardiac surgery seems practicable.

## 7. Literatur

1. Alexander JW (1995): Specific nutrients and the immune response. *Nutrition* 11: 229-232.
2. Andrews FJ, Griffiths RD (2002): Glutamin: essential für immune nutrition in the critically ill. *Br J Nutr* 87: 3-8.
3. Asemissen AM, Nagorsen D, Keilholz U, Letsch A, Schmittel A, Thiel E, Scheibenbogen C (2001): Flow cytometric determination of intracellular or secreted IFN $\gamma$  for the quantification of antigen reactive T cells. *J Immunol Methods* 251: 101-108.
4. Askanazi J, Carpentier YA, Michelsen CB, Elwyn DH, Furst P, Kantrowitz LR, Gump FE, Kinney JM (1980) Muscle and plasma amino acids following injury. Influence of intercurrent infection. *Ann Surg* 192: 78-85.
5. Bacchetta MD, Ko W, Girardi LN, Mack CA, Krieger KH, Isom W, Lee LY (2003) Outcome of cardiac surgery in nonagenarians: a 10-year experience. *Ann Thorac Surg* 75: 1215-20.
6. Bellamy R, Hill AV (1998): Genetic susceptibility to mycobacteria and other infectious pathogens in humans. *Curr Opin Immunol* 10: 483-487
7. Bertolo RFP, Pencharz PB, Ball RO (2000): Organ and plasma amino acids concentrations are profoundly different in piglets fed identical diets via gastrics, central venous or portal venous routes. *Nutr Metab* 130: 1261-1265.
8. Bircks W (2002) History of cardiac surgery in Germany - in consideration of her relation to the German Cardiac Society. *Z Kardiol* 91: 481-85.
9. Bloos F, Reinhart K (2003): Aktuelle Aspekte zur supportiven und adjuvanten Therapie der Sepsis. *Akt Ernähr Med* 28: 186-190.

10. Boelens PG, Nijveldt RJ, Houdijk AP, Meijer S, van Leeuwen PA (2001): Glutamine alimentation in catabolic state. *J Nutr* 131: 2569-2577.
11. Bone RC, Fisher CJ Jr, Clemmer TP, Slotman GJ, Metz CA, Balk RA (1987): A controlled clinical trial of high-dose methylprednisolone in the treatment of severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med* 317: 653-658.
12. Bossuyt X, Marti GE, Fleisher TA (1992): Comparative analysis of whole blood lysis methods for flowcytometry. *Cytometry* 30: 124-133.
13. Butler J, Chong GL, Baigrie RJ, Pillai R, Westaby S, Rucker GM (1992): Cytokine responses to cardiopulmonary bypass with membrane and bubble oxygenation. *Ann Thorac Surg* 53: 833-838.
14. Cabioglu N, Bilgic S, Deniz G, Aktas E, Seyhun Y, Turna A, Gunay K, Esen F (2002): Decreased cytokine expression in peripheral blood leukocytes of patients with severe sepsis. *Arch Surg* 137: 1037-1043.
15. Calder PC, Yaqoob P (1999): Glutamine and the immune system. *Amino Acids* 17: 227-241.
16. Cardona PD (1998): Administration of glutamine and its dipeptides in parenteral nutrition. Which patients are candidates? *Nutr Hosp* 13: 8-20.
17. Carter LL, Swain SL (1997): Single cell analyses of cytokine production. *Curr Opin Immunol* 9: 177-182.
18. Casey LC, Balk RA, Bone C (1993): Plasma cytokine and endotoxin levels correlate with survival in patients with the sepsis syndrome. *Ann Intern Med* 119: 771-778.
19. Cavaillon JM, Adib-Conquy M, Cloez-Tayarani I, Fitting C (2001): Immunodepression in sepsis and SIRS assessed by ex vivo cytokine production is not a generalized phenomenon: a review. *J Endotoxin Res* 7: 85-93.

20. Chakrabarti R (1998): Transcriptional regulation of the rat glutamin synthetase gene by tumor necrosis factor-alpha. *Eur J Biochem* 254: 70-74.
21. Chang WK, Yang KD, Shaio MF (1999): Effect of glutamine on Th1 and Th2 cytokine responses of human peripheral blood mononuclear cells. *Clin Immunol* 93: 294-301.
22. Chang WK, Yang KD, Chuang H, Jan JT, Shaio MF (2002): Glutamine protects activated human t-cells from apoptosis by up-regulating glutathione and bcl-2 levels. *Clin Immunol* 104: 151-60.
23. Clade H (2005): Herzchirurgie: Längere Wartelisten. *Dt Ärzteblatt* 102, 43: 2898 – 2450.
24. Curfs JH, Meis JF, Hoogkamp-Korstanje JA (1997): A primer on cytokines: sources, receptors, effects, and inducers. *Clin Microbiol Rev* 10: 742-780.
25. Curi R, Newsholme P, Newsholme EA (1986): Intracellular distribution of some enzymes of the glutamine utilisation pathway in rat lymphocytes. *Biochem. Biophys Res Commun* 138: 318-322.
26. De AK, Kodys KM, Pellegrini J, Yeh B, Furse RK, Bankey P, Miller-Graziano CL (2000): Induction of global anergy rather than inhibitory Th2 lymphokines mediates posttrauma T cell immunodepression. *Clin Immunol* 96: 52-66.
27. De Angeli S, Paccagnella A, Mordacchini M, Frugoni C, Zanardo G, Turolla L, Calo MA, Rosi P, Nieri A, Simini G (1994): The effects of prolonged cardiopulmonary bypass on cell-mediated immunity. *Thorac Cardiovasc Surg* 42: 14-20.
28. Deferrari G, Garibotto G, Robaudo C, Saffioti S, Russo R, Sala MR, Bruzzone M, Tizianello A (1994): Renal ammoniogenesis and interorgan flow of glutamine in chronic metabolic acidosis. *Contrib Nephrol* 110: 144.

29. Deng MC, Dasch B, Erren M, Mollhoff T, Scheld HH (1996): Impact of left ventricular dysfunction on cytokines, hemodynamics, and outcome in bypass grafting. *Ann Thorac Surg* 62: 184-190.
30. Fresenius Kabi AG (2006): Die Anfänge der enteralen Ernährung. <http://www.enteraleernaehrung.de/internet/kabi/enteral/entern.nsf/Content/Wie+alles+begann> (01.08.2006)
31. Dixon B, Santamaria JD, Campbell J (2003): Plasminogen activator inhibitor activity is associated with raised lactate levels after cardiac surgery with cardiopulmonary bypass. *Crit Care Med* 31: 1053-1059.
32. Dodrill FD (1959): The effects of total body perfusion upon the lungs. In: Allen J.G. (Hrsg.): *Extracorporeal Circulation*. IL Thomas, Springfield, 327-332
33. Drössler K, Gemsa D (2000): *Wörterbuch der Immunologie: Allgemeine und klinische Immunologie*. Auflage 3. Spektrum Akademischer Verlag, Berlin
34. Eagle H, Oyama VI, Levy M, Horton CL, Fleischman R (1956): The growth response of mammalian cells in tissue culture to L-glutamine and L-glutamic acid. *J Biol Chem* 218: 607-616.
35. Ehrensvar G, Fischer A, Stjernholm R (1949): Protein metabolism of tissue cells in vitro. The chemical nature of some obligate factors of tissue cell nutrition. *Acta Physiol Scand* 18: 218.
36. El Azab SR, Rosseel PM, De Lange JJ, Groeneveld AB, Van Strik R, Van Wijk EM, Scheffer GJ (2003): Effect of sevoflurane on the ex vivo secretion of TNF-alpha during and after coronary artery bypass surgery. *Eur J Anaesthesiol* 20: 380-384.
37. Engel JM, Mühling J, Junger A, Menges T, Kärcher B, Hempelmann G (2003): Enteral nutrition practice in a surgical intensive care unit: what proportion of energy expenditure is delivered enterally? *Clin Nutr* 22: 187-192.

38. Ferguson NR, Galley HF, Webster NR (1999): T-helper cell subset ratios in patients with severe sepsis. *Intensive Care Med* 25: 106-109.
39. Fish J, Sporay G, Becker K (1997): A prospective randomized study of glutamine-enriched parenteral nutrition compared with enteral feeding in postoperative patients. *Am J Clin Nutr* 65: 977-985.
40. Fürst P (1998): Old and new substrates in clinical nutrition. *J Nutr* 128:789-796.
41. Fürst P (2001): New developments in glutamine delivery. *J Nutr* 131: 2562-2568.
42. Fürst P, Albers S, Stehle P (1989): Availability of glutamine supplied intravenously as alanylglutamine. *Metabolism* 38: 67-72.
43. Gibbon JH Jr (1968): Development of Artificial Heart and Lung Extracorporeal Blood Circuit. *J Am Med Ass* 206: 1983-1986.
44. Goeters C, Wenn A, Mertes N, Wempe C, Van Aken H, Stehle P, Bone HG (2002): Parenteral L-alanyl- L-glutamine improves 6-month outcome in critically ill patients. *Crit Care Med* 30: 2032-2037.
45. Greten H, Herrmann R, Tichelli A, Drings P (2002): *Infektiologie, Immunologie*. In: Greten , Heiner (Hrsg.): *Innere Medizin*. Auflage 11. Thieme Verlag, Stuttgart, New York
46. Griffiths RD (1998): Nutrition and survival in intensive care. *Intensiv* 35: 3-9.
47. Griffiths RD, Allen KD, Andrews FJ, Jones C (2002): Infection, multiple organ failure, and survival in the intensive care unit: influence of glutamine-supplemented parenteral nutrition on acquired infection. *Nutrition* 18: 546-552.
48. Grimble RF, Howell WM, O'Reilly G, Turner SJ, Markovic O, Hirrell S, East JM, Calder PC (2002): The ability of fish oil to suppress tumor necrosis factor alpha production by peripheral blood mononuclear cells in healthy men is associated

with polymorphisms in genes that influence tumor necrosis factor alpha production. *Am J Clin Nutr* 76: 454-459.

49. Häussinger D (1993): Control of protein turnover by the cellular hydration state. *Ital J Gastroenterol* 25: 42-48.
50. Halperin ML, Ethier JH, Kamel KS (1990): The excretion of ammonium ions and acid base balance. *Clin Biochem* 23: 185-188.
51. Hammarqvist F, Luo JL, Cotgreave IA, Andersson K, Wernerman J (1997): Skeletal muscle glutathione is depleted in critically ill patients. *Crit Care Med* 25: 78-84.
52. Hammarqvist F, Wernerman J, Ali R, von der DA, Vinnars E (1989): Addition of glutamine to total parenteral nutrition after elective abdominal surgery spares free glutamine in muscle, counteracts the fall in muscle protein synthesis, and improves nitrogen balance. *Ann Surg* 209: 455-461.
53. Hauser GJ, Ben-Ari J, Colvin MP, Dalton HJ, Hertzog JH, Bearb M, Hopkins RA, Walker SM (1998): Interleukin-6 levels in serum and lung lavage fluid of children undergoing open heart surgery correlate with postoperative morbidity. *Intensive Care Med* 24: 481- 486.
54. Helwig M (2004): Fortschritte der enteralen und parenteralen Ernährung <http://www.magensonde.de/geschichte.htm> (04.08.2006)
55. Heyland DK, Novak F, Drover JW, Jain M, Su X, Suchner U (2001): Should immunonutrition become routine in critically ill patients? A systematic review of the evidence. *JAMA* 286: 944-953.
56. Hiesmayr MJ, Spittler A, Lassnigg A, Berger R, Laufer G, Kocher A, Artemiou O, Boltz-Nitulescu G, Roth E (1999): Alterations in the number of circulating leucocytes. phenotype of monocyte and cytokine production in patients undergoing cardiothoracic surgery. *Clin Exp Immunol* 115: 315-323.

57. Honore PM, Jacquet LM, Beale RJ, Renauld JC, Valadi D, Noirhomme Ph, Goenen M (2001): Effects of normothermie versus hypothermia on extravaskular lung water and serum cytokines during cardiopulmonary bypass. *Crit Med* 29: 1903-1909.
  
58. Houdijk APJ, Rijnsburger ER, Jansen J, Wesdorp RIC, Weiss JK, McCamish MA, Teerlink T, Meuwissen SGM, Haarman HJTM, Thijs LG, van Leeuwen PAM (1998): Randomized trial of glutamine-enriched enteral nutrition on infectious morbidity in patients with multiple trauma. *Lancet* 352: 772-76.
  
59. Houdijk AP, van Leeuwen PA, Boermeester MA, Van Lambalgen T, Teerlink T, Flinkerbusch EL, Sauerwein HP, Wesdorp RI (1994): Glutamine-enriched enteral diet increases splanchnic blood flow in the rat. *Am J Physiol* 267: 1035-1040.
  
60. Jackson NC, Carroll PV, Russel-Jones DL, Sönksen PH, Treacher DF, Umpleby AM (1999): The metabolic consequence of critical illness: acute effects on glutamin and protein metabolism. *Am J Physiol* 276: 163-170.
  
61. Janeway CA (2002): Die Erkennung von Antigenen, Die Entstehung des Rezeptorrepertoires von reifen Lymphozyten, Die adaptive Immunität. In: Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik M (Hrsg.): *Immunologie*. 5. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag GMBH, Heidelberg-Berlin, S.99-453.
  
62. Judel GK (2003): Die Geschichte von Liebigs Fleischextrakt - Zur populärsten Erfindung des berühmten Chemikers. *Spiegel der Forschung* 20: 7-16.
  
63. Kaufmann SHE (2005): *Immunologie*. In: Hahn H, Falke D, Kaufmann SHE, Ullmann U (Hrsg.): *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*. 5. Auflage. Springer Medizin Verlag. Heidelberg, 47-138.
  
64. Kharazmi A, Andersen LW, Baek L, Valerius NH, Laub M, Rasmussen JP (1989): Endotoxemia and enhanced generation of oxygen radicals by neutrophils from patients undergoing cardiopulmonary bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg* 98: 381-5.

65. Khogali SE, Pringle SD, Weryk BV, Rennie MJ (2002): Is glutamine beneficial in ischemic heart disease? *Nutrition* 18: 123-126.
66. Kircher B, Eibl G, Enrich B, Latzer K, Herold M, Niederwieser D (2002): The role of L-alanyl-L-glutamine in the immune response in vitro. *Wien Klin Wochenschr* 114: 702-708.
67. Kohler H, Hartig-Knecht H, Ruggeberg J, Adam R, Schroten H (2000): Lymphocyte proliferation is possible with low concentrations of glycyl-glutamine. *Eur J Nutr* 39: 103-105.
68. Kramer MD, Hänsch, Gertrud M, Schäfer B (1997): *Immunologie und Immunpathologie*. Ferdinand Enke-Verlag, Stuttgart.
69. Kudsk KA, Wu Y, Fukatsu K, Zarzaur BL, Johnson CD, Wang R, Hanna MK (2000): Glutamine enriched total parenteral nutrition maintains intestinal interleukin-4 and mucosal immunoglobulin A levels. *J Parenter Enteral Nutr* 24: 270-274.
70. Kuhlmann MK, Koehler H (2000): *Medizin aktuell: Strategien klinischer Ernährung II – Strategien zur Applikation von Aminosäuren – Katabolismus und Retention*. *Anaesthesist* 49: 353-358.
71. Laffey JG, Boylan JF, Cheng DCH (2002): The systemic inflammatory response to cardiac surgery. Implications for the anesthesiologist. *Anesthesiology* 97: 215-252.
72. Larsen R (1987): *Anästhesie*. Larsen R (Hrsg.). Auflage 2. Urban & Schwarzenberg München, Wien, Baltimore
73. Lee WH Jr, Krunhaar D, Fonkalrud EW, Schjeide OA, Malone JV Jr (1961): Denaturation of plasma proteins as a cause of morbidity and death after intracardiac operations. *Surgery* 50: 29-39.

74. Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, Cohen J, Opal SM, Vincent JL, Ramsay G (2001): SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Crit Care Med* 31: 1250-1256.
75. Li J, Kudsk KA, Janu P, Renegar KB (1997): Effect of glutamine-enriched total parenteral nutrition on small intestinal gut-associated lymphoid tissue and upper respiratory tract immunity. *Surgery* 121: 542-549.
76. Lochs H, Hubl W (1990): Metabolic basis for selecting glutamine-containing substrates for parenteral nutrition. *J Parenter Enteral Nutr* 14: 114-117.
77. Lowry SF (1993): Cytokine mediators of immunity and inflammation. *Arch Surg* 128: 1235-1241.
78. Maino VC, Picker LJ (1998): Identification of functional subsets by flow cytometry: intracellular detection of cytokine expression. *Cytometry* 34: 207-215.
79. Markewitz A, Faist E, Weinhold C, Lang S, Endres S, Hultner L, Reichart B (1993): Alterations of cellmediated immune response following cardiac surgery. *Eur J Cardiothorac Surg* 7: 193- 199.
80. Matsui M, Araya S, Wang HY, Onai N, Matsushima K, Saida T (2003): Circulating lymphocyte subsets linked to intracellular cytokine profiles in normal humans. *Clin Exp Immunol* 134: 225-231.
81. Mc Nerlan SE, Rea IM, Alexander HD (2002): A whole blood method for measurement of intracellular TNF-alpha, IFN-gamma and IL-2 expression in stimulated CD3+ lymphocytes: differences between young and elderly subjects. *Exp Gerontol* 37: 227-234.
82. Meister A (1984): New aspects of glutathione biochemistry and transport - selective alteration of glutathione metabolism. *Nutr Rev* 42: 397-410.

83. Menges T, Hermans PW, Little SG, Langefeld T, Böning O, Engel J, Sluijter M, de Groot R, Hempelmann G (2001): Plasminogen-activator-inhibitor-1 4G/5G promoter polymorphism and prognosis of severely injured patients. *Lancet* 357: 1096-1097.
84. Milewski PJ, Threlfall CJ, Heath DF, Holbrook IB, Wilford K, Irving MH (1982): Intracellular free amino acids in undernourished patients with or without sepsis. *Clin Sci* 62: 83-91.
85. Miller BE, Levy JH (1997): The Inflammatory Response to Cardiopulmonary Bypass. *J Cardiothorac Vasc An* 11: 355-366.
86. Moat NE, Shore DF, Evans TW (1993): Organ dysfunction and cardiopulmonary Bypass: The role of complement and complement regulatory proteins *Eur J Cardiothorac Surg* 7: 563-753.
87. Mohr FW (2002): Entwicklung der Kardiochirurgie in Deutschland  
<http://www.unileipzig.de/~herz/doc/geschichte.pdf#search=%22Herzchirurgie%20Geschichte%22> (15.07.2006)
88. Molina PE, Ajmal M, Abumrad NN (1998): Energy metabolism and fuel mobilization: from the perioperative period to recovery. *Shock* 9: 241-248.
89. Morlion BJ, Stehle P, Wachtler P, Siedhoff HP, Koller M, König W, Fürst P, Puchstein C (1998): Total parenteral nutrition with glutamine dipeptide after major abdominal surgery: a randomized, double-blind, controlled study. *Ann Surg* 227: 302-308.
90. Mühling J, Fuchs M, Dehne MG, Sablotzki A, Menges T, Weber B, Hempelmann G (1999): Quantitative determination of free intracellular amino acids in single human polymorphonuclear leucocytes. Recent developments in sample preparation and highperformance liquid chromatography. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 728: 157-166.

91. Muret J, Marie C, Fitting C, Payen D, Cavaillon JM (2000): Ex vivo T-lymphocyte derived cytokine production in SIRS patients is influenced by experimental procedures. *Shock* 13: 169-174.
92. Murphy T, Paterson H, Rogers S, Mannick JA, Lederer JA (2003): Use of intracellular cytokine staining and bacterial superantigen to document suppression of the adaptive immune system in injured patients. *Ann Surg* 238: 401-410.
93. Naldini A, Borrelli E, Carraro F, Giomarelli P, Toscano M (1999): Interleukin 10 production in patients undergoing cardiopulmonary bypass: evidence of inhibition of Th-1-type responses. *Cytokine* 11: 74-79.
94. Naldini A, Borrelli E, Cesari S, Giomarelli P, Toscano M (1995): In vitro cytokine production and T-cell proliferation in patients undergoing cardiopulmonary by-pass. *Cytokine* 7: 165-170.
95. Neidhardt R, Keel M, Steckholzer U, Safret A, Ungethuen U, Trentz O, Ertel W (1997) Relationship of interleukin-10 plasma levels to severity of injury and clinical outcome in injured patients. *J Trauma* 42: 863-870.
96. Newsholme P (2001): Why is L-glutamine metabolism important to cells of the immune system in health, postinjury, surgery or infection? *J Nutr* 131: 2515-2522.
97. Newsholme P, Procopio J, Lima MMR, Pithon-Curi TC, Curi R (2002): Glutamine and glutamate- their central role in cell metabolism and function. *Cell Biochem Funct* 21: 1-9.
98. Nieman D (1997): Immune response to heavy exertion. *J Appl Physiol* 82: 1385-1392.
99. Novak F, Heyland DK, Avenell A, Drover JW, Su X (2002): Glutamine supplementation in serious illness: a systematic review of the evidence. *Crit Care Med* 30: 2022-2029.

100. Ohri SK (1996): Systemic inflammatory response and the splanchnic bed in cardiopulmonary bypass. *Perfusion* 11: 200-212 .
101. O'Riordain MG, Fearon KC, Ross JA, Rogers P, Falconer JS, Bartolo DC, Garden OJ, Carter DC (1994): Glutamine-supplemented total parenteral nutrition enhances T-lymphocyte response in surgical patients undergoing colorectal resection. *Ann Surg* 220: 212-221.
102. Oudemans-van Straaten HM, Bosman RJ, Treskes M, van der Spoel HJ, Zandstra DF (2001): Plasma glutamine depletion and patient outcome in acute ICU admissions. *Intensive Care Med* 27: 84-90.
103. Panigrahi P, Gewolb ICH, Bamford P, Horvath K (1997): Role of glutamine in bacterial transcytosis and epithelial cell injury. *J Parenter Enteral Nutr* 21: 75-80.
104. Paparella D, Yau TM, Young E (2002): Cardiopulmonary bypass induced inflammation: pathophysiology and treatment. An update. *Eur J Cardiothorac Surg* 21: 232-244.
105. Parry-Billings M, Evans J, Calder PC, Newsholme EA (1990): Does glutamine contribute to immunosuppression after major burns? *Lancet* 336: 523-525.
106. Petersson B, Waller SO, Vinnars E, Wernerman J (1994): Longterm effect of glycyl-glutamine after elective surgery on free amino acids in muscle. *J Parenter Enteral Nutr* 18: 320- 325.
107. Puyana JC, Pellegrini JD, De AK, Kodys K, Silva WE, Miller CL (1998): Both T-helper-1 and T-helper-2-type lymphokines are depressed in posttrauma anergy. *J Trauma* 44: 1045-46.
108. Rohde T, MacLean DA, Klarlund PB (1996): Glutamine, lymphocyte proliferation and cytokine production. *Scand J Immunol* 44: 648-650.

109. Rosky LP, Rodman T (1966): Medical aspects of open-heart surgery. *N Engl J Med* 274: 833-840.
110. Rostaing L, Tkaczuk J, Durand M, Peres C, Durand D, de Preval C, Ohayon E, Abbal M (1999): Kinetics of intracytoplasmic Th1 and Th2 cytokine production assessed by flow cytometry following in vitro activation of peripheral blood mononuclear cells. *Cytometry* 35: 318-328.
111. Roth E, Funovics J, Muhlbacher F, Schemper M, Mauritz W, Sporn P, Fritsch A (1982): Metabolic disorders in severe abdominal sepsis: glutamine deficiency in skeletal muscle. *Clin Nutr* 1: 25-41.
112. Roth E, Karner J, Ollenschlager G (1990): Glutamine, an anabolic effector? *J Parenter Enteral Nutr* 14: 130-6.
113. Sablotzki A, Welters I, Lehmann N, Menges T, Görlach G, Dehne M, Hempelmann G (1997): Plasma levels of immunoinhibitory cytokines interleukin-10 and transforming growth factor-beta in patients undergoing coronary artery bypass grafting. *Eur J Cardiothorac Surg* 11: 763-768.
114. Sbrana S, Parri MS, De Filippis R, Gianetti J, Clerico A (2004): Monitoring of monocyte functional state after extracorporeal circulation: a flow cytometry study. *Cytometry* 58: 17-24.
115. Schauer U, Jung T, Krug N, Frew A (1996): Measurement of intracellular cytokines. *Immunol Today* 17: 305-306.
116. Schmartz D, Tabardel Y, Preiser JC, Barvais L, d'Hollander A, Duchateau J, Vincent JL (2003): Does aprotinin influence the inflammatory response to cardiopulmonary bypass in patients? *J Thorac Cardiovasc Surg* 125: 184-190.
117. Scrimshaw NS, Taylor CE, Gordon JE (1959): Interactions of nutrition and infection. *Am J Med Sci* 237: 367-403.

118. Seghaye MC, Grabitz RG, Duchateau J, Busse S, Dabritz S, Koch D, Alzen G, Hornchen H, Messmer BJ, Von Bernuth G (1996): Inflammatory reaction and capillary leak syndrome related to cardiopulmonary bypass in neonates undergoing cardiac operations. *J Thorac Cardiovasc Surg* 112: 687-697.
119. Slotwinski R, Slodkowski M, Pertkiewicz M (2002): Dynamic of IL-6 and IL-8 concentrations in patients after surgery treated with total parenteral nutrition. *Pol Merkuriusz Lek* 12: 45-48.
120. Souba WW, Smith RJ, Wilmore DW (1985): Effects of glucocorticoids on glutamine metabolism in visceral organs. *Metabolism* 34: 450-456.
121. Spittler A, Manhart N, Roth E. Immunologie und Ernährung (Immunonutrition). In: Biesalski HK, Fürst P, Kasper H, Kluthe R, Pöler W, Puchstein C, Stähelin HB (Hrsg.): *Ernährungsmedizin*. Thieme-Verlag, Stuttgart, New York, 313-330.
122. Stehle P, Zander J, Mertes N, Albers S, Puchstein C, Lawin P, Fürst P (1989): Effect of parenteral glutamine peptide supplements on muscle glutamine loss and nitrogen balance after major surgery. *Lancet* 1: 231-233.
123. Steinau F, Deja M, Wolf S, Busch T, Kaiser U (2002): Stellenwert immunnutritiver enteraler Ernährung in der Intensivmedizin. *Anaesthesist* 51: 843-52.
124. Stewart Burgher M (2004): World Health Organization: Food and health in Europe: a new basis for action - Summary. [www.euro.who.int/InformationSources/Publications/Catalogue/2004013008](http://www.euro.who.int/InformationSources/Publications/Catalogue/2004013008) (03.08.2006)
125. Stinnett JD, Alexander JW, Watanabe C, Elwyn DH, Furst P, Kantrowitz LR, Gump FE, Kinney JM (1982): Plasma and skeletal muscle amino acids following severe burn injury in patients and experimental animals. *Ann Surg* 75-89.
126. Strohmeyer JC (2006): Gestörte Homöostase von Inflammation und Antiinflammation bei Risikopatienten nach Herzchirurgie: Standardisiertes Im-

munmonitoring zur Prädiktion infektiöser Komplikationen. Med. Habilitationsschrift, Charité – Universitätsmedizin Berlin.

127. Studley HO (1936): Percentage of weight loss: a basic indicator of surgical risk in patients with chronic peptic ulcer. *JAMA* 106: 458-460.
128. Summer MH, Xavier MH, Gialho MB, Wannmacher CMD, Wajner M (1994): The influence of amino acid on mitogen-activated proliferation of human lymphocytes in vitro. *Int J immunopharmac* 16, 865-872.
129. Tazuke Y, Wasa M, Shimizu Y, Wang HS, Okada A (2003) : Alanine-glutamine-supplemented parenteral nutrition prevents intestinal ischemia-reperfusion injury in rats. *J Parenter Enteral Nutr* 27: 110-115.
130. Tepaske R, Velthuis H, Oudemans-van Straaten HM, Heisterkamp SH, van Deventer SJ, Ince C, Eysman L, Kesecioglu J (2001): Effect of preoperative oral immune-enhancing nutritional supplement on patients at high risk of infection after cardiac surgery: a randomised placebocontrolled trial. *Lancet* 358: 696-701.
131. Truneh A, Albert F, Golstein P, Schmitt-Verhulst AM (1985): Early steps of lymphocyte activation bypass by synergy  $Ca^{2+}$  ionophores and phorbol ester. *Nature* 313: 318-20.
132. Vinnars E, Hammarqvist F, von der Decken A, Wernerman J (1990): Role of glutamine and its analogs in posttraumatic muscle protein and amino acid metabolism. *J Parenter Enteral Nutr* 14: 125-129.
133. Volk HD, Reinke P, Docke WD (1999): Immunological monitoring of the inflammatory process: Which variables? When to assess? *Eur J Surg Suppl* 70-72.
134. Wachtvogel YT, Kucich U, Grennplate J, Gluszko P, Abrams W, Weinbaum G, Wenger RK, Rucinski B, Niewiarowski S, Edmunds LH Jr (1987): Human neutrophil degranulation during extracorporeal circulation. *Blood* 69: 324-330.

135. Wallace C, Keast D (1992): Glutamine and macrophage function. *Metabolism* 41: 1016-1020.
136. Walsh DS, Siritongtaworn P, Pattanapanyasat K, Thavichaigarn P, Kongcharoen P, Jiarakul N, Tongtawe P, Yongvanitchit K, Komoltri C, Dheeradhada C, Pearce FC, Wiesmann WP, Webster HK (2000): Lymphocyte activation after non thermal trauma. *Br J Surg* 87: 223-30.
137. Wan S, Le Clerc JL, Vincent JL (1997): Inflammatory Response to Cardiopulmonary Bypass. *Chest* 112: 676-692.
138. Weingartmann G, Fridrich P, Mauritz W, Gotzinger P, Mittlbock M, Germann P, Karner J, Roth E (1996): Safety and efficacy of increasing dosages of glycyl-glutamine for total parenteral nutrition in polytrauma patients. *Wien Klin Wochenschr* 108: 683-688.
139. Weiss A (2003): T-lymphocyte activation. In: Paul WE (Hrsg.): *Fundamental Immunologie*. 5. Auflage. Raven Press, New York.
140. Wernerman J, Hammarqvist F (1999): Glutamine: a necessary nutrient for the intensive care patient. *Int J Colorectal Dis* 14: 137-142.
141. Wilmore DW (2000): Metabolic response to severe surgical illness: overview. *World J Surg* 24: 705-711.
142. Wilmore DW (2001): The effect of glutamine supplementation in patients following elective surgery and accidental injury. *J Nutr* 131: 2543-2549.
143. Wischmeyer PE, Lynch J, Liedel J, Wolfson R, Riehm J, Gottlieb L, Kahana M (2001): Glutamine administration reduces Gram-negative bacteremia in severely burned patients: a prospective, randomized, double-blind trial versus isonitrogenous control. *Crit Care Med* 29: 2075- 2080.

144. Yamauchi-Takahara K, Ihara Y, Ogata A, Yoshizaki K, Azuma J, Kishimoto T (1995): Hypoxic stress induces cardiac myocyte-derived interleukin-6. *Circulation* 91: 1520-1524.
145. Yaqoob P, Calder PC (1998): Cytokine production by human peripheral blood mononuclear cells: differential sensitivity to glutamine availability. *Cytokine* 10: 790-794.
146. Young VR, Ajami AM (2001): Glutamine: The emperor or his clothes? *J Nutr* 131: 2449 – 2459.
147. Ziegler TR, Young LS, Benfell K, Scheltinga M, Hortos K, Bye R, Morrow FD, Jacobs DO, Smith RJ, Antin JH (1992): Clinical and metabolic efficacy of glutamine-supplemented parenteral nutrition after bone marrow transplantation. A randomized, double-blind, controlled study. *Ann Intern Med* 116: 821-828.

## 8. Anhang

### 8.1 Ergebnistabellen

#### 8.1.1 Ausgangswerte der intrazellulären Zytokindetektion

Dargestellt sind die Ausgangswerte der Patienten vor der Narkoseeinleitung (Tabelle 9).

**Tabelle 9:** Unstimulierte und stimulierte Ausgangswerte der Fluoreszenzintensität (%) der Patienten vor Narkoseeinleitung

Parameter	MW $\pm$ SD	Median	KI	p-Wert
<b>TNF-<math>\alpha</math> unstimuliert</b>	2,6 $\pm$ 1,9	2,2	[0,7 ; 4,5]	0,0009
<b>TNF-<math>\alpha</math> stimuliert</b>	46,0 $\pm$ 23,3	41,6	[23,1 ; 69,8]	0,8482
<b>IL- 6 unstimuliert</b>	4,1 $\pm$ 2,6	3,9	[1,5 ; 6,8]	0,0812
<b>IL- 6 stimuliert</b>	5,3 $\pm$ 1,6	5,0	[3,7 ; 6,9]	0,1829
<b>IFN-<math>\gamma</math> unstimuliert</b>	3,2 $\pm$ 2,4	2,8	[0,8 ; 4,6]	0,0001
<b>IFN-<math>\gamma</math> stimuliert</b>	25,4 $\pm$ 11,9	25,9	[11,9 ; 37,5]	0,0166
<b>IL- 4 unstimuliert</b>	4,1 $\pm$ 2,6	3,6	[1,5 ; 6,6]	0,0950
<b>IL- 4 stimuliert</b>	6,0 $\pm$ 1,6	5,9	[4,4 ; 7,6]	0,1698

p im Vergleich zu den ermittelten Normalwerten der Fluoreszenzintensität

MW = Mittelwert

SD = Standardabweichung

KI = Konfidenzintervall

### 8.1.2 Intrazelluläre Zytokindetektion

Folgend sind die Gesamtergebnisse der einzelnen intrazellulären Zytokine dargestellt.

Es gilt: }  $p < 0,05$  (Veränderung im zeitlichen Verlauf), PoT (postoperativer Tag)

**Tabelle 10:** Einfluss von Glutamin, Aminosäuren und NaCl 0,9 % auf die Fluoreszenzintensität (%) der TNF- $\alpha$  produzierenden T-Zellen

**TNF- $\alpha$  produzierende T-Zellen [%] (Mittelwert + Standardabweichung)**

	Glutamin	n	Aminosäuren	n	NaCl	n	p-Wert
<b>Präoperativ</b>	37,6 ± 22,8	22	36,9 ± 24,0	21	39,0 ± 23,6	16	$p = 0,966$
<b>Postoperativ</b>	40,2 ± 25,1	22	37,2 ± 25,4	21	40,4 ± 24,4	16	$p = 0,905$
<b>PoT 1</b>	37,2 ± 24,6	21	36,0 ± 23,3	20	40,1 ± 26,0	13	$p = 0,891$
<b>PoT 2</b>	34,2 ± 20,7	20	30,9 ± 18,0	21	36,1 ± 18,8	13	$p = 0,731$
<b>PoT 3</b>	32,2 ± 17,5	18	32,9 ± 19,7	17	35,2 ± 18,3	12	$p = 0,907$

**Tabelle 11:** Einfluss von Glutamin, Aminosäuren und NaCl 0,9 % auf die Fluoreszenzintensität (%) der IL-6 produzierenden T-Zellen

**IL-6 produzierende T-Zellen [%] (Mittelwert + Standardabweichung)**

	Glutamin	n	Aminosäuren	n	NaCl	n	p-Wert
<b>Präoperativ</b>	5,4 ± 2,2	22	5,3 ± 2,0	21	5,3 ± 2,0	20	$p = 0,986$
<b>Postoperativ</b>	5,2 ± 2,3	22	5,2 ± 2,3	21	5,3 ± 2,6	20	$p = 0,986$
<b>PoT 1</b>	6,2 ± 2,3	21	6,1 ± 2,5	20	6,1 ± 2,1	17	$p = 0,980$
<b>PoT 2</b>	5,5 ± 2,2	21	5,4 ± 2,1	21	5,5 ± 1,7	17	$p = 0,997$
<b>PoT 3</b>	5,5 ± 2,5	19	5,3 ± 2,0	18	5,3 ± 2,4	16	$p = 0,967$

**Tabelle 12:** Einfluss von Glutamin, Aminosäuren und NaCl 0,9 % auf die Fluoreszenzintensität (%) der IFN- $\gamma$  produzierenden T-Zellen

**IFN- $\gamma$  produzierende T-Zellen [%] (Mittelwert + Standardabweichung)**

	Glutamin	n	Aminosäuren	n	NaCl	n	p-Wert
<b>Präoperativ</b>	24,7 ± 13,1	22	23,7 ± 12,5	21	26,1 ± 12,9	20	$p = 0,834$
<b>Postoperativ</b>	24,1 ± 12,9	22	20,5 ± 8,0	21	22,2 ± 9,6	20	$p = 0,528$
<b>PoT 1</b>	25,5 ± 16,1	22	20,3 ± 9,8	20	24,1 ± 14,0	17	$p = 0,446$
<b>PoT 2</b>	22,6 ± 11,3	21	21,0 ± 7,9	20	21,8 ± 11,3	17	$p = 0,879$
<b>PoT 3</b>	21,8 ± 8,3	19	20,4 ± 8,6	17	22,7 ± 10,5	15	$p = 0,761$

**Tabelle 13:** Einfluss von Glutamin, Aminosäuren und NaCl 0,9 % auf die Fluoreszenzintensität (%) der IL-4 produzierenden T-Zellen

**IL-4 produzierende T-Zellen [%] (Mittelwert + Standardabweichung)**

	Glutamin	n	Aminosäuren	n	NaCl	n	p-Wert
<b>Präoperativ</b>	6,2 ± 2,2	21	6,2 ± 2,4	20	6,2 ± 2,4	20	p = 0,992
<b>Postoperativ</b>	5,8 ± 2,0	21	5,9 ± 1,9	20	6,0 ± 2,0	19	p = 0,940
<b>PoT 1</b>	6,5 ± 2,0	21	6,4 ± 1,8	20	6,3 ± 2,0	17	p = 0,967
<b>PoT 2</b>	5,8 ± 1,5	20	5,8 ± 2,4	20	5,8 ± 1,6	17	p = 0,994
<b>PoT 3</b>	4,6 ± 1,6	18	4,8 ± 1,3	17	4,8 ± 1,2	16	p = 0,873

### 8.1.3 Glutamin-Plasma-Spiegel

Es gilt: \* < 0,05 im Gruppenvergleich, } < 0,05 im Vergleich zum präoperativen Ausgang

**Tabelle 14:** Darstellung des Glutamin-Plasma-Spiegels [µM] (Mittelwert und Standardabweichung)

**Glutamin-Plasma-Spiegel**

	Glutamin	n	Aminosäuren	n	NaCl	n	p-Wert
<b>Präoperativ</b>	604,9 ± 144,2	23	578,8 ± 150,9	20	601,3 ± 83,4	20	p=0,784
<b>Postoperativ</b>	1177,3 ± 351,9*	23	534,8 ± 159,8	20	610,0 ± 138,3	20	p<0,01
<b>PoT 1</b>	958,0 ± 331,4*	23	526,8 ± 104,7	20	488,7 ± 104,0	20	p<0,01
<b>PoT 2</b>	753,1 ± 342,2*	23	492,9 ± 93,1	20	455,1 ± 75,9	20	p<0,01
<b>PoT 3</b>	524,9 ± 83,2*	23	470,6 ± 83,2	20	480,1 ± 46,5	20	p=0,04

## 8.1.4 Darstellung des klinischen Outcomes

**Tabelle 15:** Darstellung der Liegezeiten

	<b>Glutamin (n = 31)</b>	<b>Aminosäuren (n=27)</b>	<b>Kontrolle (n=21)</b>	<b>p-Wert</b>
<b>Intensivliegezeit [Tage]</b>	2,6 ± 2,0	2,2 ± 1,7	2,0 ± 1,2	p = 0,436
<b>Krankenhausliegezeit [Tage]</b>	9,1 ± 2,8	9,1 ± 3,2	9,2 ± 1,8	p = 0,989

## 8.1.5 Elutionsbedingungen des binären Gradientenelutionssystems

**Tabelle 16:** Elutionsbedingungen des binären Gradientenelutionssystems zur Analyse von Glutamin

<b>Zeit (min)</b>	<b>Puffer A</b>	<b>Puffer B</b>
0	97	3
3	97	3
3,1	100	0
37	70	30
63	0	100
67	97	3
<b>Puffer A:</b> 19 % Methanol, 81 % 0,05 M Acetat; pH 7,2		
<b>Puffer B:</b> 75 % Methanol, 25 % 0,05 M Acetat; pH 7,2		
<b>Flussrate:</b> 1ml/min <b>Druck:</b> 2900 PSI + 150 PSI (A: 97 % / B: 3 %) I PSI = 6894,76 Pa		
<b>Fluoreszenzdetektion:</b> Anregungswellenlänge: 300nm Emissionswellenlänge: 450nm		

## 8.2 Protokoll: Aufbereitung der Blutproben

Tabelle 17: Pipettierschema der Aktivierungskontrollen und Gerätekontrollen

Aktivierungskontrolle	Gerätekontrollen
<p><b>100 µl</b> der <b>Aktivierungskontrolle</b> mit <b>10 µl CD69PE</b> und <b>10 µl CD3PerCP</b> werden in ein Falcon-Röhrchen pipettiert</p>	<p><b>100µl unstimuliertes Blut</b> in jeweils 5 Falcon-Röhrchen pipettieren. Hinzugegeben werden:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Röhrchen: <b>ohne Zusatz</b></li> <li>2. Röhrchen: <b>10 µl γ2aFITC/γ1PE</b> und <b>10 µl CD3PerCP</b></li> <li>3. Röhrchen: <b>10 µl CD3FITC</b></li> <li>4. Röhrchen: <b>10 µl CD3PE</b></li> <li>5. Röhrchen: <b>10 µl CD3PerCP</b></li> </ol>
<p>Vorsichtig mischen und im Dunkeln bei Raumtemperatur <b>10 min</b> inkubieren</p>	<p>Vorsichtig mischen und im Dunkeln bei Raumtemperatur <b>10 min</b> inkubieren</p>
<p><b>2 ml FACS-Lysing-Solution</b> dazugeben</p>	<p><b>2 ml FACS-Lysing-Solution</b> dazugeben</p>
<p>Vorsichtig mischen und im Dunkeln bei Raumtemperatur <b>10 min</b> inkubieren</p>	<p>Vorsichtig mischen und im Dunkeln bei Raumtemperatur <b>10 min</b> inkubieren</p>
<p>Bei <b>500xg</b> für <b>5 min</b> zentrifugieren und den Überstand verwerfen</p>	<p>Bei <b>500xg</b> für <b>5 min</b> zentrifugieren und den Überstand verwerfen</p>
	<p><b>250 µl FACS-Permeabilizing-Lsg</b> dazugeben</p>
	<p>Vorsichtig mischen und im Dunkeln bei Raumtemperatur <b>10 min</b> inkubieren</p>
<p><b>2 ml PBS</b> hinzufügen</p>	<p><b>2 ml PBS</b> hinzufügen</p>
<p>Bei <b>500xg</b> für <b>5 min</b> zentrifugieren, den Überstand verwerfen und bis zur Messung im Dunkeln aufbewahren</p>	<p>Bei <b>500xg</b> für <b>5 min</b> zentrifugieren, den Überstand verwerfen und bis zur Messung im Dunkeln aufbewahren</p>

**Tabelle 18:** Pipettierschema der Permeabilitätskontrolle und Patientenproben

<b>Permeabilitätskontrolle</b>	<b>Patientenproben</b>
In das 1. Röhrcchen: <b>100 µl stimuliertes Blut</b> 2. Röhrcchen: <b>100 µl unstimuliertes Blut</b> pipettieren	Jeweils <b>100 µl unstimuliertes Blut</b> in 5 Falcon-Röhrcchen geben und ebenso mit <b>100 µl stimuliertem Blut</b> verfahren. Dann in alle 10 Röhrcchen <b>10 µl CD3PerCP</b> dazugeben
	Vorsichtig mischen und im Dunkeln bei Raumtemperatur <b>15 min</b> inkubieren
<b>2 ml FACS-Lysing-Solution</b> dazugeben	<b>2 ml FACS-Lysing-Solution</b> dazugeben
Vorsichtig mischen und im Dunkeln bei Raumtemperatur <b>10 min</b> inkubieren	Vorsichtig mischen und im Dunkeln bei Raumtemperatur <b>10 min</b> inkubieren
Bei <b>500xg</b> für <b>5min</b> zentrifugieren und den Überstand verwerfen	Bei <b>500xg</b> für <b>5min</b> zentrifugieren und den Überstand verwerfen
<b>250 µl FACS-Permeabilizing-Lösung</b> dazugeben	<b>250 µl FACS-Permeabilizing-Lösung</b> dazugeben
Vorsichtig mischen und im Dunkeln bei Raumtemperatur <b>10 min</b> inkubieren	Vorsichtig mischen und im Dunkeln bei Raumtemperatur <b>10 min</b> inkubieren
<b>2 ml PBS</b> hinzufügen	<b>2 ml PBS</b> hinzufügen
Bei <b>500xg</b> für <b>5 min</b> zentrifugieren und den Überstand verwerfen	Bei <b>500xg</b> für <b>5 min</b> zentrifugieren und den Überstand verwerfen
Jeweils <b>10 µl CD69PE</b> und <b>10 µl CD3PerCP</b> hinzupipettieren	Jeweils in un- und stimulierte Proben 1. Röhrcchen : <b>10 µl γ2aFITC/γ1PE</b> 2. Röhrcchen: <b>10 µl IL-4 PE</b> 3. Röhrcchen: <b>1 µl IL-6 PE</b> 4. Röhrcchen: <b>10 µl TNF-α PE</b> 5. Röhrcchen: <b>4 µl IFN-γ PE</b> hinzugeben
Vorsichtig mischen und im Dunkeln bei Raumtemperatur <b>30 min</b> inkubieren	Vorsichtig mischen und im Dunkeln bei Raumtemperatur <b>30 min</b> inkubieren
<b>2 ml PBS</b> hinzufügen	<b>2 ml PBS</b> hinzufügen
Bei <b>500xg</b> für <b>5 min</b> zentrifugieren, den Überstand verwerfen und bis zur Messung im Dunkeln aufbewahren	Bei <b>500xg</b> für <b>5 min</b> zentrifugieren, den Überstand verwerfen und bis zur Messung im Dunkeln aufbewahren

### 8.3 Protokoll: Vorbereitung der Reagenzien

Vor dem Beginn der Aufbereitung des Vollblutes wurden folgende benötigte Reagenzien vorbereitet (Tabelle 19):

✦ **Für die Aktivierung:**

▪ **Ionomycin**

Das Ionomycinpulver wird in Ethanol gelöst; die Lösung hat eine Konzentration von 0,5 mg/ml. Mit 2 ml Ethanol wird es in eine Konzentration von 0,5 mg/ml gebracht. Diese Stock-I Lösung kann in Aliquots bei einer Temperatur von 20°C gelagert werden. Bei Bedarf wird das aufgetaute Ionomycin mit PBS im Verhältnis 1:10 zu einer Stock-II- Lösung verdünnt. Die vorliegende Konzentration beträgt nun 0,05 µg/µl. Das Ionomycin wird in einer Endkonzentration von 1 µg/ml Vollblut verwendet. Pro Milliliter Blut entspricht dies 20 µl Stock-II- Lösung.

▪ **Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA)**

1 mg PMA-Pulver wird mit 10 ml Dimethylsulfoxid (DMSO) in eine Lösung gebracht. Die Konzentration der Lösung beträgt 0,1 mg/ml. Diese Stock-I-Lösung kann in 25 µl Aliquots bei einer Temperatur von -20°C aufbewahrt werden. Bei Bedarf wird das aufgetaute PMA mit PBS im Verhältnis 1:100 verdünnt. Die entstandene Stock-II- Lösung hat eine PMA-Konzentration von 1 ng/µl. Das PMA wird dann in einer Endkonzentration von 10 ng/µl Vollblut verwendet. Pro Milliliter Blut entspricht dies 10 µl Stock-II- Lösung.

▪ **Brefeldin-A (BFA)**

5 mg Pulver werden mit 1 ml DMSO in Lösung mit einer Konzentration von 5 mg/ml gebracht. Diese Stock-I-Lösung kann in 25 µl Aliquots bei einer Temperatur von -20°C gelagert werden. Bei Bedarf wird das aufgetaute BFA mit PBS im Verhältnis 1:10 zu Stock-II- Lösung verdünnt. Die vorliegende Konzentration beträgt nun 0,5 µg/µl. Das BFA wird in einer Endkonzentration von 10 µg/ml Vollblut verwendet. Pro Milliliter Blut entspricht dies 20 µl Stock-II-Lösung.

▪ **RPMI-1640**

Dieses Nährmedium wurde anwendungsfertig vom Hersteller bezogen und bei 2 bis 4°C gelagert.

**Tabelle 19:** Verdünnungsschema für die Stock-II-Lösungen

	<b>Stock-I-Lösung [µl]</b>	<b>PBS [µl]</b>	<b>Gesamtmenge Stock-II-Lösung [µl]</b>
<b>BFA 1:10</b>	10	90	100
<b>Ionomycin 1:10</b>	10	90	100
<b>PMA 1:100</b>	1	99	100

✦ **Für die Markierung und Reinigung:**

▪ **Phosphate buffered saline (PBS)**

PBS steril und gefiltert (bei Raumtemperatur gelagert).

▪ **Ethanol**

Ethanol wird bei Raumtemperatur aufbewahrt.

▪ **Monoklonale Antikörper, fluoreszenzmarkiert**

Lagerung bei 2 bis 4°C und in abgedunkelter Umgebung verarbeitet.

▪ **FACS-Lysing-Solution**

Die FACS-Lysing-Solution wird bei Raumtemperatur aufbewahrt und bei Bedarf mit Aqua bidest. im Verhältnis 1:10 verdünnt.

▪ **FACS-Permeabilizing-Solution**

Die FACS-Permeabilizing-Solution wird bei Raumtemperatur gelagert und bei Bedarf mit Aqua bidest. im Verhältnis 1:10 verdünnt.

## 8.4 Materialien

### 8.4.1 Fluoreszenzdurchflusszytometers

#### ➤ Geräte

- **Brutschrank BB 16**  
Heraeus Instruments, Hanau, Bestellnr.: 51010689
- **Durchflusszytometer FACSCalibur**  
Fa. Becton & Dickinson, Heidelberg
- **Laborzentrifuge Universal / K2S**  
Werknr.: 39366, Hettich Zentrifugen Tuttlingen
- **Macintosh Quadra 650®-Computer**, Firma Apple  
Software Analysesoftware CellQuest™, Firma Becton & Dickinson
- **Stoppuhr**  
Eurochron GmbH, Seebach / Thüringen, Modellnr.: 336/0001
- **Vortexer REAX 2000**  
Heidolph Instruments, Schwabach, Bestellnr.: 541.19000.00

#### ➤ Reagenzien für das Fluoreszenzdurchflusszytometers

- **FACSClean**  
Fa. Becton & Dickinson, Heidelberg, Katalognr.: 340345
- **FACSFlow**  
Fa. Becton & Dickinson, Heidelberg, Katalognr.: 342003
- **FACS-Lysing-Solution**, 100 ml, 10-fach konzentriert  
*1:10 mit Aqua dest. verdünnen, im Glas bei Zimmertemperatur aufbewahren*  
BD PharMingen, BD Biosciences, Fa. Becton & Dickinson, Heidelberg  
Katalognr.: 349202
- **FACS-Permeabilizing-Solution 2**, 10-fach konzentriert  
*1:10 mit Aqua dest. verdünnen, im Glas bei Zimmertemperatur aufbewahren*  
BD PharMingen, BD Biosciences, Fa. Becton & Dickinson, Heidelberg  
Katalognr.: 340973
- **FACSRinse**  
Fa. Becton & Dickinson, Heidelberg, Katalognr.: 340346

#### ➤ Reagenzien für die Aufbereitung

- **Aqua dest.**  
Fa. Baxter Deutschland GmbH, Bestellnr.: 001428

- **Brefeldin A (BFA), 5 mg**  
*bei 2 bis 8 °C aufbewahren, mit DMSO zur Konzentration von 5 mg/ml auflösen und bei -20°C mit 25 µl aufbewahren*  
 Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Katalognr.: B-7651
- **Dimethylsulfoxide (DMSO) 500ml**  
 Fa.: Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Katalognr.: D-8779
- **Ethanol (EtOH)**  
 Fa. Riedel-de Haën AG, Seelze, Bestellnr.: 32205
- **FastImmune**

γ2aFITC/γ1PE Isotypekontrolle	Katalognr.: 340458
CD3 FITC	Katalognr.: 345763
CD3 PE	Katalognr.: 345765
CD3 PerCP	Katalognr.: 345766
CD69 PE	Katalognr.: 341652
IL-1α PE	Katalognr.: 554561
IL-2 PE	Katalognr.: 559334
IL-8 PE	Katalognr.: 559336
IL-10 PE	Katalognr.: 559337

*bei 4°C im Dunkeln aufbewahren*  
 BD PharMingen, BD Biosciences, Fa. Necton & Dickinson, Heidelberg
- **Ionomycin, 1 mg**  
*bei 2 bis 8 °C aufbewahren, mit EtOH zur Konzentration von 0,5 mg/ml auflösen und bei -20°C aufbewahren*  
 Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Katalognr.: I-0634
- **Phosphate buffered saline (PBS), 500ml**  
*bei Raumtemperatur aufbewahren*  
 Fa. BAG Lich, Bestellnr.: 3613
- **Phorbol 12-Mystrate 13-Acetate (PMA), 5 mg**  
*bei 2 bis 8 °C aufbewahren, mit DMSO zur Konzentration von 0,1 mg/ml auflösen und bei -20 °C mit 25 µl aufbewahren*  
 Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Katalognr.: P-8139
- **RPMI-1640 Medium, 100 ml**  
 Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Bestellnr.: R-0883

#### ✦ **Verbrauchsmaterial**

- **Falcon Polystyrol-Röhrchen mit Deckel, 5ml, 12 x 75mm**  
Fa. Becton & Dickinson, Heidelberg, Bestellnr.: 352054
- **Falcon Polypropylen-Röhrchen, 50ml**  
Fa. Becton & Dickinson, Heidelberg, Bestellnr.: 352070
- **PrimavetteS mit Natrium-Heparinat Gel, 7,5ml**  
KABE Labortechnik GmbH, Nümbrecht-Elsenroth, Bestellnr.: 09592700
- **Reagenzröhrchen, 1,5ml, 39x10,8mm**  
Fa. Sarstedt, Nümbrecht, Bestellnr.: 72.690
- **Reagenzröhrchen, 10ml**  
Fa. Sarstedt, Nümbrecht, Bestellnr.: 55.468
- **Spitzen für Pipette, 0,5-10µl**  
Bestellnr.: 70.1115
- **Spitzen für Pipette, 10-100µl**  
Bestellnr.: 70.760.002
- **Spitzen für Pipette, 100-1000µl**  
Bestellnr.: 70.762  
Fa. Sarstedt, Nümbrecht
- **Variable Mikroliterpipette, 0,5-10µl**  
Bestellnr.: 4910 000.018
- **Variable Mikroliterpipette, 10-100µl**  
Bestellnr.: 4910 000.042
- **Variable Mikroliterpipette, 100-1000µl**  
Bestellnr.: 4910 000.069  
Fa. Eppendorf, Hamburg

#### 8.4.2 **Fluoreszenz-Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatografie**

##### ✦ **Geräte**

- **Zentrifuge Rotixa / KS®, Tuttlingen**
- **Fluoreszenz-Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie (F-HPLC)**  
**Hydrostatische Gradientenpumpe, 600 EA, Waters, USA**  
**Fluoreszenz Spectromonitor RF-530A, Shimadzu, Japan**  
**Rheodyne Injektionsventil und eine 100 µl Probenschleife**  
AS 300A, Sunchrom, Germany

**Software** EuroChrom 2000A Knauer, Germany

- **Gefriertrocknung unter Hochvakuum**

bei -80°C, CIT-2<sup>®</sup>, Heraeus, Hanau

- **Reagenzien**

- **Standardextraktionspuffer**

Gemisch von 80 % „Methanol für die HPLC“ und 20 % „H<sub>2</sub>O für die HPLC“

Merck, Darmstadt

- **o-Phthaldialdehyd-Mercaptoethanol-Reagenz**

OPA, Merck, Darmstadt, Germany

- **0,5 M Boratpuffer und 0,75 N HCL**

Merck, Darmstadt, Germany

- **Homoserin**

Konzentration von 4 µg/ml, Sigma, Deisenhofen

- **Puffer A:** 19 % Methanol – 81 % 0,05 M Acetat – pH 7,2

**Puffer B:** 75 % Methanol – 25 % 0,05 M Acetat – pH 7,2

- **Einwegmaterial**

- **Probengefäß**

2-CRV<sup>®</sup> Chromacoll, Trumbull, USA

## 8.5 Abbildungsverzeichnis

	<b>Seite</b>
<b>Abbildung 1</b> Aufbau des Fluoreszenzdurchflusszytometers modifiziert nach <a href="http://www.facslab.toxikologie.uni-mainz.de/Alphabet.jsp">http://www.facslab.toxikologie.uni-mainz.de/Alphabet.jsp</a> (06.07.2006)	<b>31</b>
<b>Abbildung 2</b> Hydrodynamische Fokussierung modifiziert nach <a href="http://www.uni.kontanz.de/FuF/Bio/research/Arbeitsgruppen/Groettrup/Homepage/Skripte/Teaching/Flow%20cytometry.pdf">http://www.uni.kontanz.de/FuF/Bio/research/Arbeitsgruppen/ Groettrup/Homepage/Skripte/Teaching/Flow%20cytometry.pdf</a> (06.07.2006)	<b>32</b>
<b>Abbildung 3</b> Optische Anordnung des FACSCalibur modifiziert nach <a href="http://www.facslab.toxikologie.uni-mainz.de/Alphabet.jsp">http://www.facslab.toxikologie.uni-mainz.de/Alphabet.jsp</a> (06.07.2006)	<b>33</b>
<b>Abbildung 4</b> Streulichtdarstellung modifiziert nach Purdue University Cytometer Laboratories <a href="http://www.hmc.psu.edu/core/flow/overview.htm">http://www.hmc.psu.edu/core/flow/overview.htm</a> (06.07.2006)	<b>34</b>
<b>Abbildung 5</b> Aktivierungskontrolle, Originalregistrierung	<b>37</b>
<b>Abbildung 6</b> Analyse der Patientenprobe mit markierten IL-4, Originalregistrierung	<b>38</b>
<b>Abbildung 7</b> Funktionsschema eines F-HPLC modifiziert nach <a href="http://www.ruhr-uni-bochum.de/anachem/Zinn/Utrm/versuch10/vers10.pdf">http://www. ruhr-uni-bochum.de/anachem/Zinn/Utrm/versuch10/vers10.pdf</a> (07.07.2006)	<b>40</b>
<b>Abbildung 8</b> Untersuchungsprofil des Patientenkollektivs	<b>45</b>
<b>Abbildung 9</b> Unstimulierte und stimulierte Ausgangswerte der Fluoreszenzintensität (%) vor Narkoseeinleitung	<b>51</b>
<b>Abbildung 10</b> Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$	<b>52</b>
<b>Abbildung 11</b> Interleukin-6	<b>53</b>
<b>Abbildung 12</b> Interferon- $\gamma$	<b>53</b>
<b>Abbildung 13</b> Interleukin-4	<b>54</b>
<b>Abbildung 14</b> Verlauf des Glutamin-Plasma-Spiegels	<b>55</b>
<b>Abbildung 15</b> Klinisches Outcome	<b>55</b>

## 8.6 Tabellenverzeichnis

		Seite
<b>Tabelle 1</b>	Zytokine modifiziert nach [33, 61, 63, 71]	22
<b>Tabelle 2</b>	Zeitpunkte der Blutabnahmen	26
<b>Tabelle 3</b>	Aktivierungsprozess der heparinisierten Vollblutproben	30
<b>Tabelle 4</b>	Absorptions- und Emissionsmaxima der verwendeten Fluoreszenzen	35
<b>Tabelle 5</b>	Patientencharakteristika nach Untersuchungsorten	46
<b>Tabelle 6</b>	Patientencharakteristika nach Untersuchungsarmen	46
<b>Tabelle 7</b>	Operationscharakteristika	48
<b>Tabelle 8</b>	Erhobene Parameter	50
<b>Tabelle 9</b>	Unstimulierte und stimulierte Ausgangswerte der Fluoreszenzintensität (%) der Patienten vor Narkoseeinleitung	90
<b>Tabelle 10</b>	Einfluss von Glutamin, Aminosäuren und NaCl 0,9 % auf die Fluoreszenzintensität (%) der TNF- $\alpha$ produzierenden T-Zellen	91
<b>Tabelle 11</b>	Einfluss von Glutamin, Aminosäuren und NaCl 0,9 % auf die Fluoreszenzintensität (%) der IL-6 produzierenden T-Zellen	91
<b>Tabelle 12</b>	Einfluss von Glutamin, Aminosäuren und NaCl 0,9 % auf die Fluoreszenzintensität (%) der IFN- $\gamma$ produzierenden T-Zellen	91
<b>Tabelle 13</b>	Einfluss von Glutamin, Aminosäuren und NaCl 0,9 % auf die Fluoreszenzintensität (%) der IL-4 produzierenden T-Zellen	92
<b>Tabelle 14</b>	Darstellung des Glutamin-Plasma-Spiegels [ $\mu$ M] (Mittelwert und Standardabweichung)	92
<b>Tabelle 15</b>	Darstellung der Liegezeiten	93
<b>Tabelle 16</b>	Elutionsbedingungen des binären Gradientenelutionssystems zur Analyse von Glutamin	93
<b>Tabelle 17</b>	Pipittierschema der Aktivierungskontrollen und Gerätekontrollen	94
<b>Tabelle 18</b>	Pipittierschema der Permeabilitätskontrolle und Patientenproben	95
<b>Tabelle 19</b>	Verdünnungsschema für Stock-II-Lösungen	97

## 8.7 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACB	Aorto coronary bypass
APZ	Antigenpräsentierenden Zellen
ASA	American Society of Anesthesiologists
BFA	Brefeldin-A
BMI	Body mass Index
C	Celsius
CD	Cluster of differentiation
CHE	Cholinesterase
CI	Cardiac Index
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
Con A	Concanavalin A
CPB	Cardiopulmonary bypass
CRH	Corticotropin-Releasing-Hormon
CRP	C-reaktives Protein
d	Tage
dl	Deziliter
DMSO	Dimethylsulfonid
DTH	Delayed-type hypersensitivity
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EF	Ejektionsfraktion
EKZ	Extrakorporale Zirkulation
ELISA	Enzyme linked immunoassay
FACS	Fluoreszenzdurchflusszytometer
FCS	Forwardscatter
F-HPLC	Fluoreszenz-Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie
FITC	Fluoreszein-Isothiocyanat
FL	Fluorochrome

g	Gramm
Giga	$10^9$
GOT	Glutamat-Oxalacetat-Transaminase
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase
h	Stunde
H <sub>2</sub> O	Wasser
HLM	Herz-Lungen-Maschine
HPLC	High pressure liquid chromatography
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
kDa	kilo Dalton
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
l	Liter
LPS	Lipopolysaccharid
LVEDP	Linksventrikulärer enddiastolischer Druck
M	Molare Konzentration
mg	Milligramm
MHC	Major histokompatibility complex
min	Minute
MKE	Mitralklappenersatz
ml	Milliliter
μ	mikro
n	Gesamtzahl
NaCl	Natriumchlorid
NaN <sub>3</sub>	Natriumazid
NK	Natürliche Killerzellen

Nr	Nummer
paCO <sub>2</sub>	Partieller Kohlenstoffdioxid
PBS	Phosphat buffered saline
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridin Chlorophyll Protein
PHA	Phytohämagglutinin
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat
PMT	PhotoMultiplierTube
PoT	Postoperativer Tag
RIA	Radioimmunoassay
RPC	Reversed phase chromatographie
SIRS	Systemic Inflammatory Response Syndrome
SOFA	Sequential Organ Failure Assessment
SSC	Sidescatter
Tab.	Tabelle
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TPN	Totale parenterale Nutrition
TZR	T-Zell-Rezeptor
U	Units

**Der Lebenslauf wurde aus der elektronischen  
Version der Arbeit entfernt.**

**The curriculum vitae was removed from the  
electronic version of the paper.**

## 10. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die mir bei der Erstellung meiner Doktorarbeit behilflich waren.

Mein besonderer Dank geht an **Herrn Prof. Dr. med. Dr. h. c. Gunter Hempelmann** für die Gewährung der wissenschaftlichen Mitarbeit in der Abteilung Anästhesiologie, Intensivmedizin und Schmerztherapie in der Universitätsklinik Gießen und Marburg, Standort Gießen.

Ich möchte mich ebenso recht herzlich bei **Herrn PD Dr. med. J. M. Engel** bedanken, der mir diese interessante Dissertation ermöglicht hat und ständig hilfsbereit mit Rat und Tat zur Seite stand. Seine konstruktiven Vorschläge, seine Freundlichkeit und seine Ausdauer haben mich über die gesamte Arbeit hin bekleidet.

Nicht zu vergessen sind **Herr Prof. Dr. med. J. Mühling** und **Frau B. Weber** sowie deren **Abteilungen**, welche mir hilfreich bei labortechnischen und analytischen Problemen zur Seite standen.

Auch den Mitarbeiter des **Statistik-Büros Mogk & Partner in Gießen**, bin ich zu Dank verpflichtet.

Mein Dank gilt **meiner Familie** für ihren Beistand und Bemühungen, welche mir das Studium und diese Dissertation ermöglichten.

Last but not least möchte ich meine **Freunde** erwähnen, die mich über das Studium begleitet und ermutigt haben.

## **11. Erklärung**

Ich erkläre:

„Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe.

Alle Textstellen, die wortwörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündliche Auskünfte beruhen, sind als solche kenntlich gemacht.

Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der 'Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis` niedergelegt sind, eingehalten.“