

Aus der Universitätsklinik und Poliklinik für Anaesthesiologie
An der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
(Direktor: Prof. med. Radke)



Einfluß von L-Glutamin, L-Alanin und N(2) –L-Alanyl-L-Glutamin auf die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen in humanen Monozyten

Dissertation
Zur Erlangung des akademischen Grades
Dr. der Medizin (Dr. med)

Vorgelegt der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Carolina Dorothea Schinke
geboren am 26. 06. 1980 in Köln

Betreuer: PD Dr. med. Armin Sablotzki

Gutachter:
PD Dr. med. Armin Sablotzki
Prof. Dr. med habil A. Weimann
Prof. Dr. med. Stefan Grond

Datum der Verteidigung: 15.01.2007

urn:nbn:de:gbv:3-000011400

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000011400>]

Referat und bibliographische Beschreibung

Zielsetzung: Monozyten spielen eine zentrale Rolle in der Pathophysiologie von Inflammation und Sepsis (8). Sie gelten als Hauptproduzenten der pro-inflammatorischen Zytokine Interleukin (IL)-6, IL-8 und Tumor Nekrose Faktor (TNF)- α . In bisherigen Studien konnte gezeigt werden, dass die Aminosäure Glutamin die Morbidität und Mortalität von Sepsispatienten reduzieren kann; ein Grund für die Verbesserung des Outcomes ist der modulierende Einfluss des Glutamins auf die Zytokin Produktion. Glutaminlösungen werden meist in Kombination mit Alanin, als Dipeptid, substituiert. Der Einfluss des Alanins auf die Zytokin Produktion ist in der heutigen Literatur noch nicht beschrieben. In dieser Studie wurde der Effekt von Glutamin, Alanin und des Dipeptides Glutamin-Alanin (Gln-Ala) auf die intrazelluläre Zytokinexpression von Monozyten untersucht. Im Rahmen eines *in vitro* Modells wurden die Monozyten mit niedrig dosiertem LPS stimuliert, um eine gram-negative Sepsis zu simulieren. Mit Hilfe der Durchflusszytometrie (FACS) konnte die Wirkung der Aminosäuren auf die Zytokinexpression dargestellt werden.

Methoden: Vollblut von 12 gesunden Probanden wurde mit LPS und den drei verschiedenen Aminosäurelösungen (1.Gln, 2.Ala, 3.Ala-Gln) in verschiedenen Konzentrationen für drei Stunden inkubiert. Mit Hilfe der Mehrfarbendurchflusszytometrie wurden CD14⁺ Monozyten im Vollblut phänotypisiert und deren intrazelluläre IL-6, IL-8 und TNF- α Expression gemessen.

Ergebnisse: Die **IL-6** Produktion wird unter Glutamin (2mM&5mM) signifikant verringert ($p < 0,05$) und durch Alanin (2mM&5mM) signifikant erhöht ($p < 0,05$). Das Dipeptamin Ala-Gln (1mM,2mM&5mM) beeinflusst die IL-6 Expression nicht signifikant. **TNF- α** wird durch alle untersuchten Aminosäurelösungen signifikant reduziert ($p < 0,05$). Dabei ist der Grad der TNF- α Inhibition beim Dipeptamin am ausgeprägtesten (40%↓) und beim Alanin am geringsten (18%↓). Die **IL-8** Produktion wird durch keine der untersuchten Aminosäuren signifikant beeinflusst.

Schlussfolgerung: Die intrazellulär gemessene Zytokin Expression in Monozyten wird durch die untersuchten Aminosäurelösungen in unterschiedlicher Weise beeinflusst. Die Wirkung des Glutamins sind mit Literaturdaten aus *in vivo*, bzw. *in vitro* Experimenten vergleichbar. Der hemmende Einfluß des Glutamins auf die pro-inflammatorische Zytokinproduktion könnte von therapeutischem Vorteil während einer Sepsis und des septischen Schocks sein. Über den Einfluß von Alanin auf die Interleukinproduktion ist in der heutigen Literatur kaum etwas beschrieben worden. Über einen möglichen klinischen Nutzen kann daher nur spekuliert werden.

Schinke, Carolina: Einfluß von Glutamin und Alanin auf die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen in Monozyten

Halle, Univ., Med Fak., Diss, Statistik Seiten, 2006

Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole

7AAD 7Aminoactinomycin D

Abb Abbildung

ACCP American College of Chest Physicians

ACTH Adreno Cortico Tropes Hormon

Ala Alanin

APACHE acute physiology and chronic health evaluation

BCG Bacillus Calmette Guerin

BPH Benigne Prostata Hyperplasie

BFA Brefeldin A

BP Bindungsprotein

CARS compensatory antiinflammatory reaction syndrome

CD cluster of differentiation

Con A Concavalin A

E Escherichia

ED₅₀ Effektdosis₅₀

ELISA Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay

FACS Durchflusszytometrie

FITC Fluoreszinoisothiocyanath

FL Fluoreszenzkanal

FSC forward scatter

g Erdanziehungskraft

Gln Glutamin

Gly Glycin

HLA Human Leucocyte Antigen

IFN Interferon

Ig Immunglobulin

IL Interleukin

Kon Kontrolle

LAF lymphocyte activating factor

LPS Lipopolysaccharid

mean Mittelwert

MFI Mittlere Fluoreszenz Intensität

MHC major histocompatibility complex

min Minuten

M Molar

MOV/MOF Multiorganversagen/Multi Organ Failure
MODS Multiorgan dysfunktionssyndrom
NF Nuclear Factor
NK Natürliche Killerzellen
PBMC Peripheral Blood Mononuclear Cell
PE Phycoerythrin
RhAPC rekombinantes Aktiviertes Protein C
RhTFPI rekombinanter Tissue Factor Pathway Inhibitor
RIA Radio Immuno Assay
ROI Region Of Interest
RPMI
SEM Standardfehler des Mittelwertes
SCCM
SIRS systemic inflammatory response syndrome
SSC side scatter
Std Stunden
T₅₀ Halbwertszeit
Tab Tabelle
TGF tumor growth factor
Th-Zellen T-Helferzelle
TLR toll like receptor
TNF- α Tumor Nekrose Faktor
vs versus

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung.....	1
1.1 Das Immunsystem.....	1
1.1.1 Monozyten	1
1.1.2 Aktivierung von Monozyten.....	1
1.1.3 Sekretorische Fähigkeiten der Monozyten.....	2
1.2 Zytokine.....	2
1.2.1 Interleukin-6.....	2
1.2.2 Interleukin-8.....	3
1.2.3 Tumor Nekrose Faktor- α	3
1.3 Sepsis und SIRS	4
1.3.1 Monozyten und Zytokine in der Sepsis.....	5
1.4 Immunnutrition.....	7
1.4.1 Glutamin.....	7
1.4.2 Ala-Gln als Dipeptid.....	8
1.4.3 Alanin.....	9
2 Zielstellung.....	10
3 Material und Methodik.....	11
3.1 Arbeitsmaterial und Chemikalien.....	11
3.2 Durchflusszytometrie, FACS.....	12
3.2.1 Aufbau und Funktion eines Durchflusszytometers.....	12
3.3 Vollblutprobengewinnung und Lagerung.....	15
3.4 Prinzip der intrazellulären Zytokinbestimmung mittels FACS-Analytik.....	15
3.4.1 LPS Stimulation und Inkubation.....	16
3.4.2 Monozyten Phänotypisierung.....	16
3.4.3 Fixierung und und Permeabilisierung.....	16
3.4.4 Intrazelluläre Zytokinfärbung.....	17
3.5 Detaillierte Versuchsbeschreibung	17
3.5.1 Herstellung der Stammlösungen.....	17
3.5.2 Einfluss von Glutamin auf die Zytokinexpression.....	19
3.5.3 Einfluss von Alanin und Dipeptamin auf die Zytokinexpression	19
3.6 Datenanalyse	19
3.7 Datenverarbeitung und Statistik.....	21
3.8 Flureszenekompensation.....	21
3.9 Lebend – Tod Messung	22

4 Ergebnisse.....	25
4.1 Einfluß von Alanin , Glutamin und Alanyl-Glutamin auf die intrazelluläre Zytokinexpression ohne LPS Stimulation.....	25
4.2 Einfluß von Glutamin auf die IL-6, IL-8 und TNF- α Expression von Monozyten unter LPS Stimulation.....	26
4.3 Einfluß von Alanin auf die Zytokinexpression von Monozyten unter LPS-Gabe.....	27
4.4 Einfluss des Dipeptides Alanyl-Glutamin auf die Zytokinexpression von Monozyten unter LPS Gabe.....	29
4.5 Unterschiede in der Zytokinexpression: ein Vergleich zwischen Glutamin, Alanin und Dipeptamin.....	30
4.5.1 IL-6.....	31
4.5.2 IL-8	32
4.5.3 TNF- α	32
5 Diskussion.....	34
5.1 Einfluss von Glutamin, Alanin und Dipeptamin auf die Zytokinexpression ohne LPS	34
5.2 Einfluss von Glutamin, Alanin und Dipeptamin + LPS auf die Zytokinexpression	35
5.3 Einfluss von Glutamin + LPS auf die Zytokinproduktion	35
5.3.1 Klinische und therapeutische Relevanz von Glutamin	38
5.4 Einfluss von Alanin auf die Zytokinexpression	40
5.4.1 Klinische und therapeutische Relevanz von Alanin	41
5.5 Einfluß von Dipeptamin auf die Zytokinexpression	42
5.5.1 Klinische Relevanz von dem Dipeptid Alanyl-Glutamin	43
6 Zusammenfassung.....	44
7 Literaturverzeichnis.....	45
8 Thesen.....	54
9 Lebenslauf.....	55
10 Veröffentlichungen.....	56

1. Einleitung

1.1 Immunsystem

Das Immunsystem dient dem Organismus als körpereigene Abwehr gegen fremde Zellen und Antigene. Mit spezifischen Reaktionsabläufen auf humoraler und zellulärer Ebene gewährleistet es die Integrität und Individualität jedes Organismus. Es kann in ein unspezifisches und in ein spezifisches Immunsystem aufgeteilt werden. Das unspezifische, oder auch angeborene, Immunsystem besteht aus zur Phagozytose befähigten Zellen – wie Monozyten/Makrophagen und Granulozyten – sowie Natürlichen Killerzellen (NK). Diese sind ausschlaggebend für die Erstantwort des Immunsystems. Zum phylogenetisch jüngeren spezifischen, oder auch adaptivem, Immunsystem gehören die B- und T- Lymphozyten. Ihre Aufgabe ist es, durch klonale Selektion bei Erstkontakt mit einem fremden Antigen lebenslange Immunität zu erwerben. Unspezifisches und spezifisches Immunsystem arbeiten eng miteinander zusammen. Nur durch voller Funktionstüchtigkeit beider Systeme ist eine optimale Abwehr gegen Fremdantigene gewährleistet (Roit et al. 1993; van Furth et al. 1992).

1.1.1 Monozyten

Monozyten gehören zur Gruppe des Mononukleären Phagozytären Systems (MPS) und sind Vorläuferzellen der Makrophagen. Nach Ausreifung im Knochenmark gelangen sie in die Blutbahn und zirkulieren dort für 8-70 Stunden. Die Zirkulationsdauer ist abhängig von den im Laufe der Inflammation gebildeten Entzündungsmediatoren, welche die Chemotaxis und die Diapedese an den Ort der Inflammation vermitteln. Aus der Blutbahn gelangen die Monozyten ins Gewebe, wo sie sich als ortsständige Makrophagen gewebetypisch ausdifferenzieren (Murphy et al. 1999). Ausdifferenzierte Makrophagen können bis zu Jahren im zellspezifischem Gewebe persistieren.

Monozyten/Makrophagen nehmen im Immunsystem eine Schlüsselrolle ein. Sie bilden die Schnittstelle zum spezifischem System. Durch Phagozytose können fremde Antigene intrazellulär verarbeitet und CD4+ Lymphozyten präsentiert werden (Germain 1995). Die Antigenpräsentation erfolgt dabei über HLA-DR Moleküle – ein Genprodukt des MHC Klasse II Komplexes. Desweiteren sind Monozyten/Makrophagen wesentlich an der Produktion von Zytokinen beteiligt, welche der Steuerung des Immunsystems dienen.

1.1.2 Aktivierung von Monozyten

Monozyten/Makrophagen liegen normalerweise im inaktiviertem Zustand vor, um nicht unkontrolliert körpereigenes Gewebe anzugreifen. Sie können jedoch durch unterschiedliche Faktoren aktiviert werden. Dazu gehören Mikroorganismen, INF- γ , Zytokine, wie IL-1 und TNF- α , sowie LPS. LPS ist

ein Zellmembranbestandteil von gramnegativen Mikroorganismen, wie z.B. Escherischia (E.) Per Abgabe von Membranvesikeln oder durch den Zerfall absterbender gramnegativer Bakterien wird LPS *in vivo* freigesetzt. Der Hauptaktivierungsweg verläuft über den CD14 Rezeptor, welcher charakteristisch für Monozyten ist. Nach Bindung des LPS an den zellmembranständigen CD14 Rezeptor von Monozyten wird eine komplexe intrazelluläre Signalkaskade induziert, die schließlich zur Aktivierung von NF- κ B führt. NF- κ B ist ein Transkriptionsfaktor, der nach Translokation in den Nukleus der Zelle die Transkription von proinflammatorischen Zytokinen, wie z.B. IL-6, IL-8 und TNF- α aktiviert.

1.1.3 Sekretorische Fähigkeiten der Monozyten

Über die oben angeführten Signaltransduktionswege werden viele verschiedene Entzündungsmediatoren von Monozyten exprimiert. Proinflammatorische Zytokine wie IL-1, IL-6, IL-8 und TNF- α sowie antiinflammatorische Zytokine wie IL-10, werden in der Frühphase der Immunantwort gebildet. Monozyten sezernieren neben Zytokinen auch andere Faktoren, darunter Komplementfaktoren, proteolytische Enzyme, aggressive Sauerstoffspezies, Gerinnungsfaktoren, Fibronectin und Wachstumsfaktoren (Cavaillon 1994). Mit Hilfe dieser Produkte werden von Monozyten eine Vielzahl immunologischer Prozesse, die Entzündungsreaktionen steuern und regulieren, beeinflusst.

1.2 Zytokine

Zytokine sind Botenstoffe, die Informationen zwischen Zellen vermitteln. Sie steuern Stärke und Dauer der Immun- und Entzündungsreaktion (Roitt 1993). Zytokine eines Typs können von verschiedenen Zellen produziert werden. Anders als Hormone wirken Zytokine autokrin, parakrin und juxtakrin und nur selten endokrin. In der Pathogenese des SIRS und der schweren Sepsis spielen die von Monozyten produzierten proinflammatorischen Interleukine wie IL-6, IL-8 und TNF- α eine besondere Rolle und zeigen bei erhöhten Plasmaspiegeln eine positive Korrelation mit der Mortalität der Patienten (Cavaillon et al. 2003; Rodriguez-Gaspar 2001)

1.2.1 Interleukin 6

Hauptproduzenten des IL-6 *in vivo* sind Monozyten, Fibroblasten und Endothelzellen. Als pleiotropes Zytokin zeigt IL-6 sehr variable biologische Funktionen (van Furth 1992). Es fungiert als Mediator des angeborenen Immunsystems, indem es Monozyten/Makrophagen, sowie NK- Zellen aktiviert (Calder et al. 1999). Auch wirkt IL-6 als B-Zelldifferenzierungsfaktor, welcher B-Zellen zur

Differenzierung in Plasmazellen anregt (Kishimoto et al. 1998). Ebenso ist IL-6 ein wichtiger Faktor in der Aktivierung und Proliferation von T-Zellen. IL-6 induziert während der Inflammation die akute Phase Protein (Heinrich et al. 1990), sowie Fieber (Helle et al. 1988). Die ACTH Produktion in der Hypophyse wird durch IL-6 angeregt. Die nachfolgende Cortisol-Ausschüttung aus der NNR beschleunigt die Acute Phase Reaktion (van Furth 1992). Patienten, welche an einem SIRS oder einer Sepsis leiden, zeigen erhöhte IL-6 Plasmaspiegel (Spittler, 2000). Im Rahmen der Sepsistherapie hat sich IL-6 als ein Marker für die Immunkompetenz und als Outcomeparameter für das Multiorgandysfunktionssyndrom (MODS) bewährt (Sablitzki et al. 2001; Khabar et al. 1997)

1.2.2 Interleukin 8

IL-8 ist ein Chemokin, welches verantwortlich für die Rekrutierung von Entzündungszellen an den Ort der Inflammation ist. IL-8 wird von Monozyten, Makrophagen, neutrophilen Granulozyten, Fibroblasten, Endothelzellen und vielen weiteren Zellen produziert.

IL-8 wird auch „Monocyte derived neutrophil-chemotactic factor“ genannt und unterscheidet sich von allen anderen Zytokinen durch seine Fähigkeit, neutrophile Granulozyten zu aktivieren. Es führt in neutrophilen Granulozyten zu einem verstärkten O₂-Metabolismus mit Generierung von reaktiven O₂-Spezies (respiratory Burst), zu einer vermehrten Exozytose von Granula, einer verstärkten Chemotaxis (van Furth 1992), einer vermehrten Expression von Adhäsionsmolekülen und ist an der Vermittlung der Schmerzwahrnehmung beteiligt. Erhöhte IL-8 Plasmaspiegel korrelieren in der schweren Sepsis mit dem Schweregrad einer Laktatazidose, mit der Ausprägung der disseminierten intravasalen Gerinnung, dem Schweregrad einer Hypoxie und erhöhten „acute physiology and chronic health evaluation scores“ (APACHE)-II sowie der Mortalität von Sepsispatienten (Rodriguez-Gaspar et al. 2001; Van Zee et al. 1991). IL-8 scheint auch eine besondere Bedeutung in der Pathogenese von des acute lung injury zu zukommen (Takala et al. 2002).

1.2.3 Tumor Nekrose Faktor α

TNF- α besitzt sehr viele wichtige Funktionen in der Pathogenese von entzündlichen, infektiösen und malignen Geschehen im menschlichen Organismus (van Furth 1992). Es wird als einer der Initiatoren des Entzündungsgeschehen angesehen (DeForge et al. 1992; Wanidworanum et al. 1992; Calder et al. 1999), welcher die Produktion anderer Entzündungsmediatoren induziert und einen wesentlichen Einfluß auf die Endothel-Funktion, Koagulation, Fettstoffwechsel und Insulinausschüttung hat. In Studienversuchen mit LPS- Injektion an Tieren (Redl et al. 1991) und an Freiwilligen (Suffrendi et al. 1995) wurde TNF- α als erstes Zytokin in der Blutbahn nachgewiesen, nach 1,5 Std. erreicht die TNF- α Produktion ihr Maximum (Cavaillon et al. 2003). Es wird vermutet, dass TNF- α wichtigster Mediator der Endotoxizität ist. Die biologischen Auswirkungen einer LPS-Injektion werden erst dann

beobachtet, wenn TNF- α messbar im Blut vorhanden ist. Hohe TNF- α Spiegel während eines septischen Schocks korrelieren mit einem höherem Mortalitätsrisiko (De Groof et al. 2002; Mira et al. 1999). Anti TNF-alpha Antikörper konnten in Tiermodellen, in welchen LPS in tödlicher Dosis verabreicht wurde, nachweislich die Mortalität verringern (Van der Poll et al. 1991). Neben vermindertem TNF- α Serumspiegel unter Antikörpertherapie, wurden auch reduzierte Level der proinflammatorischer Zytokinen, wie IL-1 beta, IL-6 (Fong et al. 1989) und IL-8 (Redl et al. 1993) nachgewiesen. TNF- α wirkt nicht nur als Initiator des Entzündungsgeschehens, sondern hält auch die Produktion anderer proinflammatorischer Zytokine über einen längeren Zeitraum aufrecht (Cavaillon et al. 2003). TNF- α konnte ein kardiodepressorischer Effekt in der Sepsis nachgewiesen werden, der wahrscheinlich auf eine negativ inotrope Wirkung des TNF- α zurückzuführen ist (Kumar 2000). Allgemeine Entzündungszeichen wie Fieber und Synthese von Acute Phase Proteines in der Leber werden durch TNF-alpha induziert (Calder et al. 1999).

1.3 Sepsis und SIRS

Heutzutage sind Sepsis und das damit verbundene Multiorganversagen (MOV) Haupttodesursache auf nicht-kardiologischen Intensivstationen (Sablitzki et al. 2005). Trotz intensiver Forschung während der letzten drei Jahrzehnte bleibt die Sepsis wohl eine der größten medizinischen Herausforderung auf Intensivstationen. Allein in den USA erkrankten 751.000 (300/100000 Einwohner) Menschen jährlich an einer Sepsis. Möglicherweise wird die Anzahl der in den USA an Sepsis erkrankenden Menschen bis 2020 sogar auf über eine Million ansteigen, was wohl auf die zunehmende demographische Veränderung der Altersstruktur der westlichen Länder zurückzuführen ist (Angus et al. 2001). In Deutschland liegen zur Zeit noch keine gesicherten Daten zur Inzidenz der Sepsis vor. Die Mortalitätsraten schwanken laut Statistiken zwischen 28% (Angus et al. 2001) bis fast 60% (Brun-Buisson et al. 1995). Die Datenlage ist hierbei so uneinheitlich, da in den Todesregistern oft die auslösende Grundkrankheit, wie z.B. Polytrauma oder Krebserkrankung anstatt der Sepsis angegeben wird.

Während einer Sepsis kommt es zu einer überschüssenden Reaktion des Organismus, die durch die Aktivierung aller am Entzündungsgeschehen beteiligten Kaskadensysteme, einer Dysregulation der zellvermittelten Immunantwort und der erheblichen Veränderungen in der Produktion und Exprimierung von Mediatoren der Immunantwort, wie z.B. Zytokinen, Wachstumsfaktoren oder Adhäsionsmolekülen, gekennzeichnet ist (Casey 1993). SIRS („Systemic Inflammatory Response Syndrome“) ist die Bezeichnung für ein generalisiertes Entzündungsgeschehen, welches durch die Ausschüttung hauptsächlich pro-inflammatorischer Zytokine und anderer Entzündungsmediatoren charakterisiert ist. Die Entwicklung eines SIRS ist immer Folge einer erheblichen Schädigung des Organismus (Sandesc et al. 2003; Bloos 2003).

Da in der Regel verschiedene Ätiologien eines SIRS unterschieden werden können und da die Symptomatik eines SIRS und dessen Ausprägung sehr variieren, wurden bis in die 1980er kaum Inzidenzen und Prävalenzen errechnet; es fehlte ein einheitlicher Konsens über Terminologie und Diagnose des SIRS (Sandesc et al. 2003). Erst 1991 wurde eine einheitliche Definition des Begriffes SIRS durch die amerikanischen Gesellschaften „American College of Chest Physicians“ (ACCP) und „Society of Critical Care Medicine“ (SCCM) eingeführt.

Demnach wird ein **SIRS** diagnostiziert, wenn mindestens zwei der folgenden Kriterien vorliegen:

- 1) Körpertemperatur $<36^{\circ}\text{C}$ oder $>38^{\circ}\text{C}$
- 2) Tachykardie $>90/\text{min}$
- 3) Respiratorische Insuffizienz mit Tachypnoe $>20/\text{min}$ oder $\text{pCO}_2 <32 \text{ mmHg}$
- 4) Leukozytenzahl $<4000/\text{mm}^3$ oder $>12000/\text{mm}^3$; oder $>10\%$ stabkerniger Granulozyten

Eine Vielzahl von Faktoren kann zu einem SIRS führen. Dazu gehören unter anderem Polytrauma, große chirurgische Eingriffe, Intoxikationen, Verbrennungen, Krebsleiden, Extrakorporale Zirkulation und Sepsis. **Sepsis** ist gemäß der ACCP und der SCCM ein SIRS, welches durch eine Infektion hervorgerufen wird (Sandesc et al. 2003). Die Infektion kann bakterieller, fungaler, viraler oder parasitärer Art sein (Bloos 2003). Eine schwere Sepsis ist definiert als eine Sepsis mit Zeichen der Organdysfunktion bzw. Hypoperfusion: Hypotension (Blutdruck (RR) $< 90 \text{ mmHg}$ oder Reduktion von $> 40 \text{ mmHg}$ vom Ausgangswert), Oligurie, Laktatazidose, Enzephalopathie, Thrombozytopenie, bzw. Thrombozytensturz (Bone 1992). Als Komplikation kann es zu einem MOV mit folgendem MODS kommen, welches die gemeinsame Endstrecke der immunologischen Veränderung und Reaktionen auf eine Infektion oder ein Trauma darstellt. Das MODS ist definiert als ein Ausfall eines oder mehrerer Organe, die ohne intensivmedizinische Intervention einen letalen Ausgang für den Patienten zur Folge hätten (Bone, 1992). Die Ausprägung des MODS bestimmt den Verlauf und bedingt die hohe Mortalität der Sepsis (Bone, 1996).

1.3.1. Monozyten und Zytokine in der Sepsis

Das Immunsystem spielt die zentrale Rolle in der Initiierung der pathophysiologischen Veränderungen in der Sepsis. Monozyten, als Hauptproduzenten vieler Zytokine und als Schnittstelle zwischen angeborenem und spezifischem Immunsystem sind für die Genese der Sepsis von besonderem Interesse. LPS- Infusionen führen zur schnellen Expression von den hauptsächlich in Monozyten/Makrophagen produzierten pro-inflammatorischen Zytokine IL-1, IL-6, IL-8 und TNF- α . Maximalwerte der Zytokinspiegel im Blut werden innerhalb zwei bis drei Stunden erreicht (Suffrendini et al. 1989; Martich et al. 1991; Michie et al. 1988). Das klinische Bild einer LPS-Infusion ähnelt sehr stark dem der Sepsis. Je höher der Blutspiegel der oben genannten pro-inflammatorischen Zytokine, desto schlechter ist das Outcome in einer Sepsis (Gogos et al. 2000). Lange Zeit wurde angenommen, dass Sepsis ein rein proinflammatorisches Geschehen ist. Heutzutage

häufen sich jedoch Beweise, dass Sepsis auch aus einer antiinflammatorischen Komponente besteht. Während der Sepsis kommt es zu einer Überproduktion von anti-inflammatorischen Zytokinen und zur funktionellen Einschränkung von mononukleären Zellen (PBMC) (Munoz et al. 1991; Randow et al., 1995; Brandtzaeg et al., 1996). Anti-inflammatorische Zytokine, wie IL-4, IL-5, IL-10 werden durch T-Helferzellen Typ II produziert und führen zur Deaktivierung von Monozyten/Makrophagen. Eine exzessive Produktion dieser anti-inflammatorischen Mediatoren fördert eine Immunsuppression, welche bis zu einem CARS (Compensatory anti-inflammatory response syndrome) führen kann. CARS ist der vermeintliche Gegenspieler des SIRS und resultiert klinisch gesehen in einer Immun-Paralyse, welche den Eintritt und die Ausbreitung von infektiösen Mikroorganismen im Körper deutlich erleichtert.

Über den zeitlichen Verlauf des SIRS und CARS gibt es heute zwei Theorien. Die „Sepsis parallel Theorie“ besagt, dass SIRS und CARS gleichzeitig ablaufen können. Cavaiillon et al (2001) schlagen im Rahmen dieses Theoriemodell vor, dass SIRS vor allem im entzündetem Gewebe abläuft, während die restlichen systemischen Blutleukozyten eher in einem deaktiviertem Zustand vorliegen, um der Aktivierung von Endothelzellen und Expression von Adhensionsmolekülen entgegenzuwirken. Die „Sepsis Serial Theory“ geht von einem sequentiellen Sepsismodell aus, indem SIRS und CARS zeitlich verschoben sind. Es kommt zunächst zu einer pro-inflammatorischen Entzündungsreaktion des Organismus, um Fremdorganismen zu bekämpfen und ihre weitere Ausbreitung im Körper zu verhindern. Der Körper reagiert anschließend – im Sinne eines Regelkreises- mit einer endogenen Immunsuppression auf die unkontrollierte proinflammatorische Phase (Bone 1996).

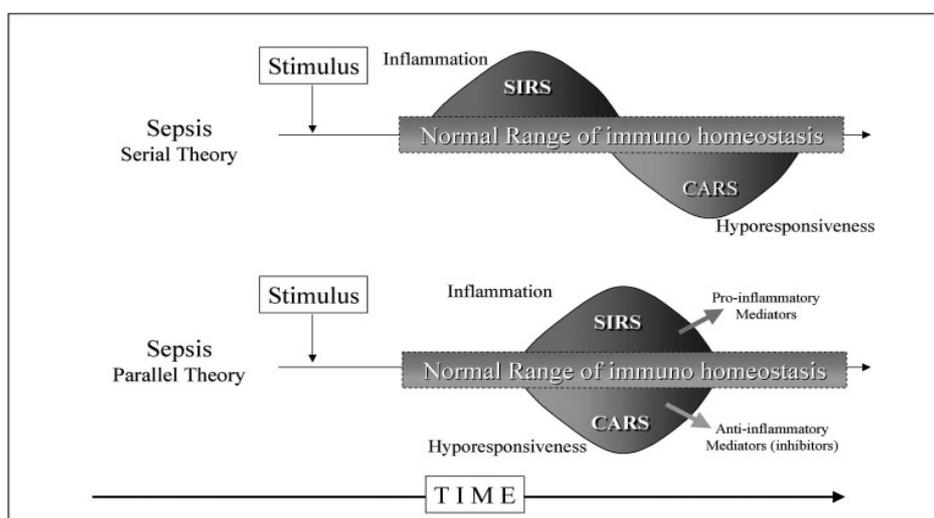


Abb. 1 aus Ronco et al. 2003: SIRS und CARS können entweder im Rahmen eines sequentiellen Sepsis Modell getrennt auftreten, oder gleichzeitig im Sinne der Sepsis parallel Theorie

Die Therapie einer Sepsis - unabhängig vom Verlaufsmodell - besteht aus kausalen, supportiven und additiven Maßnahmen (Sablutzki et al. 2005). Zu den Grundprinzipien der Sepsistherapie gehören die chirurgische Herdsanierung, sowie eine adäquate Antibiotikagabe. Supportive Maßnahmen zielen

darauf ab, die aus der Sepsis resultierenden Organdysfunktionen zu beeinflussen (Katecholamin- und Volumentherapie, Kortikosteroide, Nierenersatztherapie, Beatmungsstrategien, intensivierete Insulintherapie ... etc.) und die Gerinnung zu modulieren (rhTFPI, Antithrombin III, rhAPC). Zu den additiven Therapiemaßnahmen gehören hauptsächlich Ernährungsstrategien, welche versuchen durch verbesserte Nutrition die Organfunktion zu modulieren. Vor allem spielt die Ernährung des Immunsystems (Immunnutrition) eine wichtige Rolle, da sie darauf abzielt die Immunfunktion zu verbessern und die Zytokinproduktion zu regulieren. Unterernährung führt zu einer Immunsuppression, welche ihrerseits mit einem erhöhtem Risiko für Infektionen, Sepsis, SIRS und CARS verbunden ist.

1.4. Immunnutrition

Ziel zahlreicher Studien ist es das Outcome von sepsis-gefährdeten Patienten anhand von Pharmaka, Immunmodulation und Immunnutrition zu verbessern. Unter anderem sind ω -3 Fettsäuren, Selen, und Aminosäuren als Ernährungstherapie beständiger Gegenstand solcher Studien. Zu den bisher am meist untersuchten Aminosäuren gehören Arginin, Taurin, Cystein und Glutamin. Schon früh erkannte man, dass Malnutrition und ein Mangel an Aminosäuren zu einem hyperkatabolischen Zustand und zu einer Immunsuppression führen, welche mit einem schlechterem Outcome verbunden sind. In dieser Arbeit werden die Aminosäuren Glutamin und Alanin, sowie deren Kombination Alanyl-Glutamin (Dipeptamin) eingehender untersucht.

1.4.1 Glutamin

Unter den vielen verschiedenen Versuchen der letzten 10 Jahre, die Qualität der Ernährungstherapie zu verbessern, hat Glutamin ein besonderes Interesse hervorgerufen (Hammarqvist et al. 1994). Glutamin ist die am häufigsten vorkommende freie Aminosäure und macht mehr als 50% des freiem Aminosäure-Pools des Skelettmuskel aus (Francis et al. 2002; Calder et al. 1999). Sie ist eine nicht-essentielle Aminosäure, die unter normalen Umständen ausreichend von den meisten Zellen des Organismus – durch das Enzymes Glutamin Synthetase - hergestellt werden kann. In Stresssituationen jedoch, wie es bei Intensivpatienten der Fall ist, braucht der Körper mehr Glutamin als er selbst synthetisieren kann; in dem Fall wird Glutamin zu einer „bedingt essentiellen Aminosäure“, die extern zugeführt werden muss, um die Funktion des Organismus zu gewährleisten (Brian et al. 2000; Francis et al. 2002; Boelens et al. 2000).

Glutamin ist wesentlich am interzellulären Stickstofftransport beteiligt und dient somit auch der Ausscheidung von Harnstoff und Ammonium (Christensen et al. 1990; Neu et al. 1996). Es spielt eine wichtige Rolle als Vorstufe für die Produktion von Nukleotiden, Glucose, Glutathion und anderen Aminosäuren (Meister et al. 1956, Garber et al. 1980; Lund et al. 1981); seine Bedeutung im

Intermediärstoffwechsel, sowie im zellulären Reduktion-Oxidation Mechanismus ist essentiell (Brian et al. 2000). Glutamin ist darüber hinaus eine der wichtigsten Nahrungsquelle für Zellen des Immunsystems (Newsholme et al. 1989; Calder et al. 1995), der Niere (Tizianello et al. 1982), der Leber (Haussinger et al 1989), und des Gastrointestinalen Systems (McBurney et al 1994; Griffiths et al. 1997).

Hauptdepot des Glutamin ist der Skelettmuskel, er speichert bis zu 60% des im Körper vorkommenden Glutamin (Alan et al. 1999). In Stresssituationen kommt es zu vermehrtem Skelettmuskelabbau, sowie Reduzierung des Glutamin-Pool im Muskel um mehr als 50 Prozent (Alan et al. 1999). Hammerqvist und Wernermann (1990) konnten zeigen, dass eine Glutaminzugabe bei Intensivpatienten sowohl den Glutamingehalt im Skelettmuskel, als auch die Proteinsynthese und die Stickstoffbilanz gegenüber der Kontrollgruppe deutlich verbessert.

Glutamin ist –zumindest in *in vitro* Studien - notwendig für eine optimale Lymphozytenproliferation (Adrawi et al. 1988). Makrophagen benötigen eine suffiziente Glutaminzufuhr, um zellspezifische Funktionen wie Phagozytose (Parry-Billings et al. 1990), Antigenexpression und -präsentation aufrecht zu erhalten (Spittler et al. 1995). Viele klinische Studien demonstrieren, dass eine adäquate Glutaminzufuhr in metabolischen Stresssituationen die Immunantwort optimiert, die Regenerationszeit verkürzt und die Morbidität senkt (Griffiths 1999). Glutamin enthaltende enterale Nahrung konnte die Inzidenz von Pneumonie, bakterieller Infektion und schwerer Sepsis nach Polytrauma deutlich reduzieren (Houdijk et al. 1998). Die in Stresssituationen häufig beobachtete Hyperpermeabilität des Darmes und die damit verbundene bakterielle Translokation, welche zu einer Sepsis und MOF führen kann, wird durch Glutamingabe verringert (Alan et al. 1999). Mit Glutamin angereicherte parenterale Lösung verringerte signifikant den Krankenhausaufenthalt in Patienten mit Knochenmarkstransplantation; die Zahl der CD4+ und CD8+ T-Lymphozyten in diesen Patienten konnte unter Glutamin erhöht werden (Windmueller et al. 1974). Bei multimorbiden Patienten verlängerte Glutamin signifikant die Überlebenszeit (Griffiths et al. 1997).

1.4.2 Ala-Gln als Dipeptid

Da Glutamin schlecht löslich und sehr instabil in Wasserlösungen ist, enthalten normale TPN oder kommerziell erhältlicher Aminosäurelösungen kein Glutamin (Alan et al. 1999). Im klinischem Alltag wird Glutamin deshalb parenteral routinemäßig als Dipeptid zugeführt. Die Bindung ist sehr stabil in Lösung und wird nach Infusion im Körper direkt in seine Einzelteile hydrolysiert (Hammerqvist et al. 1990). Eine mögliche, sehr häufig verwendete Dipeptidkombination, ist das Alanyl-Glutamin. In klinischen Studien konnte gezeigt werden, dass Ala-Gln postoperativ die Stickstoffbilanz deutlich verbessert (Morlion et al. 1998) und dem Proteinabbau im Skelettmuskel entgegenwirkt (Hammerqvist et al. 1990). Die postoperative Immunsuppression konnte in der Ala-Gln Gruppe besser und schneller kompensiert werden (Jacobi et al. 1999).

1.4.3 Alanin

Alanin ist – ähnlich wie Glutamin – von erheblicher Bedeutung für den Intermediärstoffwechsel des Organismus. Es ist nach Glutamin die zweit häufigste frei vorkommende Aminosäure im Blutplasma (Mackenzie et al 1992). Alanin spielt jedoch keine Rolle im Stickstofftransport; seine Funktionsbreite ist gegenüber dem Glutamin eingeschränkt (Christensen 1990). Als wichtigste glukoneogenetische Aminosäure ist Alanin für den Kohlenhydratstoffwechsel unentbehrlich. Im Skelettmuskel wird Alanin durch Transaminierung von Pyruvat gewonnen. Alanin wird dann über die Blutbahn in die Leber transportiert, wo es zu Glukose umgewandelt und dem Muskelgewebe als Energiesubstrat wieder bereitgestellt wird (Glukose-Alanin Zyklus; Christensen 1990; wikipedia 2006).

Dieser glukoneogenetische Effekt des Alanins wurde bis heute vor allem in Athleten untersucht (Anderson O). Bei Sportlern führt ein erniedrigter Glukosespiegel zu erhöhter Müdigkeit und verminderten Leistungsfähigkeit. Einer Studie nach zu urteilen, hält Alanin den Glukosespiegel während sportlicher Betätigung konstant; Proteinsynthese und Stickstoffbilanz werden während dem Extremsport durch Alaningabe verbessert (Zest for live 2005). Diese Entdeckung sowie die Tatsache, dass Alanin eine der häufigsten Aminosäuren im Proteinaufbau ist (Molecular Expressions 2004), machen Alanin als Supplement für Athleten und Body Builder sehr beliebt (Zest for live 2005; healthnotes ©2004). Darüberhinaus wird Alanin zur Herstellung von Tryptophan, Vit B5 (Pantothensäure) und Coenzym A benötigt. In Tierversuchen mit Ratten zeigte sich ein Cholesterol reduzierender Effekt. Auch soll Alanin einen positiven Effekt auf die Prostata haben, da es in Kombination mit Glycin und Glutamin die Symptome der BPH lindert (Zest for live 2005; healthnotes ©2004). Eine therapeutische Wirkung des Alanins in der Sepsis ist bis heute noch nicht untersucht worden.

2. Zielstellung

Auch wenn die Wirkung des Glutamins schon in vielen Studien untersucht wurde und Glutamin heutzutage einen hohen Stellenwert in der Ernährungstherapie hat, gibt es keine Arbeiten, die den Einfluß von Glutamin explizit auf die Zytokinexpression von Monozyten untersuchen. Desweiteren gibt es keine Studien darüber, ob Alanin einen Effekt auf die Zytokinproduktion in Monozyten hat, und ob dieser mit dem Glutamin in der Kombinationslösung (Dipeptamin) interagiert.

Vor dem Hintergrund der geschilderten Beziehungen zwischen Immunsystem, Sepsis und Immunnutrition auf Ebene des heutigen Forschungsstandes, beschäftigt sich die Arbeit mit dem Einfluss von Glutamin, Alanin und deren Kombination, das Dipeptid Ala-Gln, auf die proinflammatorische Immunantwort von Monozyten. Insbesondere geht es um die Produktion der proinflammatorischen Zytokine IL-6, IL- und TNF- α , die eine bedeutende Rolle in der Frühphase der Sepsis und des SIRS spielen. Die Expression der Zytokine wird intrazellulär mittels Durchflusszytometrie gemessen

Im Einzelnen sollen folgende Fragestellungen untersucht werden:

- Haben die Einzelsubstanzen Glutamin und Alanin, sowie deren Kombination, das Dipeptid Alanyl-Glutamin einen Einfluß auf die Expression von IL-6, IL-8 und TNF- α in Monozyten unter *nicht* septischen Bedingungen?
- Welchen Einfluß haben unterschiedliche Konzentrationen von Glutamin, Alanin und Alanyl-Glutamin auf die Expression von IL-6, IL-8 und TNF- α von Monozyten unter den Bedingungen eines *in vitro* Sepsismodells
- Wie unterscheiden sich die jeweiligen Zytokinexpressionsmuster und welche Relevanz könnte sich für die drei Aminosäurelösungen in Bezug auf den klinischen Alltag ergeben?

3. Material und Methodik

3.1 Arbeitsmaterial und Chemikalien

- FITC anti-human CD14-Antikörper, Pharmingen, Heidelberg
- PE anti-human TNF- α Antikörper, Pharmingen, Heidelberg
- PE anti-human IL-6 Antikörper, Pharmingen, Heidelberg
- PE anti human IL-8 Antikörper, Pharmingen, Heidelberg
- PE rat IgG_{2a} Isotypkontrolle, Pharmingen, Heidelberg
- PE anti human CD 14 Antikörper, Pharmingen, Heidelberg
- Golgi Plug, Pharmingen, Heidelberg
- Cytofix/Cytoperm Kit, Pharmingen, Heidelberg
- Lipopolysaccharide E. coli 055:B5, SIGMA, Deisenhofen
- Phosphate buffered Sialine (PBS) w/o Ca₂₊ w/o Sodium Bicarbonat, GIBCO BRL/Lifetechnologies
- Dimethyl Sulfoxide (DMSO), SIGMA Deisenhofen
- RPMI 1640 Medium mit L-Glutamin, GIBCO BRL/Lifetechnologies
- RPMI 1640 Medium ohne L-Glutamin, GIBCO BRL/Lifetechnologies
- FACS Clean, Becton Dickenson (BD), Heidelberg
- FACS Rinse, BD, Heidelberg
- Cellwash, BD, Heidelberg
- FACS Flow, BD, Heidelberg
- FACS-Calibur Cytometer, BD, Heidelberg
- Software Cellquest pro®, Becton Dickinson, Heidelberg
- Bovine Serum Albumin 0.2 %, SIGMA, Deisenhofen, Germany
- Natriumazid (Na₃N₃) , SIGMA, Deisenhofen
- L-Glutamine, GIBCO/Lifetechnologies
- L-Alanine, SIGMA, Deisenhofen
- Dipeptamin (L-Ala, L-Gln), Fresenius
- 7Aminoactinomycin D (7AAD), Sigma, Deisenhofen
- 5ml Polysterene round bottom tube, Falcon®, Becton Dickenson, Heidelberg
- 7,5 ml Natrium-Heparin-Monovetten®, Sarstedt, Nuernbrecht
- BD Valuset, Butterfly-Blutabnahmebesteck, BD, Heidelberg
- HERAsafe HSPC, Sterilbank, Heraeus Kendro Laboratory Products GmbH, Hanau

3.2 Durchflusszytometrie, FACS

Die Durchflusszytometrie (FACS) ist ein optisches Messverfahren zur Analyse von Partikeln, bzw. von Zellen in Suspension. Sie ermöglicht, eine große Anzahl von Zellen in kurzer Zeit zu untersuchen, wobei die Zellen einzeln an einer Lichtquelle in einem Flüssigkeitsstrom vorbeigeleitet werden. Dabei werden die Größe basierend auf der Vorwärtsstreuung, die interne Komplexität anhand der Seitwärtsstreuung des Lichts, sowie verschiedene potentielle Zelleigenschaften mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoff-konjugierten Antikörpern gleichzeitig gemessen.

3.2.1 Aufbau und Funktion eines Durchflusszytometers

Der grundsätzliche Aufbau eines Durchflusszytometers besteht aus einem Flüssigkeitssystem, welches die Proben in der Flusskammer an einem Laserstrahl vorbeiführt. Als Lichtquelle werden ein oder mehrere Laser unterschiedlicher Wellenlänge verwendet, um damit mehrere Zelleigenschaften parallel zu erfassen. Das vom Partikel abgestrahlte Licht wird zu Photodetektoren und Photomultipliern gelenkt. Dort werden die Signale digitalisiert. Der Aufbau eines Durchflusszytometers ist in Abbildung 2 dargestellt.

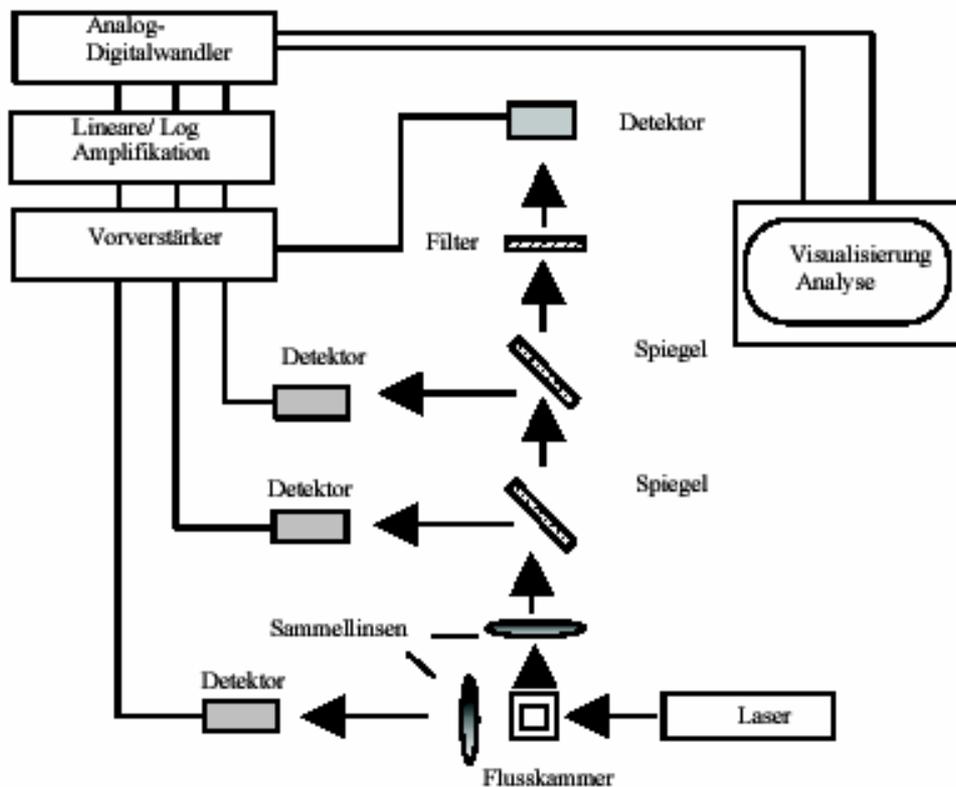


Abb. 2: Aufbau eines Durchflusszytometers

Flüssigkeitssystem

Das Flüssigkeitssystem besteht aus zwei Flüssigkeitszufuhren, welche die Flusskammer versorgen. Die Hüllflüssigkeit (sheath fluid) wird der Flusskammer in die, die Probe injiziert wird, kontinuierlich zugeführt. Das Flüssigkeitssystem dient dazu, die in Suspension gehaltenen Partikel einzeln im Raum auszurichten und somit eine konstante Kreuzung des Probenstrahls mit dem Laserstrahl zu ermöglichen.

Optisches System

Für unsere Versuche wurde das Durchflusszytometer FACSCalibur® der Firma Bacton Dickinson verwendet. Im FACSCalibur kommt ein luftgekühlter Argon-Ionen-Laser mit einer genutzten Wellenlänge von 488 nm und ein roter Diodenlaser der Wellenlänge 635 nm zum Einsatz. Der Laserstrahl trifft im rechten Winkel in der Photoküvette auf den Partikelstrom und wird an den Partikeln gestreut. Sammellinsen bündeln die in einem engen Winkel 1°-20° aufgefangene Vorwärtsstreuung (FSC) und die im 90°-Winkel registrierte Seitwärtsstreuung (SSC) sowie emittierte Fluoreszenzsignale. In der Durchflusszytometrie werden Fluoreszenzfarbstoffe zumeist in Form von an Antikörpern konjugierten Markern genutzt. Diese werden eingesetzt, um Zellstrukturen, Immunphänotypisierungen und intrazelluläre Ziele zu markieren. Als Fluoreszenzfarbstoffe werden unter anderem Fluoresceinisothiocyanath (FITC) und Phycoerythrin (PE) verwendet. Die spektralen Eigenschaften für FITC und PE sind in Tabelle 1 dargestellt.

Fluoreszenzfarbstoff	Exzitations- maximum[nm]	Emmissions- maximum[nm]	Laser [nm]
FITC	495	520	488 A
PE	564 /495	576	488 A

Tab. 1: Die Tabelle zeigt die spektralen Eigenschaften, Exzitationsmaxima, Emmissionsmaxima und geeigneten Lasertypen für Fluoresceinisothiocyanath (FITC) und Phycoerythrin (PE). A= Argon-Ionen Laser

Bei der Mehrfarbendurchflusszytometrie werden mehrere Fluoreszenzfarbstoffe gleichzeitig verwendet und registriert. Dies ist möglich, da die Fluoreszenzfarbstoffe unterschiedliche Emmissions- sowie Absorptionsspektren besitzen. Technische Grenzen werden durch die spektrale Überlappung gesetzt. Spektrale Überlappung tritt auf, wenn es zur Überschneidung der Emissionsspektren der Fluoreszenzfarbstoffe kommt. Die Emissionsspektren von FITC und PE sind in Abbildung 3 dargestellt. In der Abbildung ist zu erkennen, dass trotz der idealen Wahl von

entsprechenden Transmissionsfiltern eine restliche spektrale Überlappung nicht verhindert werden kann.

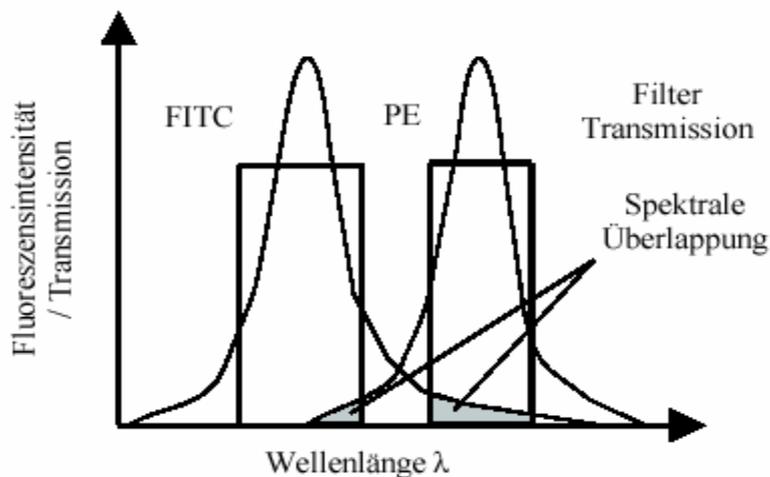


Abb. 3: Fluoreszenzspektren von Phycoerythrin (PE) und Fluoreszeinisothiocyanath (FITC).

Analyse und Darstellung

Zwei grundlegenden Darstellungen werden am häufigsten genutzt. Das Streudiagramm und die Histogrammdarstellung. Das Streudiagramm ist eine zweidimensionale Erweiterung des Histogramms. Das Streudiagramm wird auch Zellbild genannt, da sich hier die unterschiedlichen Leukozytenpopulationen getrennt darstellen lassen. Ein typisches Histogramm wie auch ein Streudiagramm sind in Abbildung 4 dargestellt.

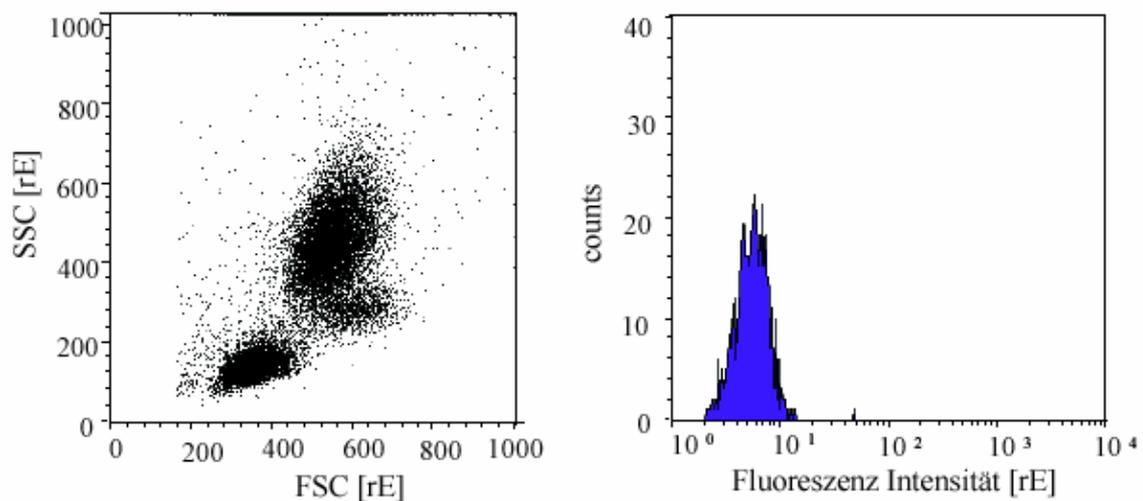


Abb. 4: Darstellung eines typischen Streudiagramms (links) und eines Histogramms (rechts).

Im linksdargestellten Streudiagramm (Zellbild) erkennt man die unterschiedlichen Leukozytenpopulationen im humanen Vollblut. Die unterste Population entspricht den Lymphozyten. Die mittlere Population repräsentiert die Monozyten und die oberste Population die neutrophilen Granulozyten. Am oberen Rand des Streudiagramms finden sich die eosinophilen Granulozyten.

Mit Hilfe des Computerprogramms Cellquest pro® wurde die statistische Auswertung vorgenommen. Durch Setzen von Grenzwerten (Markern) wird der Anteil positiver Partikel gegenüber der Gesamtzahl bzw. deren mittlere Fluoreszenzintensität „mean fluorescence intensity“ (MFI) gemessen. Die mittlere Fluoreszenzintensität ist ein Maß für die Menge gebundenen Fluoreszenzfarbstoffes pro Partikel. Mit der „Region of interest“ (ROI)-Technik können Ereignisse, die innerhalb einer gewählten Region liegen, weiter ausgewertet werden.

3.3 Vollblutprobengewinnung und Lagerung

Die Vollblutproben wurden mit Hilfe von Butterfly Blutentnahmesystemen und Na⁺-Heparin-Monovetten® mittels percutaner Venenpunktion von den Probanden entnommen. Um eventuellen zirkadianen Veränderungen in der Zytokinproduktuon vorzubeugen, erfolgte die Entnahme immer zu gleichen Zeitpunkten, zwischen 7,30 Uhr bis 8,00 Uhr. Die Probanden waren gesund und zeigten keine klinischen Zeichen einer Infektion. Bekannte Autoimmunerkrankungen, fieberhafte Infekte in den letzten zwei Wochen, Stoffwechselerkrankungen, wie Diabetes mellitus und regelmäßige Einnahme von Medikamenten galten als Ausschlusskriterien. Es wurden Vollblutproben von einer Gruppe von 27 Probanden gewonnen. Die Gruppe bestand nur aus männlichen Freiwilligen. Weibliche Probanden wurden auf Grund ihres schwankenden Hormonspiegels, der sich negativ auf die Beständigkeit von Glutamin- und Zytokinspiegeln auwirkt, nicht in die Studie eingeschlossen. Das mittlere Lebensalter der untersuchten Gruppe betrug 29 ± 7 Jahre. Um das Risiko einer Kontamination gering zu halten, wurden die Arbeitsschritte von der Blutentnahme bis zum Abschluss der Vollblutstimulation unter einer Sterilbank durchgeführt.

3.4 Prinzip der intrazellulären Zytokinbestimmung mittels FACS-Analytik

Monozyten beginnen unmittelbar nach Stimulation mit LPS Zytokine, wie IL-6, IL-8 und TNF- α zu sezernieren. Um die Exkretion der Zytokine zu verhindern, wurde der intrazelluläre Proteintransport mittels Brefelidin A (BFA) blockiert. BFA blockiert den vesikulären Proteintransport vom rauen endoplasmatischen Retikulum zum Golgiapparat und führt so zu einer Akkumulation von Zytokinen in Zellen. Die Zytokinproduktion kann somit in Zellen, nach intrazellulärer Färbung mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern, mittels FACS gemessen werden. Die Phänotypisierung von Monozyten im Vollblut erfolgte mittels spezifischer fluorochromkonjugierter Antikörper gegen das CD14-Oberflächenantigen.

3.4.1 LPS Stimulation und Inkubation

Das Endvolumen einer Probe betrug 1ml. Dabei wurden 200 µl Vollblut in einem Verhältnis von 1:5 mit den Restsubstanzen (RPMI, BFA, LPS, Gln, Ala, Dip) gemischt. Brefeldin A wurde entsprechend dem Protokoll von Becton Dickenson eingesetzt (Golgiplug, Endkonzentration von 3,5 µM). LPS wurde in einer Konzentrationen von 0,2ng/ml zugesetzt. Um den Einfluss von L-Glutamin, L-Alanin und Dipeptamin auf die Zytokinproduktion zu untersuchen, wurden diese in einem Konzentrationsbereich von 2mM und 5mM (bei Dipeptamin zusätzlich 1mM) zugesetzt. Die Proben wurden gemischt und bei 37° C in einem Inkubator (5 % CO₂ , 95 % Luftfeuchtigkeit) inkubiert. Die 5% CO₂ Atmosphäre garantiert einen konstanten pH-Wert der Proben. Die Inkubationszeit betrug drei Stunden.

3.4.2 Monozyten Phänotypisierung

Nach der Inkubationszeit wurden die Vollblutproben zum Waschen in 1 ml CellWash/ BD aufgenommen und gemischt. Anschließend wurden sie bei 500x Erdanziehungskraft (g) für 5 min. zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert, das Pellet in 1 ml Stainingbuffer resuspendiert und wiederum bei 500xg für 5 min zentrifugiert. Das resuspendierte Pellet wurde in einem zweiten Waschgang mit 1 ml Stainingbuffer gewaschen. Stainingbuffer wird eingesetzt, um eine ungewollte Hintergrundfärbung im Probenansatz zu minimieren. Die Zellen wurden in 100µl Stainingbuffer resuspendiert. Und zur Oberflächenfärbung der Monozyten wurden 10 µl CD14 anti-human-konjugierte Antikörper zugegeben und gemischt. Die Proben wurden 10 min bei Raumtemperatur im Dunklen inkubiert und die Proben zweimal nach Zentrifugation bei 500 xg mit 1 ml Stainingbuffer gewaschen.

3.4.3 Fixierung und Permeabilisierung

Damit die Oberflächenfärbung, bzw. Fluoreszenz der Monozyten in den weiteren Arbeitsschritten erhalten bleibt, wurden die Antikörper auf der Zelloberfläche fixiert. Zur Fixation wurde Cytofix/ Cytoperm-Lösung der Firma Becton/ Dickinson eingesetzt. Cytofix/ Cytoperm enthält Paraformaldehyd, welches eine Denaturierung und Präzipitation von Proteinen und deren Seitenketten verursacht. Es stabilisiert die Oberflächenantikörper auf den Monozyten und erhält ihre Fluoreszenz. Zusätzlich wird mit diesem Reagenz die Permeabilisierung der Zellwand durch Detergentien erreicht. Das Pellet wurde unter Mischen in 250 µl Cytofix/Cytoperm-Lösung aufgenommen und bei 4 ° C für 10 min im Dunklen inkubiert. Anschliessend wurden die Proben zweimal bei 500 xg für 5 min zentrifugiert und mit jeweils 1 ml Perm/Wash-Lösung gewaschen. Das Pellet wurde anschließend in 100µl Perm/Wash-Lösung resuspendiert.

3.4.4 Intrazelluläre Zytokinfärbung

Die intrazelluläre Zytokinfärbung basiert auf der Identifikation intrazellulärer Antigene mit Hilfe monoklonaler Antikörper. In der vorliegenden Arbeit wurden PE konjugierte anti-human-IL-6- Rat-IgG_{2a}, PE konjugierte anti-human-IL-8-Mouse-IgG_{2b} und PE konjugierte anti-human-TNF- α -Mouse-IgG1 Antikörper verwendet. 10 μ l des jeweiligen IL-Antikörpers wurden zur Probensuspension gegeben und gründlich gemischt. Darauf folgte eine 30 minütige Inkubation bei 4 C° im Dunkeln. Im Anschluss wurden die Proben unter Zugabe von 1ml Perm/ Wash-Lösung gemischt und gewaschen, sowie anschließend für 5 Minuten bei 500xg zentrifugiert. Dieser Waschvorgang wurde ein mal wiederholt. Danach wurden die Proben in 300 μ l Stainingbuffer resuspendiert und umgehend per FACS gemessen. PE konjugierte Antikörper unspezifischer Relevanz wurden als Isotypkontrolle für die spezifische Bindung der Interleukin-Antikörper eingestetzt. Durch Subtraktion der Isotypkontrolle und durch die Platzierung von Grenzmarken in der Histogrammauswertung kann der Anteil Interleukin positiver Zellen bestimmt werden. Die Isotypkontrollen werden in gleicher Konzentration wie die Interleukin-Antikörper verwendet, um kohärente Ergebnisse zu erhalten. Es wurden jeweils 12 Probanden untersucht (n=12).

3.5 Detaillierte Versuchsbeschreibung

3.5.1 Herstellung der Stammlösungen

Herstellung von LPS-Stammlösung:

1mg LPS (E. Coli; 055:B5; SIGMA) + 1 ml PBS = LPS 1mg/ml

Herstellung von 10 μ l Aliquots, Einfrieren bei - 80° C

Stammlösung bei Gebrauch: Auftauen und Verdünnen mit mit 990 μ l PBS = 100 μ g/ml

für Konzentration im Probensatz:

10 ng / ml = 10 μ l Stammlösung in 990 μ l Probenvolumen

1 ng / ml = 1 μ l in 999 μ l Probenvolumen

0,2 ng / ml = 2 μ l von 1:10 verdünnter 1 ng / ml- Lösung

Herstellung von BFA-Stammlösung:

Molekulargewicht Brefeldin A: 240,3 g/l = 1 M (mol/l)

Golgiplug: 1mg Brefeldin A gelöst in 1 ml DMSO = Brefeldin A 3,5 mM

um Pipettierfehler zu minimieren: 1: 10 verdünnen (30 μ l BFA + 270 μ l RPMI)

10 μ l BFA pipettieren (Probenvolumen 1000 μ l) = Brefeldin A Konzentration: 3,5 μ M

Herstellung L-Glutamin- Stammlösung

Ausgegangen wurde von einem physiologischen Gln-Plasmaspiegel= 0,8mM

Stammlösung L-Glutamin (GIBCO) =200mM

2mM Endkonzentration: 1ml GIBCO Stammlösung wird mit 7,695 ml destilliertem Wasser vermischt
=23 mM -> Zugabe von 80µl/ml entspricht 2mM Endkonzentration

5mM Endkonzentration: 1ml GIBCO Stammlösung wird mit 2,3 ml destilliertem Wasser vermischt
= 60,5mM-> Zugabe von 80µl entspricht 5mM Endkonzentration

Herstellung der L-Alanin –Stammlösung

Ausgegangen wurde von einem physiologischem Ala-Plasmaspiegel= 0,4mM

Molekulargewicht Alanin = 89,09g/mol; Wasserlöslichkeit = 100mg/ml

Herstellung der Stammlösung: 100mg Alanin/1ml = 1,13mol/ml = 1130mmol/l

2mM Endkonzentration: 1ml Alanin Stammlösung wird mit 22,7ml destilliertem Wasser vermischt
= 24mM -> Zugabe von 80µl/ml entspricht 2mM Endkonzentration

5mM Endkonzentration: 1ml Alanin Stammlösung wird mit 8,25ml destilliertem Wasser vermischt
= 61,5 mM -> Zugabe von 80µl/ml entspricht 5mM Endkonzentration

Herstellung von Dipeptamin-Stammlösung

Dipeptamin Stammlösung (Fresenius) = 920 mM

1mM Endkonzentration: 1ml Fresenius Stammlösung werden mit 82,63 ml destilliertem Wasser vermischt = 11mM -> Zugabe von 80µl/ml entspricht 1mM Endkonzentration

2mM Endkonzentration: 1ml Fresenius Stammlösung werden mit 38,14 ml destilliertem Wasser vermischt = 23,5 mM -> Zugabe von 80µl/ml entspricht 2mM Endkonzentration

5mM Endkonzentration: 1ml Fresenius Stammlösung werden mit 14 ml destilliertem Wasser vermischt = 61mM -> Zugabe von 80µl/ml entspricht 5mM Endkonzentration

Herstellung von Stainingbuffer:

500 ml PBS

0,2 % BSA

0,1 % Na₂N₃

pH-Wert 7,4-7,6

3.5.2 Einfluss von Glutamin auf die Zytokinexpression

Der Einfluss von Glutamin in den Konzentrationen 2mM und 5mM auf die Produktion von IL-6, IL-8 und TNF- α wurde untersucht. 2 μ l der 2ng/ml LPS Lösung und 10 μ l BFA wurden in 708 μ l RPMI in einem 5 ml Polyethylenröhrchen vorgelegt und gemischt. 80 μ l der verdünnten Glutamin-Stammlösung und 200 μ l Vollblut wurden zugegeben, so dass das Endvolumen 1ml betrug. Die Inkubationszeit betrug 3 Stunden. Kontrollen: Leerwert und 10 μ l PE rat IgG_{2a} Isotypkontrolle. Inkubation ohne Glutamin vs. Inkubation mit Glutamin diente als negativ Kontrolle. Die Ergebnisse wurden als MFI [relative Einheiten] und als Anteil [%] der Interleukin positiven Monozyten an der Gesamtzahl der Monozyten registriert.

3.5.3 Einfluss von Alanin und Dipeptamin auf die Zytokinexpressionskinetik

Der mögliche Effekt von Alanin und Dipeptamin auf die Kinetik der IL-6, IL-8 und TNF- α Produktion wurde untersucht. Der Versuchsablauf verlief wie beim Glutamin. 2 μ l der 2ng/ml LPS Lösung und 10 μ l BFA wurden in 708 μ l RPMI in einem 5 ml Polyethylenröhrchen gemischt. 80 μ l der verdünnten Alanin-Stammlösung/Dipeptamin-Stammlösung und 200 μ l Vollblut wurden zugegeben. Inkubationszeiten waren 3 Stunden. Als Kontrollen dienten mit Isotypantikörper gefärbte Zellen. Inkubation ohne Alanin/Dipeptamin vs. Inkubation mit Alanin/Dipeptamin diente als negativ Kontrolle. Es wurde die MFI und der Anteil [%] für IL-6, IL-8 und TNF- α positiven Monozyten an der Gesamtzahl der Monozyten erfasst.

3.6 Datenanalyse

Es wurden 20.000 Zellen pro Messung registriert. FSC und SSC wurden in einem Streudiagramm dargestellt, um die Schwellenwerte für den FSC festzulegen. In einem weiteren Streudiagramm FSC vs. Fluoreszenzkanal (FL)-1 (CD14-FITC) wurden die CD14 positiven Zellen mittels „Region of interest“ (ROI) markiert, siehe Abbildung 5. Die CD14 positiven Zellen wurden in einem Histogramm für FL-2 (PE Interleukinfluoreszenz) dargestellt. Die Marker M1 und M2 zur Bestimmung der Interleukin positiven Monozyten wurden anhand der Isotypkontrollen in den Histogrammen gesetzt. In Abbildung 6 ist als Beispiel eine Auswertung für IL-6, IL-8 und TNF- α dargestellt. Die Gesamtzahl der CD14 positiven Zellen wurde erfasst, sowie der Anteil Interleukin positiver CD14⁺ Zellen (% pos. CD14⁺ Zellen) als Anteil der gesamten Monozytenpopulation. Die MFI (Mean Fluorescence Intensity) sowie der Median der Fluoreszenzintensität wurde registriert.

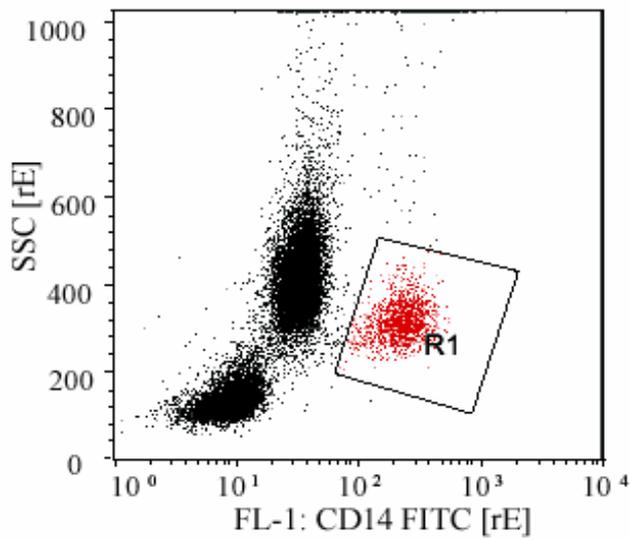


Abb. 5: Beispiel einer Markierung der Monozyten mittels „ROI“- Technik. R1 stellt die Population der CD 14+ Zellen dar.

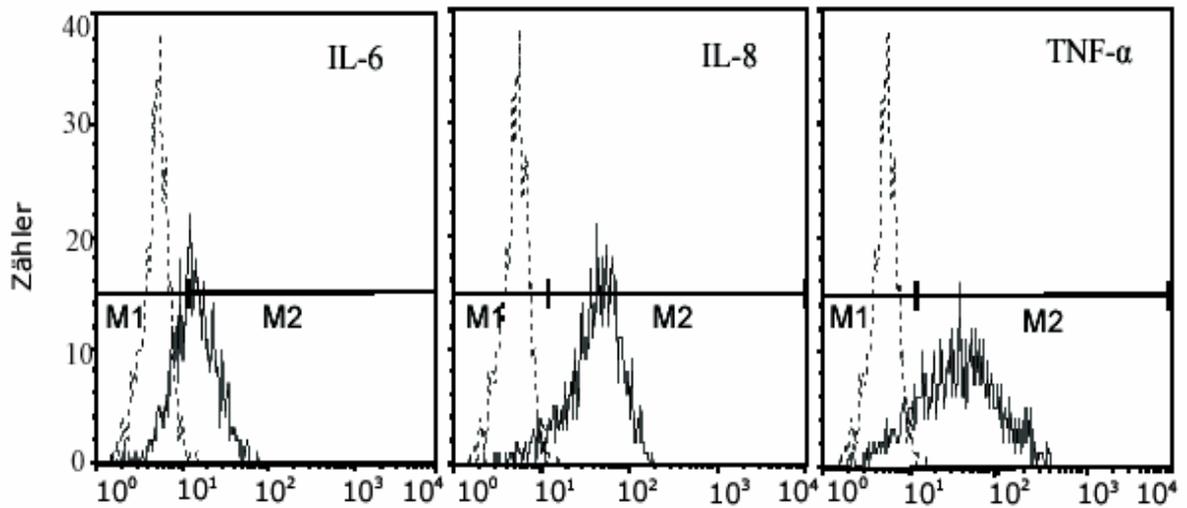


Abb. 6: Beispiel einer Auswertung der Interleukin positiven Zellen mittels Histogrammdarstellung. Gestrichelte Kurve stellt die Isotypkontrolle dar. Die Marker M1 und M2 wurden anhand der Isotypkontrolle festgelegt. Die Durchgehende Linie zeigt die Interleukin positiven Monozyten. M1: Zytokin negative Zellen M2: Zytokin positive Zellen.

3.7 Datenauswertung und Statistik

Zur statistischen Auswertung der erhobenen Werte wird das Datenanalyse und Datenvisualisierungs-Programm Origin® der Firma Originlab (Northampton, MA, USA) verwendet. Als statistisches Verfahren wird der Student´s paired t-test genutzt. Als signifikant unterschiedlich gilt ein p-Wert von $p < 0,05$ (*) und als hochsignifikant ein p-Wert von $p < 0,01$ (**). Die Daten sind als Mittelwert (mean) \pm Standardfehler des Mittelwerts (sem) angegeben.

3.8 Fluoreszenzkompensation

Bei Mehrfarbenfluoreszenzanalysen tritt häufig das Problem auf, dass sich die Fluoreszenzspektren der eingesetzten Fluorochrome so stark überlappen, dass sie sich durch Lichtfilter nicht vollständig voneinander trennen lassen. Ein Beispiel ist die in dieser Arbeit verwendete Kombination von FITC und PE (s.Abb 3, spektrale Überlappung). Unter nichtkorrigierten Bedingungen erscheinen FITC-gefärbte Zellen auch im roten Messkanal (PE-Messkanal), während PE zu einem geringeren Maß auch in den grünen Kanal (FITC-Messkanal) reinstrahlt. Dementsprechend erhält man in unkorrigierten Histogrammprojektionen ungenaue Ergebnisse, weil nur mit FITC beladene Zellen schon als leicht PE-positiv gelten, auch wenn sie keine Zytokinexpression aufweisen. Zur Korrektur der spektralen Überlappung wurde ein Kompensationsverfahren entwickelt, welches von jedem Signalpuls den durch die spektrale Überlappung verursachten Fluoreszenzanteil subtrahiert. Wichtig ist also, dass vor jeder Zytokin-, bzw. Lebend-Tod Messung (s. Kap. 3.9) Messung eine solche Kompensation durchgeführt wird, damit anschließend eine präzise, aussagekräftige Messung erfolgt.

Inkubation und Aufarbeitung

200µl Vollblut wurden jeweils in 3 Falkenröhrchen gegeben und mit Cellwash gewaschen, sowie anschließend für 5 Minuten bei 500xg zentrifugiert. Dieser Waschvorgang wurde ein mal wiederholt. Die Probe des ersten Falkenröhrchens diente zur Einstellung des Zellbildes (Leerwert), in die zweite Probe wurde 10 µl CD14 FITC und in die dritte Probe 10µl CD14 PE zugegeben. Nach 10minütiger Inkubation in Raumtemperatur wurden die Proben mit FACS Lysing versetzt und anschließend für 5 Minuten bei 500xg zentrifugiert. Nach nochmaliger Wiederholung dieses Vorganges wurden die übriggebliebenen Pellets in 300µl Staining Buffer resuspendiert am FACS gemessen.

Fluoreszenzmessung

Zur Messung der Fluoreszenz wurden sogenannte Dot-Plots verwendet, welche die Überlappung der FITC und PE Fluoreszenzen anzeigen. In Abb. 7 sind zwei Dot-plots zur Messung und Kompensation der FITC Fluoreszenz dargestellt

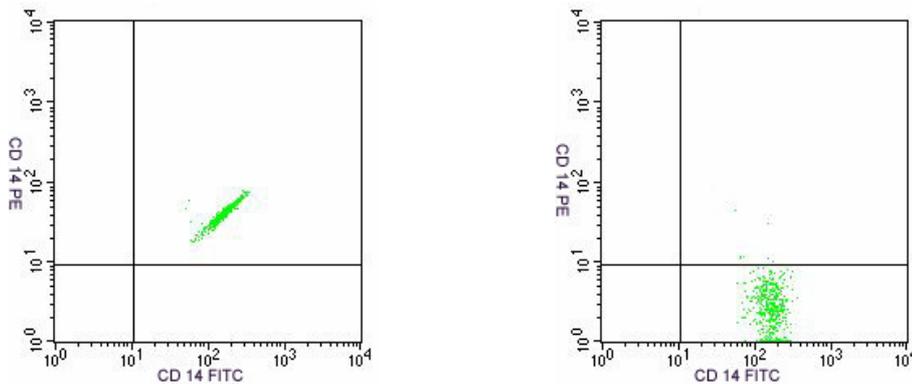


Abb.7: Dot-plots zur Darstellung der FITC Fluoreszenzkompensation. Links ist der unkompensierte Zustand aufgeführt: Das grüne FITC Licht strahlt ebenfalls in den roten PE Kanal hinein und ist somit positiv für FITC, sowie für PE Markierungen. Rechts ist der kompensierte Zustand dargestellt: die FITC Fluoreszenz strahlt nicht mehr in den PE Kanal ein.

Entsprechend der FITC Kompensation geschieht die PE Kompensation. Die Überstrahlung der FITC und PE Fluoreszenzen wird durch Justierung an den entsprechenden Photoröhren korrigiert.

3.9 Lebend-Tod-Färbung (7AAD-Messung)

Mit der Lebend-Tod Färbung wird der Anteil der während dem Versuchsablauf zu Grunde gegangenen Zellen nachgewiesen. Überschreitet dieser Anteil 2%, so muss von einem schädlichen, bzw. toxischen Einfluss der verwendeten Substanzen auf die Zellen ausgegangen werden.

Für diese Messung wird die Substanz 7AAD (7-Aminoactinomycin D) verwendet. 7AAD ist ein von sich aus fluoreszierender DNA Farbstoff, der mit der DNA der Zellen einen Komplex bildet; es bindet selektiv die GC Regionen der DNA. 7AAD dringt sehr langsam in gesunde Zellen ein, eine intakte Zellmembran verhindert die schnelle Permeation des 7AAD. Wird allerdings eine Zelle während des Messvorgangs geschädigt oder getötet, so verliert die Zellmembran ihre Funktion als Schutzbarriere und das 7AAD diffundiert schnell in die Zelle hinein. Dort gelangt es schließlich in den Zellkern und an die DNA, mit welcher es interkaliert. Die Zelle wird somit als „tot“ markiert und kann vom Durchflußzytometer erfasst werden. Wie schon FITC und PE wird auch 7AAD vom Licht des Argon Laser mit der Wellenlänge von 488nm angeregt. Das Emissionsspektrum von 7AAD liegt mit einem Wellenlängenmaxima über 610nm weiter im roten Bereich als FITC (530nm) und PE (570nm).

Ansetzen und Aufarbeiten

Die Proben werden wie bei der intrazellulären Zytokinmessung angesetzt und für drei Stunden bei 37° Celsius und 5% CO₂ inkubiert. Anschließend werden die Proben mit Cellwash gewaschen und für 5 Minuten bei 500xg zentrifugiert. Nach Wiederholung des Waschvorganges werden die Proben mit Ammoniumchlorid (einfach konzentriert) versetzt und für ca. 5-8 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Das Ammoniumchlorid bewirkt eine Lyse der Erythrozyten und sorgt somit für ein reineres Zellbild. Anschließend werden die Proben wieder für 5 Minuten bei 500xg zentrifugiert und in Staining Buffer resuspendiert. Es folgen die CD14 FITC Oberflächenmarkierung und weitere 10 Minuten Inkubation. Im Anschluß werden die Zellen zweimal mit Staining Buffer gemischt und gewaschen und bei 500xg für fünf Minuten zentrifugiert. Zur Messung werden die Proben in 500µl Staining Buffer aufgenommen

Messung

Kurz vor der Messung werden zu jeder Probe 5µl 7AAD¹⁾ (Endkonzentration :1µg/ml) hinzugegeben. Durch Minimierung des zeitlichen Abstand zwischen 7AAD Gabe und Messung soll die Diffusion von 7AAD in den Zellkern verhindert werden, was eine noch lebende Zelle als tot markieren könnte.

Die Lebend-Tod Färbung wird in Form von Histogrammen dargestellt. Zur Kontrolluntersuchung wird die Substanz NP40 verwendet. NP40 ist ein Detergens, welches gezielt die Plasmamembran angreift, sie zerstört und somit den Tod der Zelle verursacht. Das 7AAD bindet in diesen Zellen problemlos an den Zellkern. Alle in der Kontrolle gemessenen Zellen gelten somit als tot. Zur Kennzeichnung der Bereiche „lebend“ und „tot“ werden die Marker M1 und M2 gesetzt..

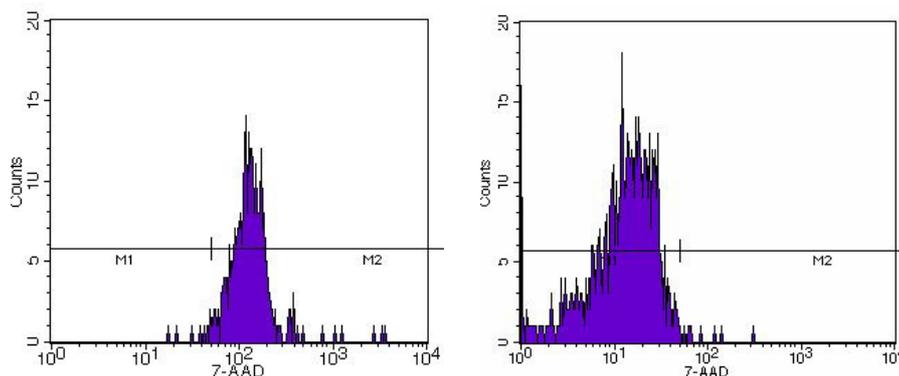


Abb. 8: Das Beispiel zeigt links die positiv Kontrolle. 99,82% der Zellen sind tot und liegen somit im Bereich M2. Das rechte Beispiel zeigt eine Kurve von lebenden Zellen im Bereich M1. 99,4% der Zellen leben noch, während nur 0,60% im Bereich M2 liegen.

Liegen mehr als 2% der Zellen im „toten“, bzw. im M2 Bereich, ist mit einer schädigenden, bzw. toxischen Wirkung der untersuchten Substanzen zu rechnen. Dies war jedoch weder beim Glutamin,

noch beim Alanin oder Dipeptamin der Fall, so dass davon ausgegangen werden kann, dass die untersuchten Aminosäurelösungen in den vorgegebenen Konzentrationen nicht toxisch auf die Zellen wirken.

¹⁾ **Verdünnung des 7AAD (1mg, Firma Sigma):**

Stammlösung: 1mg 7AAD Methanol lösen + Zugabe von 950µl FACS-Flow → 1mg/1ml

Endkonzentration: 1:10 Verdünnung der Stammlösung:

900µl FACS Flow + 100µl der Stammlösung → 0,1

vor der Messung Zugabe von 5µl auf 500µl → 1µg/ml

4. Ergebnisse

4.1 Einfluß von Alanin, Glutamin und Alanyl-Glutamin auf die intrazelluläre Zytokinexpression ohne LPS Stimulation

Um festzustellen, ob Ala, Gln oder Ala-Gln (Dipeptamin) schon unter *nicht septischen* Zuständen einen Einfluss auf die Produktion von IL-6, IL-8 und TNF- α haben, wurden die drei Substanzen ohne LPS Stimulation mit Vollblut inkubiert. Die Konzentration der untersuchten Substanzen betrug jeweils 5mM, die Inkubationszeit 3 Stunden. Als Negativkontrolle wurde unstimuliertes Vollblut ohne Zusatz verwendet. Die Probandenzahl (n) betrug bei Glutamin und Dipeptamin = 12 und beim Alanin = 13. In Tabelle 2 ist zu erkennen, dass sich die IL-6 und TNF- α Expression unter Gabe von Gln, Ala und Ala-Gln nicht verändern, während die IL-8 Produktion signifikant steigt.

	Negativkontrolle	IL-6	TNF- α	IL-8
Glutamin	36,79 \pm 17,01	39,2 \pm 29,67	29,5 \pm 17,09	112,89 \pm 95,5*
Alanin	32,41 \pm 25,28	34,29 \pm 35,72	90,59 \pm 188,1	103,6 \pm 87,72 *
Alanyl-Glutamin	12,4 \pm 6,46	20,59 \pm 16,59	16,44 \pm 15,49	75,16 \pm 61,78 **

Tabelle 2: Dargestellt ist der Anteil (%) an Interleukin positiven CD14⁺ Zellen x die Mean Fluorescence Intensity (MFI) Die Daten stellen den Mittelwert \pm Standardabweichung dar. Signifikante Werte sind mit * = p<0,05 und ** = p<0,01 gekennzeichnet.

Abb. 9 und 10 stellen bezüglich der IL-8 Expression, den Anteil der CD14⁺ positiven Zellen und die Mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) getrennt dar:

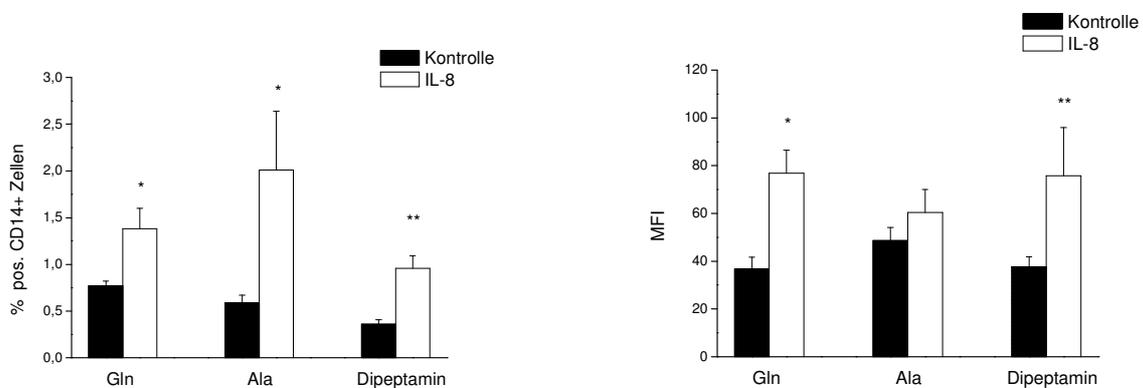


Abb. 9 und 10: Anteil der IL-8 positiven Zellen und die MFI sind getrennt dargestellt.

Signifikanz ist mit * = p< 0,05 und ** = p< 0,01 gekennzeichnet.

Der Anteil CD14⁺, IL-8 exprimierender Zellen, wird durch Glutamin um von 0,77 ± 0,05% auf 1,38 ± 0,22% erhöht. Alanin vergrößert die IL-8 Synthese von 0,59 ± 0,08% auf 2,01 ± 0,63% und Dipeptamin von 0,36 ± 0,05% auf 0,96 ± 0,13%.

Die Mean Fluorescence Intensity (MFI) wird durch Glutamin fast verdoppelt (von 47,69 ± 5,11 auf 76,87 ± 9,62) und durch Alanyl-Glutamin fast verdreifacht (von 47,59 ± 5,11 auf 76,87 ± 9,62). Alanin ändert die MFI nicht signifikant (48,62 ± 5,44 vs. 60,39 ± 9,67).

4.2 Einfluß von Glutamin auf die IL-6, IL-8 und TNF- α Expression von Monozyten unter LPS Stimulation

Zur Erstellung eines *in vitro* Sepsis Modell wurden die Vollblutproben mit LPS (0,2ng/ml) versetzt. Um den Einfluß des Glutamins auf dieses Sepsismodell zu untersuchen wurden die LPS-enhaltenden Vollblutproben gleichzeitig mit Glutamin inkubiert. Glutamin wurde dabei in den Konzentrationen 2mM und 5mM verwendet; die Inkubationszeit betrug drei Stunden. Der Kontrollprobe wurde nur LPS (0,2ng/ml) zugeführt. Die Anzahl der untersuchten Probanden betrug 12 (n = 12).

Tabelle 3 lässt erkennen, dass Glutamin die IL-6 und TNF- α Expression unter LPS Gabe deutlich reduziert. Die IL-8 Produktion wird leicht gesenkt, das Ergebnis ist jedoch nicht signifikant.

	IL-6	IL-8	TNF-α
LPS (0,2ng/ml)	5223,5 ± 1928	21760 ± 17692	4474 ± 2003
LPS + Gln 2mM	4178 ± 1605**	19938 ± 16069	3173 ± 1588 *
LPS + Gln 5mM	4088,4 ± 1638**	18863 ± 14011	3272,8 ± 1558**

Tabelle 3 zeigt den Einfluss von LPS + Gln auf die Zytokinexpression. Die Werte sind das Produkt aus % positiver Zellen und MFI dar. Signifikante Ergebnisse sind mit * = p< 0,05 und ** = p< 0,01 gekennzeichnet.

In keinem der gezeigten Zytokinmuster zeigt sich ein signifikanter Unterschied zwischen den untersuchten Konzentrationen, d.h. Gln 5mM verändert die Zytokinproduktion nicht signifikant anders als Gln 2mM.

Um zu untersuchen, welche Rolle der Anteil CD14⁺ interleukinproduzierender Zellen und die MFI an der Veränderung der IL-6 und TNF- α Expression spielen, werden in Abb. 11 und 12 beide Komponenten getrennt dargestellt.

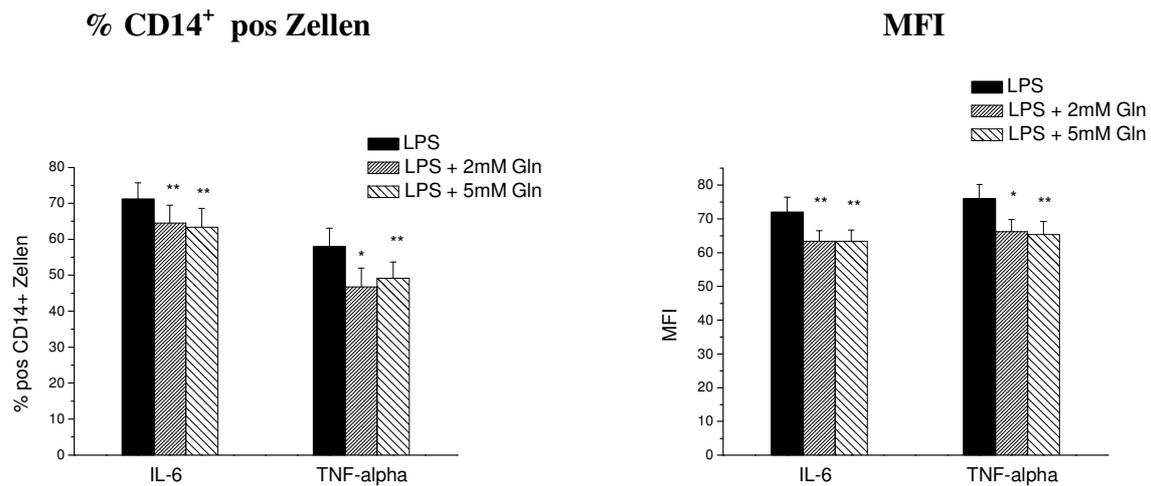


Abb. 11 und 12: Der Anteil interleukinproduzierender CD14⁺ Zellen – gemessen an der Gesamtpopulation CD14⁺ Zellen - und die Mittlere Fluoreszenz Intensität sind getrennt dargestellt. Die Werte entsprechen dem Mittelwert \pm Standardabweichung (SEM). Die schwarzen Balken zeigen die LPS Kontrolle. Der erste schraffierte Balken zeigt den Einfluss von Gln 2mM, der zweite schraffierte Balken veranschaulicht den Einfluss von Gln 5mM. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$

Für die in Tabelle 3 dargestellte signifikante Verringerung der IL-6 und TNF- α Zytokinexpression, sind sowohl eine Reduzierung der interleukinproduzierenden Zellen, sowie eine Verminderung der mittleren Fluoreszenzintensität verantwortlich. Der Anteil IL-6 produzierender Monozyten nimmt unter Glutamin von $71,17 \pm 4,53\%$ (LPS-Kontrolle) auf $64,5 \pm 4,04\%$ (LPS + 2mM Gln) und $63,23 \pm 5,23\%$ (LPS + Gln 5mM) ab. TNF- α exprimierende Monozyten vermindern sich unter Glutamin um bis zu 11%; der Anteil der TNF- α produzierenden Monozyten sinkt von $57,91 \pm 5,12\%$ (LPS) auf $46,76 \pm 5,2\%$ (LPS + 2mM Gln) und $49,16 \pm 4,52\%$ (LPS + Gln 5mM).

Auch die Mittlere Fluoreszenzintensität von IL-6 und TNF α wird bei LPS stimulierten Monozyten durch Glutamin signifikant vermindert [**IL-6**: von $71,99 \pm 4,47$ (LPS-Kontrolle) auf $63,32 \pm 3,23$ (LPS + 2mM Gln) und $63,4 \pm 3,28$ (LPS + 5mM Gln); **TNF- α** : von $75,95 \pm 4,31$ (LPS-Kontrolle) auf $66,23 \pm 3,58$ (LPS + 2mM Gln) und $65,35 \pm 3,54$ (LPS \pm 5mM Gln)].

4.3 Einfluss von Alanin auf die Zytokinexpression von Monozyten unter LPS Gabe

Die Vollblutproben wurden gleichzeitig mit LPS (2ng/ml) und Alanin in den Konzentrationen 2mM und 5mM für drei Stunden inkubiert. Als Kontrollprobe wurde auch hier eine Vollblutprobe mit alleiniger LPS Gabe (0,2ng/ml) verwendet. Die IL-6, IL-8 und TNF- α Expression wurden ausgewertet. Die Probandenanzahl betrug hier 13 (n =13).

Alanin erhöht signifikant die IL-6 Produktion von LPS stimulierten Monozyten. Die TNF- α Expression wird signifikant reduziert, während die IL-8 Produktion nicht signifikant verändert wird.

	IL-6	IL-8	TNFα
LPS (2ng/ml)	5119 \pm 2312	18737 \pm 10906	6746,9 \pm 3509
LPS + Ala 2mM	6087 \pm 2206**	15095 \pm 8903	5526,2 \pm 2954*
LPS + Ala 5mM	6161 \pm 2066*	22955 \pm 6711	5629,3 \pm 3135*

Tabelle 4: Die Ergebnisse sind als Produkt von % zytokinproduzierender CD14⁺Zellen und MFI dargestellt. Signifikanz: * = p<0,005, ** = p< 0,001

Auch beim Alanin unterscheiden sich die untersuchten Konzentrationen (2mM vs. 5mM) nicht signifikant hinsichtlich ihrer Zytokinexpression.

In Abb. 13 und 14 werden die IL-6 und TNF- α Expression bezüglich der CD14⁺ zytokinproduzierender Zellen und der Mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) getrennt dargestellt.

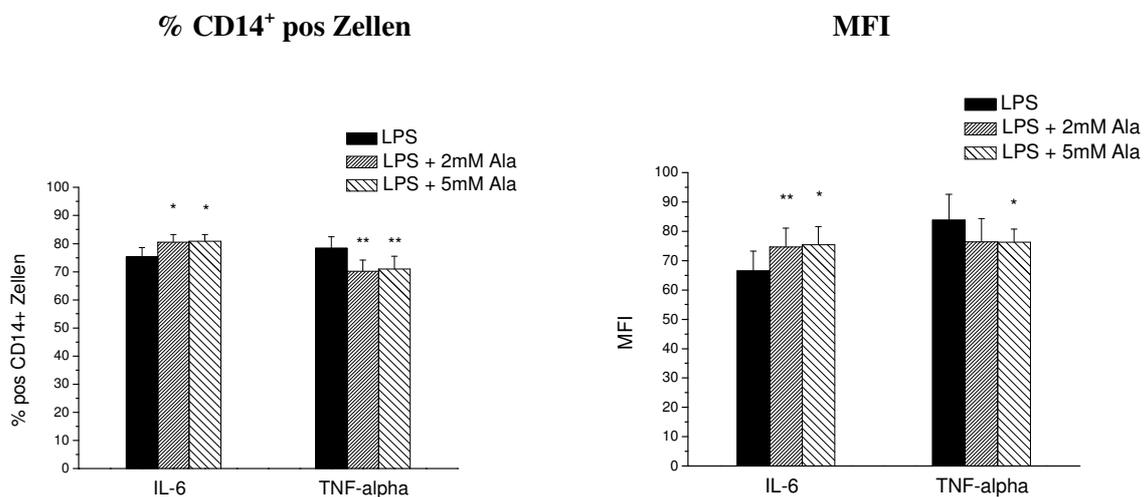


Abb. 13 und 14: Abgebildet sind der Anteil zytokinproduzierender Monozyten und die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI). Die Werte entsprechen dem Mittelwert \pm SEM. Der schwarze Balken stellt die LPS Kontrolle dar. Der erste schraffierte Balken zeigt den Einfluss von Ala 2mM, der zweite schraffierte Balken veranschaulicht den Einfluss von Ala 5mM. Signifikanz: * = p<0,05; ** = p<0,01.

Der Anteil IL-6 exprimierender Monozyten steigt leicht, aber signifikant, von 75,73 \pm 3,23% bei LPS-Kontrolle auf 80,48 \pm 2,77 bei LPS + 2mM Alanin und 80,84 \pm 2,77% bei LPS + 5mM Alanin. Die MFI erhöht sich ebenfalls signifikant durch Alaningabe von 66,5 \pm 6,67 (LPS) bis zu 74,67 \pm 6,37 (LPS + 2mM Ala) und 75,47 \pm 6,11 (LPS + 5mM Ala).

Die TNF α Expression wird durch Alanin hingegen signifikant gesenkt. Sowohl der Anteil TNF- α produzierender Zellen als auch die MFI werden durch Alanin vermindert. Der Anteil TNF- α exprimierender Monozyten verringert sich von 78,4 \pm 4,05% (LPS) auf 70,19 \pm 5,99 (LPS + 2mM

Ala) und $71,92 \pm 4,76\%$ (LPS + 5mM Ala). Die MFI wird von $83,75 \pm 8,85$ (LPS) auf $76,44 \pm 7,91$ (LPS + 2mM Ala) und $76,24 \pm 7,93$ (LPS + 5mM Ala) reduziert.

4.4 Einfluss des Dipeptides Alanyl-Glutamin auf die Zytokinexpression von Monozyten unter LPS Gabe

Die Vollblutproben wurden mit LPS (0,2ng/ml) und Alanyl-Glutamin versetzt. Die untersuchten Konzentrationen des Dipeptamin betragen 1mM, 2mM und 5mM. Die Proben wurden für drei Stunden inkubiert. Auch hier galt, dass die Kontrollprobe nur mit LPS (0,2 ng/ml) inkubiert wurde. Die Anzahl der Probanden betrug 12 (n = 12).

Die Resultate zeigen, dass Alanyl-Glutamin (Dipeptamin) die IL-6 und IL-8 Expression im in-vitro Sepsismodell nicht beeinflusst, während die TNF- α Produktion eindeutig in allen drei Konzentrationen verringert werden kann. Die Effekte der Einzellösungen Glutamin und Alanin scheinen sich in der Kombinationslösung Dipeptamin zu addieren.

	IL-6	IL-8	TNF-α
LPS (0,2ng/ml)	5346,4 \pm 3422	27725 \pm 17943	5269,2 \pm 3379
LPS + Dipeptid 1mM	5412,3 \pm 3522	26270 \pm 18474	3414,5 \pm 1860**
LPS + Dipeptid 2mM	5840,8 \pm 3583	27735 \pm 18767	3560,1 \pm 2017**
LPS + Dipeptid 5mM	5230 \pm 3330	27007 \pm 17698	3115,3 \pm 1695**

Tabelle 5 zeigt die Veränderung der Zytokinexpression durch Ala-Gln (Dipeptid) + LPS Gabe. Die Resultate ergeben sich aus dem Produkt der interleukinproduzierender CD14+ Zellen und der MFI. Die Signifikanz ist gekennzeichnet mit ** = p < 0,01.

Wie schon beim Glutamin und Alanin zeigen sich auch beim Dipeptamin keine signifikante Unterschiede der untersuchten Konzentrationen auf die Interleukinproduktion (1mM, 2mM & 5mM). In den folgenden Abbildungen wird ersichtlich, dass Ala-Gln unter LPS Gabe die TNF- α Fluoreszenzintensität und vor allem den Anteil TNF- α produzierender CD14+ Zellen signifikant reduziert.

Der Vollständigkeit halber werden in Abb. 15 und 16 die IL-6 und TNF- α Produktion hinsichtlich der % CD14+ Zellen und der MFI getrennt dargestellt.

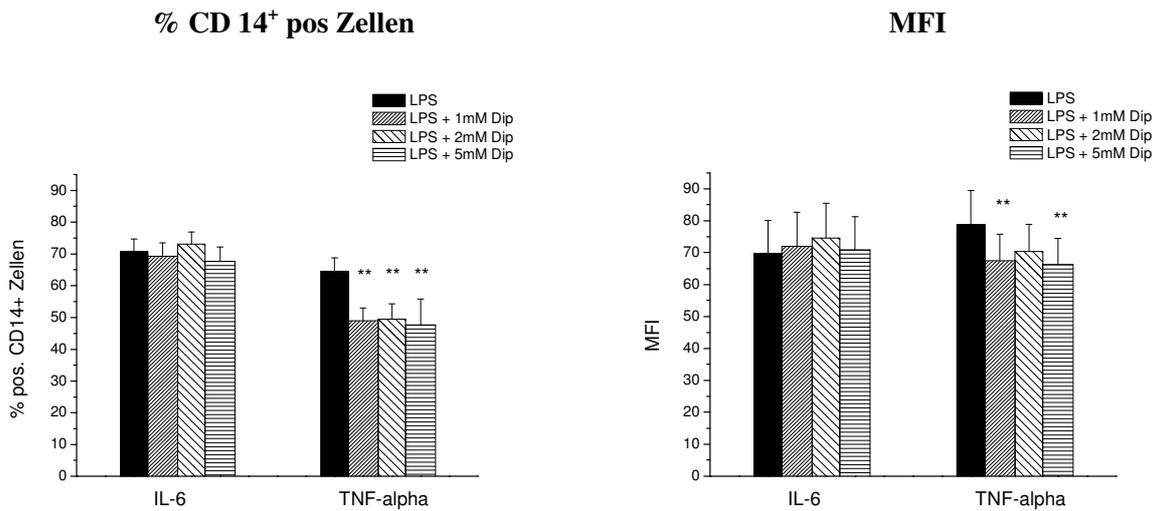


Abb. 15 und 16: Darstellung des Anteil interleukinproduzierender CD14⁺ Zellen und der MFI unter LPS und Dipeptid Gabe. Die Werte entsprechen dem Mittelwert \pm SEM. Die schwarzen Balken zeigen die LPS Kontrolle. Die weiteren Balken veranschaulichen den Einfluß von Dipeptamin (1mM, 2mM und 5mM) unter LPS Gabe. Die Signifikanz ist mit *= $p < 0,05$ und **= $p < 0,01$ gekennzeichnet.

Der Anteil TNF- α produzierender Monozyten wird durch das Dipeptamin deutlich reduziert. Der Prozentanteil sinkt von $64,5 \pm 4,08\%$ (LPS-Kontrolle) auf $48,95 \pm 4,08\%$ (LPS + 1mM Dip), $49,49 \pm 4,77\%$ (LPS + 2mM Dip) und $47,64 \pm 5,83\%$ (LPS + 5mM Gln). Die MFI der TNF- α Expression verringert sich ebenfalls signifikant von $78,78 \pm 10,6$ auf $67,45 \pm 8,37$ (LPS + 1mM Dip), $70,43 \pm 8,42$ (LPS + 2mM Dip) und $66,21 \pm 8,2\%$ (LPS + 5mM Dip).

Der Anteil interleukinproduzierender Monozyten und die mittlere Fluoreszenzintensität ändern sich unter Dipeptamin Gabe nicht signifikant bezüglich IL-6 und IL-8.

4.5 Unterschiede in der Zytokinexpression: ein Vergleich zwischen Glutamin, Alanin und Dipeptamin

Folgende Diagramme sollen nochmals die unterschiedlichen Wirkungen der untersuchten Substanzen auf die Zytokinexpression vergleichen. Um die Unterschiede besser heraus zukristallisieren, werden die einzelnen Interleukine getrennt dargestellt.

Die Werte entsprechen dem Produkt von der mittleren Fluoreszenzintensität und dem Anteil interleukinproduzierender CD14⁺ Zellen. Sie stellen dem Mittelwert \pm Standardabweichung dar.

4.5.1 IL-6

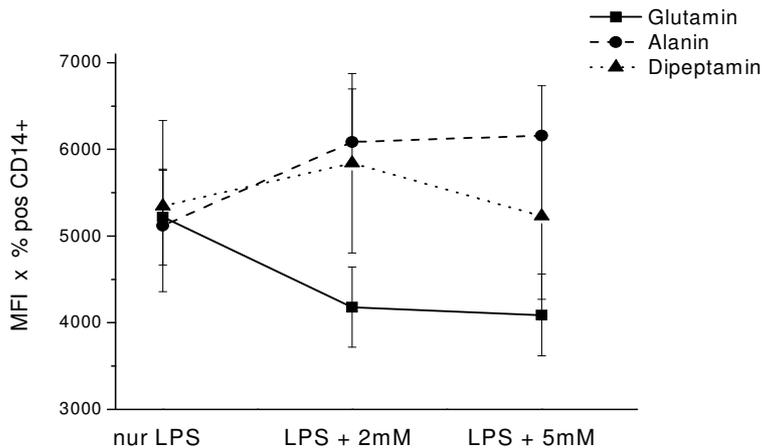


Abb 17: Die IL-6 Expression abhängig von der hinzugegebenen Effektorsubstanz. Alanin erhöht signifikant die IL-6 Synthese, während Glutamin diese signifikant verringert. Dipeptamin hat keinen signifikanten Einfluß auf die IL-6 Synthese.

Aus der Abbildung wird ersichtlich, dass Glutamin die IL-6 Produktion deutlich von $5223,5 \pm 1928$ (LPS-Kontrolle) auf $4178,7 \pm 1605$ bei LPS + Gln 2mM ($p= 0,09$) und auf $4088,4$ bei LPS + Gln 5mM ($p= 0,018$) verringert. Dies entspricht einer Zytokinreduktion von 20% (2mM Gln) und 22% (5mM Gln).

Alanin erhöht hingegen die IL-6 Expression. Die Werte steigen von 5119 ± 2312 (LPS Kontrolle) auf 6087 ± 2206 bei LPS + Ala 2mM ($p=0,005$) und 6161 ± 2066 bei LPS + Ala 5mM ($p= 0,046$). Die IL-6 Produktion erhöht sich demnach um 19% bei 2mM Alanin und 20% bei 5mM Alanin-Gabe unter septischen Zuständen.

Die Effekte des Glutamins und Alanins scheinen sich beim Dipeptamin zu addieren; bei diesem ist keine signifikante Veränderung der IL-6 Produktion ersichtlich.

4.5.2 IL-8

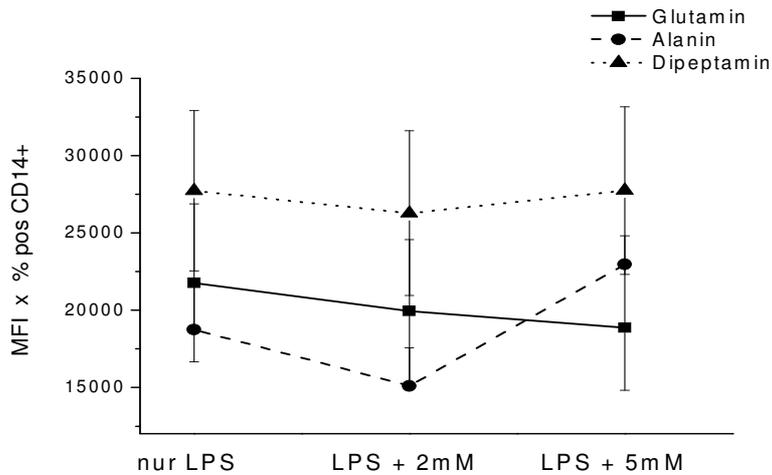


Abb 18: Dargestellt ist die IL-8 Expression abhängig von der hinzugegebenen Effektorsubstanz. Es wurde keine signifikante Veränderung festgestellt.

Die IL-8 Produktion kann durch keine der untersuchten Effektorsubstanzen signifikant verändert werden. Zwar scheint Glutamin die IL-8 Expression tendenziell zu senken [von 21760 ± 17692 (LPS Kontrolle) bis hinzu auf 18863 ± 14011 bei LPS + Gln 5mM], das Ergebnis ist mit $p=0,084$ jedoch nicht statistisch signifikant.

4.5.3 TNF- α

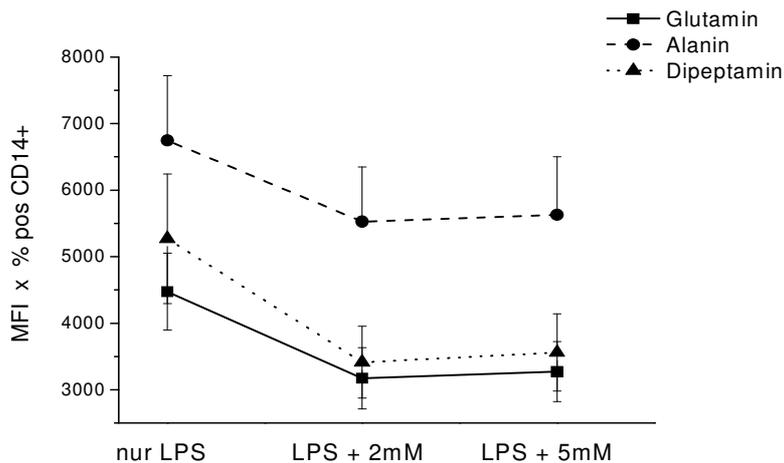


Abb 19 zeigt die TNF- α Expression abhängig von der hinzugegebenen Effektorsubstanz. Alle drei Aminosäurelösungen reduzieren signifikant die TNF- α Produktion im *in-vitro* Sepsis Modell.

Von den dargestellten Zytokinen, ist TNF- α das einzige, welches sich durch alle drei untersuchten Substanzen beeinflussen lässt. Die TNF- α Produktion wird im *in vitro* Sepsis Modell durch alle drei Substanzen signifikant reduziert.

Am deutlichsten wird die TNF- α Expression durch das Dipeptamin gesenkt. Hier verringert sich die Interleukinproduktion von $5269,2 \pm 3379$ (LPS Kontrolle) bis auf minimal $3115,3 \pm 1695$ bei LPS + Ala-Gln 5mM. Dies entspricht einer Reduzierung der TNF- α Expression von 40%.

Unter Glutaminzufuhr wird die TNF- α Expression ebenfalls deutlich verringert. Die Werte nehmen von 4474 ± 2003 (LPS Kontrolle) auf 3272 ± 1558 bei Glutamin 5mM ab ($p=0,007$). Die Reduzierung beträgt hier 27%.

Auch Alanin senkt die TNF- α Expression im *in vitro* Sepsis Modell. Die Verringerung beträgt hier allerdings nur maximal 17% (bei Alanin 5mM). Die Zytokinexpression kann von 6750 ± 3509 (LPS) auf bis zu 5629 ± 3135 (LPS + Ala 5mM) reduziert werden.

5. Diskussion

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die untersuchten Aminosäurelösungen sowohl mit als auch ohne zusätzliche Gabe von LPS einen signifikanten Einfluss auf die pro-inflammatorische Zytokinexpression von Monozyten haben. Im Folgenden werden die untersuchten Substanzen und die aus dieser Arbeit resultierenden Ergebnisse vor dem Hintergrund der heutigen medizinischen Literatur gewertet und die klinische Relevanz von Glutamin, Alanin und Dipeptamin diskutiert.

5.1 Einfluss von Glutamin, Alanin und Dipeptamin auf die Zytokinexpression ohne LPS

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass Glutamin, Alanin und Dipeptamin in Abwesenheit von LPS die IL-8 Expression signifikant gegenüber der Kontrollgruppe erhöhen. In der heutigen medizinischen Literatur wurde hauptsächlich Glutamin hinsichtlich der Wirkung auf die Zytokinexpression untersucht.

Murphy & Newsholme (1999) konnten zeigen, dass Glutamin in Abwesenheit von LPS die TNF- α Produktion in Makrophagen signifikant erhöht. Wie in der vorliegenden Arbeit, handelt es sich bei Murphys & Newsholme Studie um ein *in vitro* Modell. In den Kontrollgruppen war kein Glutamin vorhanden. Schon eine Erhöhung der Glutaminkonzentration von 0mM auf 0,2mM führte zu einem steilem Anstieg der TNF- α Expression. Murphy & Newsholme schliessen aus ihren Ergebnissen, dass für eine adäquate Zytokinproduktion ein Minimum an Glutamin vorhanden sein muss. Glutamin spielt eine wichtige Rolle in der Synthese von Purinen, Pyrimidinen und anderen Aminosäuren. Zellspezifische Funktionen von Makrophagen und Monozyten sind auf eine externe Glutaminzufuhr angewiesen (Murphy et al. 1999). Zu diesen zellspezifischen Funktionen gehören unter anderem Phagozytose, Ausschüttung von freien Radikalen, Eicosanoid-Produktion und die Synthese sowie Recycling der Zellmembran (Newsholme 2001).

Der durchschnittliche Glutaminplasmaspiegel beträgt unter physiologischen Umständen 0,6 mmol (Calder et al. 1999; Parveen et al. 1998). In Stresszuständen – wie Polytrauma, Verbrennung, Operationen und Infektionen - steigt der Verbrauch von Glutamin deutlich an (Calder et al. 1999); es kommt zur Verarmung der Glutaminspeicher und zu einem Abfall der Glutaminkonzentration. Auch wenn der Glutaminplasmaspiegel in extremen Stresssituationen nicht unter 0,2mM absinkt (Spittler et al. 1995), ist wahrscheinlich, dass die Glutaminzufuhr an minderdurchblutenden Stellen oder auch an Stellen des Entzündungsgeschehens deutlich niedriger ist, und somit zu einer Einschränkung der Immunfunktion führen kann (Parveen et al. 1998).

In klinischen Studienmodellen konnte gezeigt werden, dass unter physiologischen, nicht septischen Zuständen Glutamin zu keiner Zytokinerhöhung führt (Kew et al. 1999).

Die Wirkung von Alanin und Dipeptamin auf die Zytokinproduktion in Abwesenheit von LPS, ist in der heutigen Literatur noch nichts beschrieben worden. In der vorliegenden Arbeit führen Alanin und Dipeptamin – wie schon das Glutamin - zu einer Erhöhung der IL-8 Produktion. Über einen relevanten klinischen Nutzen kann jedoch nur spekuliert werden. Laut der Ergebnisse wäre es annehmbar, dass auch Alanin eine wichtige Rolle für die Immunfunktion und Immunmodulation spielt. Dies konnte in bisherigen Studien jedoch nicht nachgewiesen werden. Unsicher ist auch, ob das Alanin und Dipeptamin unter klinisch normalen Umständen zu einer Zytokinerhöhung führen. Weitere Studien werden nötig sein, um den Effekt von Alanin und Dipeptamin auf Immunfunktion und Zytokinexpression zu eruieren.

5.2 Einfluss von Glutamin, Alanin und Dipeptamin + LPS auf die Zytokinexpression

In Anwesenheit von LPS wird die TNF- α Expression durch alle drei untersuchten Substanzen signifikant verringert. Hinsichtlich der IL-6 Expression zeigen sich unterschiedliche Wirkungen von Alanin, Glutamin und Dipeptamin. Während Glutamin die IL-6 Produktion signifikant reduziert, wird diese durch Alanin erhöht. Dipeptamin beeinflusst die IL-6 Expression nicht signifikant.

Eine Senkung proinflammatorischer Zytokine während einer Sepsis kann möglicherweise von therapeutischem Vorteil sein. Hohe IL-6, IL-8 und TNF- α Spiegel während Sepsis sind prognostisch ungünstig und korrelieren mit einem schlechtem Outcome (Cavaillon et al. 2003).

5.3 Einfluss von Glutamin + LPS auf die Zytokinproduktion

Aus den Ergebnissen dieser Arbeit wird ersichtlich, dass – in Anwesenheit von LPS - Glutamin als Einzelsubstanz den bedeutendsten modulierenden, anti-inflammatorischen Effekt auf die Ausschüttung der untersuchten pro-inflammatorischen Zytokine hat. Glutamin reduziert signifikant die IL-6 und TNF- α Produktion. Auch die IL-8 Synthese wird tendenziell - jedoch nicht statistisch signifikant - gesenkt.

In Studienmodellen konnte gezeigt werden, dass das Zytokinexpressionsmuster unter LPS-Gabe, bzw. in klinischen Stresszuständen sehr stark von der extrazellulären Glutaminkonzentration abhängt. Die Ergebnisse sind jedoch zum Teil widersprüchlich.

Murphy & Newsholme (1999) konnten zeigen, dass Glutamin die TNF- α Produktion in Bacillus Calmette Guerin (BCG)-aktivierten Makrophagen, sowie die IL-8 Expression in LPS-stimulierten Monozyten signifikant erhöht, was im Widerspruch zu den Ergebnissen unserer Arbeit steht. Die Unterschiede könnten sich durch den andersartigen Studienablauf erklären. Murphy & Newsholme benutzten in ihrer Arbeit viel höhere Inkubationszeiten (bis zu 48 Stunden im Vgl. zu drei Stunden),

eine viel höhere LPS Konzentration (15µg/ml im Vgl. zu 0,2ng/ml) und als Messverfahren das Enzyme Linked Immuno Assay (ELISA im Ggs. zur Durchflußzytometrie). Um die spezifische Produktion von einem einzelnen Zelltyp wie z.B. Monozyten zu untersuchen – so wie es bei Murphy und Newsholme geschehen ist – ist man mit ELISA auf reine Makrophagen-/Monozytenkulturen und damit auf eine vorhergehende Isolierung angewiesen. Damit verliert man jedoch den möglichen Einfluss von wichtigen Kofaktoren. Zusätzlich führt eine Isolierung in den meisten Fällen bereits zu einer Aktivierung der Makrophagen/Monozyten.

Yaqoob & Calder (1999) zeigen eine glutaminabhängige Erhöhung der IL-6 und TNF-α Produktion in Mononukleären Zellen (PBMCs= peripheral blood mononuclear cells). PBMCs bestehen aus einer Vielzahl verschiedener Zellen, von denen Monozyten nur 10-15% ausmachen; die restlichen 85-90% bestehen aus Lymphozyten. Die PBMCs wurden entweder mit Con A (Mitogen für T-Lymphozyten) oder LPS (Aktivator von Makrophagen, Monozyten und B-Lymphozyten) stimuliert und anschließend mit aufsteigenden Glutaminkonzentrationen inkubiert. In Con A aktivierten PBMCs stiegen die IL-6 und TNFα Expressionsraten unter Glutamin signifikant an. Bei LPS stimulierten PMBCs führte Glutamin zu einer leichten, jedoch signifikanten IL-6 Erhöhung, während TNF-α sich nicht signifikant veränderte. Yaqoob & Calders schließen aus ihren Ergebnissen, dass vor allem Lymphozyten unter Glutamin zu einer verstärkten Zytokinproduktion angeregt werden, während die Zytokinexpression von Monozyten nicht so stark Glutamin-abhängig ist.

Erklärungen für die widersprüchlichen Ergebnisse von Yaqoobs & Calders Arbeit und der vorliegenden Studie könnten die unterschiedlich eingesetzten Zellarten (PBMCs vs. Monozyten), eine höhere Inkubationszeit (24 Stunden vs. 3 Stunden) sowie die verschiedenen LPS Konzentrationen sein. Yaqoob & Calder, wie auch schon Murphy & Newsholme – verwendeten sehr hohe LPS Konzentrationen. Die in unserer Arbeit eingesetzte LPS Konzentration von 0,2ng/ml wurde aus früher durchgeführten Arbeiten über das *in vitro* Sepsis Modell übernommen. Hierbei ergab sich für die ED₅₀ von IL-8 und TNF-α eine LPS Konzentration von 0,2ng/ml (s. Abb. 18).

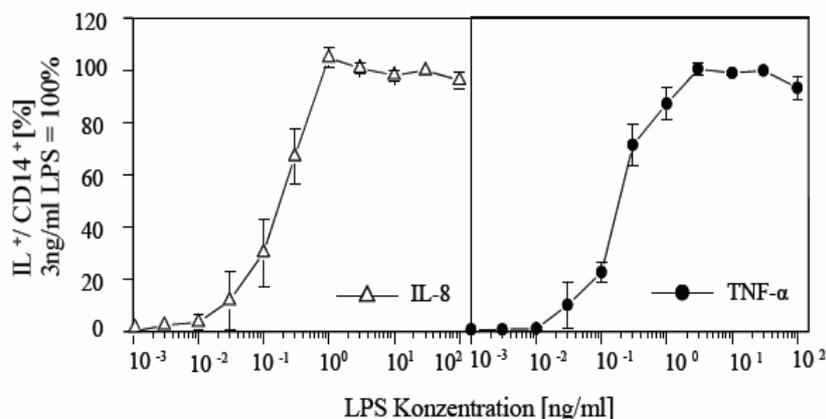


Abb. 20 zeigt die IL-8 und TNF-α Expression in Abhängigkeit von der LPS Konzentration. Für die ED₅₀ ergibt sich eine LPS Konzentration von 0,2ng/ml (entnommen aus der Doktorarbeit von Phillip Röntgen, 2005)

In klinischen Modellen konnte gezeigt werden, dass die LPS Konzentration in Sepsispatienten bei 1ng/ml liegt (Van Deventer. 1998; Shenep 1988). Die verwendeten Konzentrationen von Murphy & Newsholme (15µg/ml), sowie Yaqoob & Calder (10 µg/ml), scheinen demnach vergleichsweise hoch und könnten auch ein Grund für die widersprüchlichen Ergebnisse zur vorliegenden Arbeit sein.

Desweiteren konnte in Studienmodellen gezeigt werden, dass Glutamin die IL-6 Produktion von LPS-stimulierten Makrophagen erhöht (Yassad et al. 1997; Wells et al. 1999], sowie dass die IL-2 Produktion von Con A aktivierten T-Lymphozyten signifikant durch Glutamin vermehrt wird (Kew & Wells 1999).

Andere Studienmodelle stehen im Einklang mit den Ergebnissen dieser Arbeit und zeigen eine durch Glutamin bedingte signifikante Reduktion proinflammatorischer Zytokine unter septischen Zuständen. Wischmeyer & Riehm (2003) veranschaulichten an einem *in vivo* Sepsis Modell an Ratten, dass Glutamin die TNF- α Expression von PBMCs signifikant verringert und die Endotoxin-induzierten Organschädigungen, sowie die Mortalität reduziert. Glutamin senkte die TNF- α Expression in den untersuchten Konzentrationen von 4mM und höher; die Inkubationszeiten betragen 4 h und 24h nach LPS Stimulation.

Klinische Studienmodelle mit enteraler oder parenteraler Glutaminsubstitution demonstrieren ebenfalls eine Reduktion proinflammatorischer Zytokine in Stresszuständen. Andrew & De Beaux (1999), sowie O’Riordain et al (1996) konnten zeigen, dass Glutamin bei Patienten mit akuter schwerer Pankreatitis signifikant die IL-8 Konzentration im Blutplasma reduziert. Allerdings konnte in keiner der beiden Studien eine signifikante Veränderung der IL-6 und TNF- α Expression nachgewiesen werden.

Auch bei post-operativen Patienten - nach schwerwiegenden abdominellen Eingriffen – konnten Slotwinski & Slodkowski (2002) signifikant verminderte IL-6 und IL-8 Spiegel durch Glutaminsubstitution nachweisen. Die IL-6 Konzentration war zwar auch in der Glutamingruppe im Vergleich zu prä-operativem Wert deutlich erhöht, allerdings waren die IL-6 Spiegel in der Kontrollgruppe deutlich höher als in der Glutamingruppe. Die post-operative IL-8 Konzentration war in der Glutamingruppe im Vergleich zu prä-operativen Werten nicht wesentlich erhöht, während es in der Kontrollgruppe zu einem signifikanten Anstieg in der post-operativen IL-8 Expression kam.

Weitere Studienmodelle untersuchen den Einfluss von Glutamin gezielt auf die Zellen des Intestinaltraktes. Der Intestinaltrakt nimmt in der Pathogenese der Sepsis eine besondere Stellung ein. Es wird vermutet, dass es in Stresssituationen zu einer Minderdurchblutung des Darmes und damit zu einer Darmwandischämie kommt. Die daraus resultierende Hyperpermeabilität begünstigt eine Translokation von Bakterien und/oder Endotoxin aus dem Darm in den Blutkreislauf. Dieses Phänomen wird oft für die systemische Entzündungsreaktion verantwortlich gemacht (Hall et al.

1997). Blutkulturen sind hierbei in der Regel negativ (Stoutenbeck et al. 1996). Durch Hemmung der intestinalen Inflammation und Permeabilität wäre auch die Möglichkeit der Entstehung einer Sepsis im Gesamtorganismus vermindert.

Kellym C. Liboni & Nan Li et al (2005) untersuchten - im *in vitro* Sepsis - Modell den Einfluss von Glutamin auf die IL-8 Produktion von Caco 2 Zellen. Caco 2 Zellen sind humane Zellen, entnommen aus Kolorektalen-Adenokarzinomen, welche die gleichen Charakteristika enthalten wie intestinale Zellen, z.B. Enterozyten oder Schleimzellen. Caco 2 Zellen werden in *in vitro* Studienmodellen eingesetzt, um Funktion und Differenzierung von intestinalen Zellen zu untersuchen. Liboni & Li konnten zeigen, dass Glutamin die IL-8 Expression von Caco 2 Zellen unter LPS Gabe signifikant verringert. Die Wirkung des Glutamins ist laut den Autoren auf eine Reduzierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B zurückzuführen. NF- κ B ist für die Transkription von pro-inflammatorischen Zytokinen mit verantwortlich (s. Einleitung).

Asosa & Mochizuki (1999) untersuchten den Einfluss von Glutamin auf mesenterische mononukleäre Zellen (MNC) von Patienten mit kolorektalen Karzinomen. Dabei konnten sie eine signifikante TNF- α Senkung bei den Patienten nachweisen, die vorher enteral Glutamin zu sich genommen hatten. Ameho & Adjei (1997) konnten in einem *in vivo* Modell an Ratten demonstrieren, dass Glutamin die IL-8 und TNF- α Expression während einer induzierten Kolitis signifikant senkt.

5.3.1 Klinische und therapeutische Relevanz von Glutamin

Unter Normalbedingungen wird im Organismus genügend Glutamin synthetisiert, um den zellulären Verbrauch zu decken. Hauptproduzenten sind die Lunge (Souba et al. 1990), das Gehirn und vor allem der Skelettmuskel (Newsholme 2001). In Stresssituationen wird vermehrt Glutamin freigesetzt, um den hohen zellulären Verbrauch im Organismus zu decken. Vinnars & Bergström (1975) veranschaulichten, dass nach unkomplizierten abdominalen Eingriffen die Gln-Konzentration im Muskel um ungefähr 40% sinkt. Der Verlust steigt, wenn der Eingriff mit Komplikationen verbunden ist; bei multimorbiden Patienten kann die Muskel-Gln-Konzentration sogar auf 10-20% des Ausgangswertes abfallen, was mit einer sehr hohen Mortalitätsrate verbunden ist (Roth & Funovics, 1982).

Den höchsten Glutaminverbrauch im Körper haben die Zellen des Intestinaltraktes, das Immunsystem, Leber und Niere (Labow & Souba 2000). In Stresssituationen übersteigt der zelluläre Verbrauch von Glutamin die Syntheseleistung der Glutamin-produzierenden Organe. In diesem Falle wird Glutamin zu einer „bedingt essentiellen Aminosäure“. Der Glutaminmangel kann nur durch extern zugeführtes Glutamin behoben werden (Andrews & Griffiths 2000).

Klinische Studien zeigen einen therapeutischen Vorteil von glutaminhaltiger Ernährung in Stresssituationen. Houdijk A.J. et al. (1998) zeigten bei Polytrauma-Patienten (Anzahl=72), dass Glutamin die Inzidenz von Pneumonien, Sepsis und Bakteriämien nachhaltig reduziert. Griffiths et al.

(1997) untersuchte die Wirkung von Glutamin an 84 Intensivpatienten, welche einen APACHE II score von 11 oder mehr aufwiesen. Durch Glutamin konnte die Morbidität und Mortalität gesenkt werden, die 6 Monate-Überlebenszeit wurde verbessert, die Aufenthaltsdauer im Krankenhaus wurde durch Glutamin gesenkt und die Krankenhauskosten dadurch reduziert. Mit Glutamin angereicherte parenterale Ernährung verringerte signifikant den Krankenhausaufenthalt bei Patienten mit Knochenmarktransplantation; die Zahl der CD4+ und CD8+ T-Lymphozyten bei diesen Patienten konnte unter Glutamin erhöht werden (Ziegler et al. 1992). Die Stickstoffbilanz in Stresssituationen wurde durch Glutamin signifikant verbessert (Ziegler et al. 1992, McBurney et al., 1994), dem Verlust von Glutamin und dem Abfall der Proteinsynthese im Skelettmuskel konnte durch Glutaminsubstitution entgegengewirkt werden (Hammarqvist et al. 1989).

Die Wirkmechanismen sind zum einen durch einen gesteigerten Zellschutz unter Glutamingabe zu erklären. Glutamin spielt unter anderem eine wesentliche Rolle in der Produktion des zellulären Antioxidant Glutathion (Wernermann, 1999). Niedrige intramuskuläre Glutathion Spiegel korrelieren mit niedrigen Glutaminkonzentrationen (Hammarqvist et al., 1997). Im *in-vitro* Hyperthermie Modell konnte Glutamin die hitze-induzierte Apoptose in Monozytenkulturen verhindern (Pollheimer et al., (2005). Dies war auf eine durch Glutamin induzierte vermehrte Produktion von Hitze-Schock Proteinen zurück zu führen. Wischmeyer et al. (2003) konnten in PBMCs nach LPS Stimulation ebenfalls eine gesteigerte Expression von zytoprotektiven Hitze-Schock Proteinen durch Glutaminsubstitution nachweisen.

Ein weiterer Wirkmechanismus des Glutamins beruht auf einer Immunmodulation und Verbesserung der Immunfunktion. Glutamin verbessert in *in vitro* Studien die Phagozytosefähigkeit von Makrophagen (Wallace & Keast 1992) und Monozyten (Spittler et al. 1995). In klinischen Studien konnte demonstriert werden, dass Glutamin die HLA-DR Expression bei postoperativen Patienten (Spittler et al. 2001), sowie bei Trauma Patienten (Boelens et al. 2002) signifikant gegenüber der Kontrollgruppe erhöht, was für eine Verbesserung der Immunfunktion spricht.

Der Einfluss des Glutamins auf die Zytokinexpression von Immunozyten und anderen Zytokinproduzierenden Zellen wurde in den vorherigen Kapiteln besprochen. Übereinstimmend sind die Resultate, die den Effekt des Glutamins auf die Zytokinexpression im Blutplasma während Stresszuständen, sowie die Wirkung des Glutamins auf Zellen des Intestinaltraktes untersucht haben. Hier zeigt sich eine Senkung der Expression von proinflammatorischen Zytokinen. Widersprüchlich sind die Arbeiten, welche die Wirkung von Glutamin auf Immunozyten untersucht haben. Vor allem in Makrophagen und Lymphozyten scheint Glutamin die Produktion proinflammatorischer Zytokine zu erhöhen. In Monozyten zeigen sich unterschiedliche Ergebnisse.

Die Aussagekraft der Arbeiten, die sich auf die Zytokinproduktion von Immunozyten fixieren, ist allerdings eingeschränkt, da es sich meistens um *in vitro* Studien handelt, welche nur bedingt auf das Geschehen *in vivo* anzuwenden sind. Durch *in vitro* Studien werden künstliche Bedingungen

geschaffen, welche die Wechselwirkungen der zu untersuchenden Zellen mit den restlichen Komponenten des Organismus - wie z.B. Endothelien, Minderperfusion und Hormonausschüttung endokriner Gewebe – außer Acht lassen. Auch das *in vitro* durch LPS induzierte Sepsis Modell ist nur bedingt auf eine Sepsis im klinischem Sinne übertragbar. Ertel & Kremer (1995) untersuchten *ex vivo* das Blut von septischen Patienten auf die Zytokinexpression nach LPS Stimulation. Im Vergleich zu Vollblutproben von gesunden Probanden, war die TNF- α und IL-6 Expression in den Blutproben der septischen Patienten signifikant reduziert, was auf eine Funktionseinschränkung der Immunozyten schließen lässt. Auch wenn die Überexpression pro-inflammatorischer Zytokine in der Sepsis tödlich für den Patienten sein kann (SIRS), ist eine Funktionseinschränkung von zytokinproduzierenden Zellen genauso prognostisch ungünstig. Eine Immunsuppression verhindert eine adäquate Bekämpfung von infektiösen Erregern und resultiert ebenfalls in einem schlechtem Outcome (CARs).

Trotz der uneinheitlichen Ergebnisse aus *in vitro* Arbeiten über Glutamin und seine Wirkung auf die Zytokinproduktion in Immunozyten, konnte in klinischen Studien nachgewiesen werden, dass Glutamin immunmodulatorisch wirkt. In Sepsis und in anderen Stresssituationen kann Glutamin durch Zytokinreduktion in der Blutbahn eine generalisierte Entzündungsreaktion (SIRS) im Gesamtorganismus verhindern (Wischmeyer & Riehm 2003; Andrew & De Beaux 1999; O’Riordain et al. 1996; Slotwinski & Slodkowski 2002).

Andererseits wirkt Glutamin einer Immunsuppression entgegen, indem es die Phagozytosefähigkeit von Makrophagen (Wallace & Keast 1992) und Monozyten (Spittler et al. 1995) verbessert und die HLA-DR Expression in Monozyten während Stresssituationen erhöht (Spittler et al. 2001, Boelens et al. 2002).

Um die genaue Funktion von Glutamin und seiner Wirkung auf die Zytokinexpression in Monozyten zu erkunden, werden jedoch noch weitere Studien nötig sein.

5.4 Einfluss von Alanin auf die Zytokinexpression

Die physiologische Alanin-Plasmakonzentration beträgt 0,4mM. Alanin ist nach Glutamin die am zweit häufigsten vorkommende freie Aminosäure (Mackenzie et al., 1992) Im Gegensatz zum Glutamin ist der Effekt von Alanin als Einzelsubstanz auf die Zytokinexpression von Immunozyten und andere Zellen des Körpers bis heute nicht untersucht worden. Alanin ist die wichtigste glykogene Aminosäure im Organismus und spielt eine wesentliche Rolle im Kohlenhydratstoffwechsel (Levin et al. 1983). Hauptverwertungsort ist die Leber, wo Alanin zu Glukose verstoffwechselt wird, welche dann wieder dem Körper als Energielieferant zur Verfügung steht. In Stresssituationen ist der Alaninfluss zur Leber deutlich vermehrt, um eine ausreichende Glukoneogenese sicher zu stellen. Ein erhöhter Verbrauch des Alanins durch Zellen des Immunsystems konnte bis heute nicht festgestellt

werden. Auch gibt es keine Arbeiten, die über eine Korrelation zwischen Alaninspiegel und Zytokinproduktion berichten.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass Alanin in vitro unter LPS-Gabe zu einem signifikanten Anstieg der IL-6 Expression und zu einer signifikanten Reduzierung der TNF- α Produktion führt. Bezogen auf das Sepsismodell sind die Resultate im klinischen Sinne schwer zu deuten. Eine Reduzierung des TNF-alpha während eines SIRS wäre therapeutisch wünschenswert, während eine Erhöhung der IL-6 Produktion insbesondere in der hyperinflammatorischen Phase der Sepsis vermieden werden sollte.

5.4.1 Klinische und therapeutische Relevanz von Alanin

In der Intensivmedizin und in der Immuntherapie spielt Alanin eine untergeordnete Rolle. Es gibt bis heute keine Studien, die eine therapeutische Wirkung von Alanin während einer Sepsis belegen. Auch wenn Alanin eine unentbehrliche Rolle im Intermediärstoffwechsel spielt scheint der Nutzen einer Alanintherapie während einer Sepsis eher fraglich. Folgende Beobachtungen tragen dazu bei, dass Alanin wohl auch in Zukunft eher einen untergeordneten Stellenwert in der Sepsis- und Immuntherapie beibehalten wird:

1) Der physiologische Alanin Plasmaspiegel beträgt 0,4mmol, die durchschnittliche Alanin Konzentration im Skelettmuskel beläuft sich auf ca. 3mmol/kg (Hammerqvist et al., 1990).

Hammerqvist F. und Wernerman J. (1990), sowie Exner (2003) konnten zeigen, dass in Stresssituationen der Alaningehalt weder im Plasma noch im Muskel abfällt, was einen erhöhten zellulären Verbrauch dieser Aminosäure unwahrscheinlich macht. Anders als Glutamin, wird Alanin demnach nicht zu einer „bedingt essentiellen Aminosäure“. Der Alanin Verbrauch kann demnach durch den eigenen Organismus gedeckt werden. Eine externe Alanin Zufuhr scheint nicht von besonderer Notwendigkeit zu sein.

2) Desweiteren wurde Alanin in vielen klinischen Studien, die den Effekt des Dipeptamins Alanin-Glutamin bei Intensivpatienten untersuchten, auch in der Kontrollgruppe verwendet. Das Dipeptamin konnte in verschiedenen klinischen Situationen das Outcome der untersuchten Patienten gegenüber der Kontrollgruppe verbessern (Stehle et al. 1989; Jacobi et al. 1999; Houdijk et al. 1998). Da Alanin auch den Patienten der Kontrollgruppe zugeführt wurde, wird offensichtlich, dass Alanin als Einzelsubstanz nur eine untergeordnete therapeutische Rolle spielen kann.

3) Anstatt mit Alanin, kann Glutamin auch mit Glycin als Dipeptid kombiniert werden, um es dann parenteral zu infundieren. Lange Zeit wurden die beiden Dipeptaminlösungen Ala-Gln und Gly-Gln äquivalent behandelt, das Outcome der untersuchten Patientengruppen schien nicht wesentlich zu variieren (Jacobi et al., 1999 vs. De Beaux et al., 1998; Decker-Baumann et al.1999, vs. Tremel et al., 1994). Erst kürzlich wurden erstmals die beiden Dipeptaminlösungen in einem von Exner et al. (2003) durchgeführtem klinischem Studienmodell an 45 Patienten gegenübergestellt. In dieser Studie wirkte

die Kombination Glycin-Glutamin im Gegensatz zu Alanin-Glutamin der post-operativen Immunsuppression schneller entgegen. Auch wenn die Wirkung des Glycins in Kombination mit Glutamin noch nicht gänzlich bekannt ist, – es wird eine verbesserte Glutaminaufnahme in die Zellen bei gleichzeitiger Glycingabe vermutet (Vincent et al. 1992) - schließen Exner et al. aus ihren Ergebnissen, dass Patienten in Stresssituationen möglicherweise von dem Dipeptid Gly-Gln mehr profitieren können als von Ala-Gln. Demzufolge kann Alanin auch nicht in Wechselwirkung mit Glutamin einen positiven, therapeutischen Effekt entfalten, und spielt in Form der Dipeptaminlösung nur die Rolle als Trägersubstanz.

5.5 Einfluß von Dipeptamin auf die Zytokinexpression

Die vorliegende Arbeit zeigt eine signifikante TNF- α Reduktion durch Dipeptamin in LPS stimulierten Monozyten. Die IL-6 und IL-8 Expression konnte hingegen nicht signifikant verändert werden. Das Dipeptamin Alanyl-Glutamin wird im klinischen Alltag parenteral den Patienten zugeführt. Auf diese Weise halten sich beide Aminosäuren stabil in wässriger Lösung und können dem Patienten sicher infundiert werden. Die Arbeiten die sich mit Dipeptamin und dessen Einfluss auf die Zytokinexpression befassen, basieren meist auf klinischen Studienmodellen. Dabei zeigen sich immunmodulatorische Effekte des Dipeptamins.

Jacobi & Ordermann (1999) untersuchten Patienten, welche an der Speiseröhre oder am Magen operiert wurden und anschließend fünf Tage lang parenteral mit Alanyl-Glutamin vs. ohne Alanyl-Glutamin ernährt wurden. Der postoperative Verlauf von Entzündungsmarkern wurde verglichen. Am ersten postoperativen Tag zeigt sich in beiden Gruppen ein signifikanter Anstieg des IL-6 im Plasma gegenüber präoperativen Werten. Die IL-6 Plasmaspiegel waren im weiteren Verlauf bei Patienten mit Alanyl-Glutaminsubstitution ab dem 4. postoperativen Tag signifikant niedriger als bei Patienten ohne zusätzliche Alanyl-Glutamingabe.

Lin & Saito (2001) demonstrierten in ihrem in vitro Ratten Modell ebenfalls eine immunmodulatorische Wirkung des Dipeptamins. Nachdem die Ratten sieben Tage parenteral – mit oder ohne Alanyl-Glutamin – ernährt wurden, induzierten Lin & Saito eine bakterielle Peritonitis durch E.coli Injektion. Die Ratten, die vorher Dipeptamin infundiert bekommen hatten, zeigten einen verminderten IL-8 Blutplasmaspiegel und eine erhöhte TNF- α Konzentration im peritonealen Exsudat, sowie in der Leber. Lin & Saito schließen aus ihren Ergebnissen, dass Alanyl-Glutamin die Immunantwort am Ort der Entzündung verstärkt, während das generalisierte Entzündungsgeschehen gemildert werden kann.

5.5.1 Klinische Relevanz von dem Dipeptid Alanyl-Glutamin

Mehrere klinische Studien demonstrieren ein verbessertes Outcome durch Alanyl-Glutamin während Stresssituationen. Hammarqvist et al. (1990) untersuchten Patienten nach abdominalen Eingriffen und zeigten eine verbesserte Stickstoffbilanz, sowie eine vermehrte Proteinsynthese im Skelettmuskel in Patienten die Alanyl-Glutamin infundiert bekamen im Gegensatz zur Kontrollgruppe. Desweiteren konnte veranschaulicht werden, dass Alanyl-Glutamin die Darmintegrität bewahrt (Tremel et al., 1994; Decker-Baumann et al. 1999), die post-operative Immunsuppression schneller kompensiert (Jacobi et al. 1999) und den Krankenhausaufenthalt verkürzt (Morlion et al. 1998 ; Griffiths et al. 1997).

Allerdings wird aus dem vorher geschriebenen ersichtlich, dass der Großteil der positiven Wirkung des Dipeptamins alleine dem Glutamin zuzuschreiben ist. Kozar & Schultz (2004) untersuchten Alanin und Glutamin getrennt auf die Wirkung im Magen-Darmtrakt nach Ischämie und Reperfusion. Sie konnten demonstrieren, dass zwar Glutamin, nicht aber Alanin die Barrierefunktion des Intestinaltraktes bewahrt.

Exner & Tamandl (2003) zeigten sogar, dass Patienten in Stresszuständen eher von einer Glycin-Glutamin als einer Alanyl-Glutamin Substitution profitieren könnten (s. Kapitel „klinische und therapeutische Relevanz von Alanin“).

Es werden noch weitere Studien nötig sein, welche die kombinierten Dipeptide Ala-Gln und Gly-Gln auf ihre eventuellen Unterschiede hin untersuchen, um so den größten möglichen Nutzen für den Patienten zu gewinnen.

6. Zusammenfassung

LPS induziert in einem *in vitro* Vollblut-Modell die Synthese von proinflammatorischen Zytokinen und täuscht somit das Bild einer Sepsis vor. Untersucht wurde der Einfluß von Glutamin, Alanin und Dipeptamin auf die IL-6, IL-8 und TNF- α Expression der durch LPS stimulierten Monozyten.

Glutamin reduziert signifikant die IL-6 und TNF- α Produktion, die IL-8 wird tendenziell – jedoch nicht signifikant – gesenkt. Alanin verringert ebenfalls die TNF- α Expression, erhöht hingegen die IL-6 Produktion signifikant, während die IL-8 Expression unverändert bleibt. Die Effekte der Einzellösungen Glutamin und Alanin scheinen sich in der Dipeptaminlösung (Ala-Gln) zu addieren. Hier wird nur die TNF- α Synthese signifikant reduziert, die IL-6 und IL-8 Produktion bleiben durch die Dipeptamingabe unbeeinflusst. Es wurde kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Verwendung verschiedener Konzentrationen (Ala & Gln: 2mM & 5mM; Dipeptamin: 1mM, 2mM & 5mM) festgestellt.

Klinische Relevanz könnte vor allem das Glutamin haben, da es unter LPS Gabe die Synthese der proinflammatorischen Zytokine IL-6 und TNF- α reduziert, was im Falle einer klinischen Sepsis von Nutzen sein kann. Klinische Studien unterlegen die positive Wirkung des Glutamins; es konnte ein Rückgang der Morbidität und Mortalität bei Intensivpatienten unter Glutamingabe nachgewiesen werden.

Die Wirkung des Alanins im klinischen Alltag und dessen Nutzen im Rahmen einer Sepsistherapie sind bis heute nicht untersucht worden. Es gibt jedoch Hinweise, dass eine zusätzliche Alaningabe keine Bedeutung für die Homöostase bei Sepsispatienten hat. Auch in Kombination mit Glutamin scheint Alanin keine therapeutischen Vorteile zu besitzen, einige Autoren gehen sogar davon aus, dass die Kombination Glycin-Glutamin nützlicher sein könnte als das Dipeptamin (Alanin-Glutamin).

Ebenfalls konnte in der vorliegenden Arbeit nachgewiesen werden, dass Glutamin, Alanin und Dipeptamin *in vitro* die IL-8 Synthese der Monozyten unter nicht septischen Bedingungen, d.h. ohne LPS Gabe, signifikant erhöhen. In Bezug auf das Glutamins, konnte auch schon in anderen experimentellen Studien gezeigt werden, dass Glutamin die Zytokinproduktion erhöht, bzw. dass für eine adäquate Zytokinproduktion ein Minimum an Glutamin vorhanden sein muss. Unter klinischen Gesichtspunkten konnte bis heute jedoch keine Zytokinerhöhung durch Glutamingabe - unter nicht septischen Umständen - festgestellt werden. Alanin und Dipeptamin werden in dieser Hinsicht in der heutigen Literatur kaum erwähnt. Über klinische und therapeutische Relevanz kann daher nur spekuliert werden.

7. Literaturverzeichnis

Abraham E. Alterations in transcription regulation of proinflammatory and immunoregulatory cytokine expression by hemorrhage, injury and critical illness. *New Horizons* 1996; 184-193

ACCP/SCCM American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Crit Care Med* 1992; 20(6): 864-874

Adrawi MSM. Glutamine and glucose metabolism in human peripheral lymphocytes. *Metabolism* 1988; 37: 99-103

Alan L, Miller ND. Therapeutic Considerations of L-Glutamine: A Review of Literature. *Altern Med Rev.* 1999 Aug;4(4):239-48

Ameho CK, Adjei AA, Harrison EK et al. Prophylactic effect of dietary glutamine supplementation on interleukin 8 and tumour necrosis factor alpha production in trinitrobenzene sulphonic acid induced colitis. *Gut* 1997. 41; 487-93

Anderson O. Alanine: Why you might expect to work out harder for longer with the help of the amino acid alanine. <http://www.pponline.co.uk/encyc/alanine.html>

Andrew C., de Beaux FRCS, Michael G et al. Glutamine-supplemented total parenteral Nutrition reduces Blood mononuclear Cell Interleukin-8 release in severe acute pancreatitis. *Nutrition* 1998; 14: 261-265

Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, et al. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med.* 2001;29:1303-1310

Asosa S, Mochizuki H, Yamamoto T et al. A clinical study of the effectiveness of oral glutamine supplementation during total parenteral nutrition : influence on mesenteric mononuclear cells. *J Parenter Enteral Nutr.* 1999; 23: 41-44

Bauer M, Rensing H, Ziegenfuß T. Anästhesie und perioperative Immundefunktion. *Anaesthsist* 1998; 47: 538-556

BD Biosciences, Introduction to Flow Cytometry: A learning guide, Manual Part Number 11-11032-01, April 2000,

Beutler B, Cerami A. The biology of cachectin/ TNF-alpha primarily mediator of the host response. *Ann Rev Immunol* 1989; 7: 625-655

Bihari DJ. Prevention of multiple organ failure in the critically ill. In: Vincent JL (ed) *ew York Tokyo* 1987: 26-39

Bloos F. Was ist Sepsis: Info für medizinisches Personal. Internetseite der Deutschen Gesellschaft für Sepsis, 2003

Boelens P.G., Houdijk A.P., Fonk J.C. et al. Glutamine-Enriched Enteral Nutrition Increases HLA-DR Expression on Monocytes of Trauma Patients. *J Nutr.* 2002; 132: 2580-6

Bone RC, Sibbald WJ, Sprung CL. The ACCP-SCCM consensus conference on sepsis and organ failure. *Chest*. 1992 Jun;101(6):1481-3

Bone RC. Immunologic dissonance: a continuing evolution in our understanding of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS) and the multiple organ dysfunction syndrome (MODS). *Ann Intern Med*. 1996 Oct 15;125(8):680-7

Bone RC, Grodzin CJ, Balk RA. Sepsis: A new hypothesis for pathogenesis of the disease process. *Chest* 1997; 112: 235-143

Brand et al. Metabolism of glutamine in lymphocytes. *Metabolism* 1989; 38: 29-33

Brandtzaeg P, Osnes L, Ovstebo R. Net inflammatory capacity of human septic shock plasma evaluated by a monocyte-based target cell assay: identification of interleukin-10 as a major functional deactivator of human monocytes. *J Exp Med* 1996; 184: 51-60

Brian I. Labow, M.D., Wiley W. Souba., Sc.D. Glutamine. *World J. Surgery* 2000; 24: 1503-1513

Brun-Buisson et al. Prospective survey, 28-day mortality. *JAMA* 1995; 274: 968

Bundschuh, Schneeweiss, Bräuer. *Lexikon der Immunologie*. München: Medical Service 1992; ISBN: 3-926506-08-3

Calder PC. Glutamine and the immune system. *Clin Nutr* 1994; 13: 2-8

Calder PC. Fuel utilisation by cells of the immune system. *Proc Nutr Soc* 1995; 54: 65-82

Calder PC, Yaqoob P. Glutamine and the immune system; Review Article. *Amino Acids* 1999; 17: 227-241

Casey C. Role of Cytokines in the Pathogenesis of Cardiopulmonary-induced Multisystem Organ Failure. *Ann Thorac Surg* 1993; 56: 92-96

Cavaillon JM. Cytokines and macrophages. *Biomed Pharmacother*. 1994;48(10):445-53.

Cavaillon JM, Adib-Conquy M, Cloez-Tayarani I, Fitting C. Immunodepression in sepsis and SIRS assessed by *ex vivo* cytokine production is not a generalized phenomenon: a review. *J Endotoxin Res* 2001; 7: 85-93.

Cavaillon JM, Adib-Conquy M, Fitting C et al. Cytokine cascade in sepsis. *Scand J Infect Dis*. 2003;35(9):535-44

Christensen, N. H. Role of amino acid transport and countertransport in nutrition and Metabolism. *Physiol. Rev*. 1990; 70: 43-77

Coeffier M, Marion R, Leplingard A. et al. Glutamine decreases interleukin-8 and interleukin-6 but not nitric oxide and prostaglandins e(2) production by human gut in-vitro. *Cytokine* 2002 Apr 21;18(2):92-7.

Crawford J, Cohen HJ. The essential role of glutamine in lymphocyte proliferation in vitro. *J Cell Physiol* 1985; 275-282

Cremer J, Martin M et al. Systemic inflammatory Response Syndrome after cardiac operations. *Ann Thorac Surf* 1996; 61: 1714-1720

Curi et al. Glutamine utilization by rat neutrophils: presence of phosphate-dependent glutaminase. *Am J Physiol* 1997; 42: C1124-C1129

De Beaux A.C., O'Riordain M.G., Ross J. A. et al. Glutamine-supplemented total parenteral nutrition reduces blood mononuclear cell interleukin-8 release in severe acute pancreatitis. *Nutrition* 1998; 14: 261-265

De Groof, F., Joosten, K. F. M., Janssen, J. A. M. J. L. et al. Acute stress response in children with meningococcal sepsis: important differences in the growth hormone/insulin-like growth factor I axis between nonsurvivors and survivors. *J. Clin. Endocr. Metab.* 2002; 87: 3118-3124

Decker-Baumann C., Buhl K., Frohmuller S. et al. Reduction of chemotherapy induced side-effects by parenteral glutamine supplementation in patients with metastatic colorectal cancer. *Eur J. Cancer* 1999; 35: 202-207

DeForge LE, Kenney JS et al. Biphasic production of IL-8 in lipopolysaccharide (LPS)- stimulated human whole blood. Separation of LPS- and cytokine-stimulated components using anti-tumor necrosis factor and anti- IL 1 antibodies. *J Immunol* 1992; 148: 2133-41

Deutz NEP, Heenemann S., van Eijk HMH, Dejong CHC et al. Selective uptake of glutamine in the gastrointestinal tract. *Br J Surg* 1992; 79: 280

Endo S, Inada K, Ceska M et al. Plasma interleukin 8 and polymorphonuclear leukocyte elastase concentrations in patients with septic shock. *E Inflamm* 1995; 45: 136-42

Exner. Perioperative Gly-Gln Infusion Diminishes the Surgery-Induced Period of Immunosuppression : Accelerated Restoration of the LPS-stimulated Tumor Necrosis Factor-Alpha Response. *Ann Surg* 2003; 137: 110-115

Fong Y, Tracey KJ, Moldawer et al. Antibodies to cachectin/tumor necrosis factor reduce interleukin 1 beta and interleukin 6 appearance during lethal bacteremia. *J Exp Med* 1989; 170: 1627

Francis J. Andrews, Richard D. Griffiths. Glutamine: essential for immune nutrition in the critically ill. *British Journal of Nutrition* 2002; 87: S3-S8

Friedland J, Suputtamongkol et al. Prolonged elevation of interleukin-8 and interleukin-6 concentrations in plasma and of leukocyte interleukin-8 mRNA levels during septicemic and localized *Pseudomonas pseudomallei* infection. *Infect Immun* 1992; 60: 2402-8

Furukawa S, Saito H, Fukatsu K et al. Glutamine-enhanced bacterial killing by neutrophils from post-operative patients. *Nutrition* 1997; 13: 863-869

Garber AJ. Glutamine metabolism in skeletal muscle. In: Mora J, Palacios R (eds). *Glutamine: metabolism, enzymology and regulation*. Academic Press, New York, 1980; pp 259-284

Gerard C, Bruyns C et al. Interleukin-10 reduces the release of tumor necrosis factor and prevents lethality in experimental endotoxemia. *J Exp Med* 1993; 177: 547-50

Germain RN. MHC-associated antigen processing, presentation and recognition: adolescence, maturity and beyond. *Immunologist* 1995; 3: 185-190

Giannoudis PV, Smith RM, Windsor AC et al. Monocyte Human Leucocyte antigen- DR expression correlates with intrapulmonary shunting after major Trauma. *American Journal of Surgery* 1999; 177, 455-459

- Gogos CA, Drosou E, Bassaris HP, Skoutelis A. Pro- versus antiinflammatory cytokine profile in patients with severe sepsis: a marker for prognosis and future therapeutic options. *J Infect Dis* 2000; 181: 176-180
- Goris RJA, Boekhorst TP et al. Multiple organ failure. Generalized autodestructive inflammation? *Arch Surg* 1985; 120: 1109-1115
- Griffiths R.D., Jones C., Palmer T.E. et al. Six-month outcome of critically ill patients given glutamine-supplemented parenteral nutrition. *Nutrition* 1997; 13: 295-302
- Griffiths RD. Glutamine: establishing clinical indications. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 1999; 2: 177-182
- Hack C, Hart M, Strack van Schijndel et al. Interleukin-8 in sepsis: relation to shock and inflammatory mediators. *Infect Immun* 1992; 60: 2835-42
- Hall RI, Smith MS et al. The systemic inflammatory response to cardiopulmonary bypass: Pathophysiological, therapeutic, and pharmacological considerations. *Anesth Analg* 1997; 85: 66-86
- Hammarqvist F, Wernerman J. Clinical experiences with glutamine supplementation. *Nutrition* 1994; 10: 176-177
- Hammarqvist F, Wernermann J et al. 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* 1989; 209: 455-461
- Hammarqvist F., M.D., Ph.D., Wernerman J., M.D. Ph.D., Alanyl-glutamine Counteracts the Depletion of Free Glutamine and the Postoperative Decline in Protein Syntheses in Skeletal Muscle. *Ann. Surgery* 1990; 212:637-644
- Harken AH, Lillo RS, Hufnagel HV. Direct influence of endotoxin on cellular respiration. *Surg Gynecol Obstet* 1975; 140: 858-860
- Haussinger D. Glutamine metabolism in the liver: overview and current concepts. *Metabolism* 1989; 38: 14-17
- Healthnotes. Alanine. <http://www.evitamins.com/healthnotes/healthnotes.asp?ContentID=2798009>. Copyright ©2004
- Heinrich PC, Castell JV, Andus T. Interleukin-6 and the acute phase response. *Biochem J* 1990; 265: 621-636
- Helle M, Brakenjoff JPJ, De Groot ER, Aarden LA. Interleukin 6 is involved in interleukin-1- induced activities. 1988, *Eur J Immunol* 18: 957-959
- Hershmann MJ, Cheadle WG, Wellhausen SR et al. Monocyte HLA-DR antigen expression characterises clinical outcome in the trauma patient. *British Journal of Surgery* 1990; 77: 204-207
- Houdijk A, Rijnsburger E, Jansen J et al. Randomised trial of glutamine-enriched enteral nutrition on infectious morbidity in patients with multiple trauma. *The Lancet* 1998; 352: 1-5
- Jacobi Ah. A, Ordermann J., Zuckermann H. et al. Einfluß von Alanyl-Glutamin bei der postoperativen totalen parenteralen Ernährung auf die Morbidität unter besonderer Berücksichtigung der Immundefunktion. *Zentralbl Chir* (1999); 124: 199-205

Jean-Marc Cavaillon, Minou Adib-Conquy et al. Cytokine Cascade in Sepsis. *Scand J Infect Dis* 2003 ; 35 : 535-544

Khabar KS, elBarbary MA, Khoqueer F et al. Circulating endotoxin and cytokines after cardiopulmonary bypass: differential correlation with duration of bypass and systemic inflammatory response/multiple organ dysfunction syndromes. *Clin Immunol Immunopathol.* 1997 Oct;85(1):97-103

Korach-André M, Burelle Y, Péronnet F et al. Differential metabolic fate of the carbon skeleton and amino-N of [¹³C]alanine and [¹⁵N]alanine ingested during prolonged exercise *J Appl Physiol* 93: 499-504, 2002

Karner J., Roth E. Alanyl-Glutamine Infusions to Patients with Acute Pancreatitis. *Clinical Nutrition*

Kellym C. Liboni, Nan Li, Philip O. Scumpia et al. Glutamine Modulates LPS-Induced IL-8 Production through I κ B/NF- κ B in Human Fetal and Adult Intestinal Epithelium. *J Nutr* 2005; 135:245-251

Kew S, Wells S.M, Yaqoob P et al. Dietary Glutamine enhances murine T-Lymphocyte Responsiveness. *Journal of Nutrition* 1999; 129: 1524-1531

Kishimoto T, Hirano T. Molecular regulation of B lymphocyte respons. *Annu Rev Immunol* 1998; 6: 485-512

Kox WJ, Volk T et al. Immunomodulatory therapies in sepsis. *Intensive Care Medicine* 2000 ; 26 : 103-110

Lacey JM, Wilmore DW. Is glutamine a conditionally essential amino acid? *Nutrition Reviews* 1990; 48: 297-309

Levin L, Gevers W, Jardine L et al. Serum amino acids in weight-losing patients with cancer and tuberculosis. *Eur J Cancer Clin Oncol* 1983 ; 19 : 711-715

Lin MT, Saito H, Furukawa S et al. Alanyl-glutamine enriched total parenteral nutrition improves local systemic and remote organ responses to intraperitoneal bacterial challenge. *J Parent Enteral Nutr* 2001; 25: 346-51

Lund P. Metabolism of glutamine, glutamate and aspartate. In: Waterlow JC, Stephen JML (eds) *Nitrogen metabolism in man.* Applied Sciences, London, pp 1981; 155-167

Martich GD, Danner RL, Ceska M. Detection of interleukin 8 and tumor necrosis factor in normal humans after intravenous endotoxin: The effect of antiinflammatory agents. *J Exp Med* 1991; 173: 1021-4

McBurney M., Young L.S., Ziegler T.R. et al. A cost evaluation of glutamine-supplemented parenteral nutrition in adult bone marrow transplant patients. *J Am Diet Assoc* 1994; 94: 1263-1266

Meister A. Metabolism of glutamine. *Physiol Rev* 1956; 36: 103-127

Michie HR, Manogue KR, Spriggs DR. Detection of circulating tumor necrosis factor after endotoxin administration. *N Engl J Med* 1988; 318: 1481-6.

Miller EJ, Cohen AB et al. Elevated levels of NAP-1/interleukin-8 are present in the airspaces of patients with the adult respiratory distress syndrome and are associated with increased mortality. *Am J Respir Dis* 1992; 148: 427-32

Mira, J.-P., Cariou, A., Grall, F., et al. Association of TNF2, a TNF-alpha promoter polymorphism, with septic shock susceptibility and mortality: a multicenter study. *J.A.M.A.* 1999; 282: 561-568

Molecular Expressions. Alanine. <http://micro.magnet.fsu.edu/aminoacids/pages/alanine.html>. Last modification 04/2004

Morlion B.J., Stehle P., Wachtler P. et al., Total parenteral nutrition with glutamine dipitide after major abdominal surgery: a randomized, double-blind, controlled study. *Ann Surg* 1998; 227: 302-308

Munoz C, Carlet J, Fitting C. Dysregulation of *in vitro* cytokine production by monocytes during sepsis. *J Clin Invest* 1991; 88: 1747-54

Murphy C., Newsholme P. Macrophage-mediated lysis of a b-cell line, tumour necrosis factor- α release from bacillus Calmette-Guérin (BCG)-activated murine macrophages and interleukin-8 release from human monocytes are dependent on extracellular glutamine concentration and glutamine metabolism. *Clinical Science* 1999; 96: 89-97

Neu J., Shenoy V., Chakrabarti R., Glutamine nutrition and metabolism: Where do we go from here? *FASEB J.* 1996; 829-837

Newsholme P, Newsholme EA. Rates of utilisation of glucose, glutamine and oleate and formation of end products by mouse peritoneal macrophages in culture. *Biochem J* 1989; 261: 211-218

Newsholme P., Costa Rosa L.F.B.P., Newsholme E.A. et al. The importance of fuel metabolism for macrophage function. *Cell Biochem* 1996; 14: 1-10

Newsholme P, Curi R et al. Glutamine metabolism by lymphocytes, macrophages and neutrophils: its importance in health and disease. *J Nutr Biochem* 1999; 10: 316-324

Novak F, Heyland DK, Avenell A et al. Glutamine supplementation in critically ill adults: a meta-analysis. *Clin Nutr* 2001; 20: 54

O'Riordain MG, De Beaux A et al. Effecto of glutamine on immune funciton in the surgical patient. *Nutrition* 1996; 12: 82-84

Parry-Billings M, Evans J, Calder PC, Newsholme EA. Does glutamine contribute to immunosuppression after major burns? *Lancet* 1990; 336: 523-525

Parveen Y, Calder PC. Cytokine Production by human peripheral blood mononuclear cells : differential sensitivity to glutamine availability. *Cytokine* 1998; 10: 790-794

Peltonen E, Pulkki K, Kirvela O. Stimulatory effect of glutamine on human monocyte activation as measured by interleukin-6 and soluble interleukin-6 receptor release. *Clin Nutr* 1997; 16: 125-128

Petra G. Boelens, Robert J. Nijveldt et al. Glutamine Alimentation in Catabolic State. *Journal of Nutrition* 2000

Philip Newsholme. Why is L-Glutamine Metabolism Important to Cells of the Immune System in Health, Postinjury, Srugery or Infection? *Journal of Nutrition* 2001; 131: 2515-2522

Pollheimer J, Zellner M, Eliassen MM, Roth E et al. Increased Susceptibility of Glutamine-Depleted Monocytes to Fever-Range Hyperthermia: The Role of 70-kDa Heat Shock Protein. *Annals of Surgery* 2005; 241: 349-355.

Raffael A, C Th Nebe, G Valet. Grundlagen der Durchflußzytometrie. In: *Durchflußzytometrie in der klinischen Zelldiagnostik*, Eds: G Schmitz, G Rothe, Schattauer Verlag, Stuttgart 1994, p.3-49

Random F, Syrbe U, Meisel C. Mechanism of endotoxin desensitization: involvement of interleukin-10 and transforming growth factor. *J Exp Med* 1995; 181: 1887-92

Redl H, Schlag G, Bahrami S et al. Plasma neutrophil-activating peptide-1/interleukin-8 and neutrophil elastase in a primate bacteremia model. *J Infect Dis* 1991; 164: 383-8

Redl H, Schlag G, Ceska M et al. Interleukin-8 release in baboon septicemia is partially dependent on tumor necrosis factor. *J Infect Dis* 1993; 167: 1464-6

Rodriguez-Gaspar M, Santolaria F, Jarque-Lopez A et al. Prognostic value of cytokines in SIRS general medical patients. *Cytokine*. 2001 Aug 21;15(4):232-6.

Roitt, Ivan M. Leitfaden der Immunologie- 4. Auflage-Berlin: Blackwell-Wiss.-Verlag 1993. ISBN 3-89412-125-4

Ronco C., Inguaggiato P., D'Intini V. et al. The role of extracorporeal therapies in sepsis. *J NEPHROL* 2003;16(suppl.7): S34-S41

Roth E, Funovies J, Muhlbacher F et al. Metabolic disorders in severe abdominal sepsis: glutamine deficiency in skeletal muscle. *Clin Nutr* 1982; 1: 25-41

Sablutzki A, Bergermann J, Baulig W et al. Lipopolysaccharide-binding protein (LBP) and markers of acute-phase response in patients with multiple organ dysfunction syndrome (MODS) following open heart surgery. *Thorac Cardiovasc Surg*. 2001 Oct;49(5):273-8

Sablutzki A, Mühling J, Czeslick E. Sepsis und Multiorganversagen – Update der aktuellen Therapiekonzepte. *Anästhesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther* 2005; 40: 511-520

Sandesc D, Bedreag O. Sepsis: A Review. *Timisoara Medical Journal* 2003; 53

Shenep JL, Flynn PM, Barrett FF et al. Serial quantitation of endotoxemia and bacteremia during therapy for gram-negative bacterial sepsis. *J Infect Dis* 1988; 157:565

Slotwinski R, Slodkowski M, Pertkiewicz M et al. Dynamic of IL-6 and IL-8 concentrations in patients after surgery treated with total parenteral nutrition. *Pol Merkuriusz Lek*. 2002; 12: 45-48

Souba W.W, Herskowitz K, Plumey D.A, Lung glutamine metabolism. *J Parenter Enteral Nutr* 1990; 14: 68

Souba WW, Klimberg VS, Hautamake RD et al. Oral glutamine reduces bacterial translocation following abdominal radiation. *J Surg Res* 1990 ; 48 : 1-5

Spittler A, Winkler S, Gotzinger P. Influence of glutamine on the phenotype and function of human monocytes. *Blood* 1995; 86: 1564-1569

Spittler A, Holzer S, Oehler R et al. A glutamine deficiency impairs the function of cultured human monocytes. *Clin Nutr* 1997; 16: 97-99

Spittler A, Willheim M, Leutmezer F et al. Effects of 1(alpha),25-dihydroxyvitamin D3 and cytokines on the expression of MHC antigens, complement receptors and other antigens on human blood monocytes and U937 cells: role in cell differentiation, activation and phagocytosis. *Immunology* 1997; 90: 286-293

Spittler A, Sautner T, Gornikiewicz A et al. Postoperative glycyl-glutamine infusion reduces immunosuppression: partial prevention of the surgery induced decrease in HLA-DR expression on monocytes. *Clinical Nutrition* 2001; 20: 37-42

Spittler A, Razenberger M, Kupper H et al. Relationship between interleukin-6 plasma concentration in patients with sepsis, monocyte phenotype, monocyte phagocytic properties, and cytokine production. *Clin Infect Dis*. 2000 Dec;31(6):1338-42

Stehle P, Mertes N. et al. Effect of parenteral Glutamine Peptide Supplements on Muscle Glutamine Loss and Nitrogen Balance after major surgery. *The Lancet* 1989

Stoutenbeek C.P, van Saene H.K.F., Zandstra D.F., Prevention of Multiple Organ System Failure by Selective Decontamination of the Digestive Tract in Multiple Trauma Patients. *The Immune Consequences of Trauma shock and Sepsis Vol. II.2*, 1996

Suffredini AF, Fromm RE, Parker MM. The cardiovascular response of normal humans to the administration of endotoxin. *N Engl J Med* 1989; 321: 280-7

Suffredini AF, Reda D, Banks SM et al. Effects of recombinant dimeric TNF receptor on human inflammatory responses following intravenous endotoxin administration. *J Immunol* 1995; 155: 5038-45

Takala A, Nupponen I, Kylonpaa-Back MC et al. Markers of inflammation in sepsis. *Ann Med*. 2002;34(7-8):614-23

Taylor KM. SIRS – the Systemic Inflammatory Response Syndrome after cardiac operations. *Ann Thorac Surg* 1996; 61: 1607-1608.

Tizianello A, Deferrari G et al. Renal ammoniogenesis in an early stage of metabolic acidosis in man. *J Clin Invest* 1982; 69: 240-250

Traveira da Silva AM, Kaulbach HC, Chuidian FS, Lambert DR, Suffredini AF, Danner R.L. Shock and multiple-organ dysfunction after self-administration of Salmonella endotoxin. *New England Journal of Medicine* 1993; 328: 1457-60

Tremel H., Kienle B., Wellemann L.S. et al. Glutamine dipeptide-supplemented parenteral nutrition maintains intestinal function in the critically ill. *Gastroenterology* 1994; 107: 1595-1601

Van der Poll T, Romijn JA, Endert E. et al. Tumor necrosis factor mimics the metabolic response to acute infection in healthy humans. *Am J Physiol* 1991; 261: 457-465

Van Deventer SJH, Büller HR, ten Cate JW et al. Endotoxemia: An early predictor of septicemia in febrile patients. *Lancet* 1998; 1:605

Van Furth R. Mononuclear phagocytes: biology of monocytes and macrophages. Kluwer Academic Publishers.1992. ISBN: 0-7923-1843-9

Van Snick J. Interleukin-6 An overview. *Annu Rev Immunol* 1990; 8:253-278

- Van Zee KJ, DeForge LE, Fischer E et al. IL-8 in septic shock, endotoxemia, and after IL-1 administration. *J Immunol.* 1991 May 15;146(10):3478-82
- Vincent N, Martin G, Baverel G. Glycine, a new regulator of glutamine metabolism in isolated rat-liver cells. *Biochim Biophys Acta* 1992; 1175: 13-20
- Vinnars E, Bergström J, Fürst P. Influence of the postoperative state on the intracellular free amino acids in human muscle tissue. *Ann Surg* 1975; 182: 665-671
- Von Meyenfeldt MF, Mejerink WJHJ, Rouflart MMJ et al. Perioperative nutritional support: a randomised clinical trial. *Clinical Nutrition* 1992; 11: 180- 186
- Wallace C, Keast D. Glutamine and macrophage function. *Metabolism* 1992; 41: 1016-1020
- Wanidworanum C, Strober W. Predominant role of tumor necrosis factor- alpha in human monocyte IL-10 synthesis. *J Immunol* 1993; 151: 6853-61
- Wernemann J., Glutamine-containing TPN: a question of life and death for intensive care unit-patients? *Clinical Nutrition* 1998; 17:3-6
- Wernerman J, Hammarqvist F. Glutamine: a necessary nutrient for the intensive care patient. *International Journal of Colorectal Disease* 1999; 14: 137-142
- Wheeler MD, Ikejima K, Enomote N et al. Glycine: a new anti-inflammatory immunonutrient. *Cell Mol Life Sci* 1999; 56: 843-856
- Wikipedia. Alanin. <http://de.wikipedia.org/wiki/Alanin>. last update 1/2006
- Wilmore, D.W. Metabolic response to severe surgical illness: overview. *World J. Surg.* 2000; 24: 705-711
- Windmueller HG, Spaeth AE. Uptake and metabolism of plasma glutamine by the small intestine. *J Biol Chem* 1974; 249: 5070-5079
- Wischmeyer PE, Riehm J, Singleton KD et al. Glutamine attenuates tumor necrosis factor-alpha release and enhances heat shock protein 72 in human peripheral blood mononuclear cells. *Nutrition* 2003; 19: 1-6
- Yassad, A., Lavoigne, A., Bion, A., Daveau, M. and Husson, A. Glutamine accelerates interleukin-6 production by rat peritoneal macrophages in culture. *FEBS Lett.* 1997; 413, 81-84
- Zamir O. et al. Muscle protein breakdown during endotoxemia in rats and after treatment with interleukin-1 receptor antagonist. *Ann. Surgery* 1992; 216: 381-385
- Zest for live. Alanine amino acid information page. <http://www.anyvitamins.com/alanine-info.htm>. Last update 12/2005
- Ziegler T.R., Young L.S., Benfell K. et al. Clinical and metabolic efficacy of glutamine-supplemented parenteral nutrition after bone marrow transplantation; a randomized, double-blind, controlled study. *Ann intern Med* 1992; 116:821-828

8. Thesen

1. Monozyten als Bestandteil des angeborenen Immunsystems können *in vitro* durch Lipopolysaccharid zur Expression von proinflammatorischen Zytokinen, wie IL-6, IL-8 und TNF- α angeregt werden.
2. Mit Hilfe der Durchflusszytometrie können Monozyten in einem Vollblutmodell phänotypisiert und deren intrazelluläre Zytokinexpression untersucht werden.
3. Unter nicht septischen Umständen, d.h. ohne LPS-Gabe, erhöhen Glutamin, Alanin und Dipeptamin signifikant die IL-8 Produktion der Monozyten.

Durch LPS-Gabe im *in vitro* Sepsis Modell zeigen sich folgende Resultate:

4. Glutamin hemmt im *in vitro* Sepsis Modell die IL-6 und TNF- α Synthese der Monozyten. Die IL-8 Expression wird nicht signifikant beeinflusst.
5. Alanin erhöht die durch LPS stimulierte IL-6 Produktion der Monozyten, während die TNF- α Expression reduziert wird. Die IL-8 Synthese wird durch Alanin nicht signifikant verändert.
6. Dipeptamin (Alanyl-Glutamin) verringert im *in vitro* Sepsis Modell die TNF- α Produktion der Monozyten, während die IL-6 und IL-8 Expression unverändert bleiben.
7. Bei keiner der untersuchten Aminosäurelösungen zeigen sich signifikante Unterschiede hinsichtlich der untersuchten Konzentrationen (Alanin & Glutamin: 2mM & 5mM; Dipeptamin: 1mM, 2mM & 5mM)

9. Lebenslauf

Persönliche Informationen

Name	Carolina Schinke
Geburtsdatum	26. 06. 1980
Geburtsort	Köln
Staatsangehörigkeit	Deutsch
Familienstand	verheiratet

Ausbildung

1986-1990	Grundschule Escherstrasse, Pulheim
1990-1999	Ursulinengymnasium, Köln Abschluss: Abitur 05/1999
1996-1997	Auslandsschuljahr an der College Preperatory School „Wyoming Seminary“ in Kingston, Pennsylvania, USA
1999-2005	Studium der Humanmedizin an der Martin-Luther-Universität, Halle-Wittenberg
2001-2002	Auslandssemester mit dem Erasmus Programm an der „Universita degli Studi“ in Mailand, Italien
2004-2005	Zwei PJ-Auslandstertiale an der „Universita Autonoma“ in Madrid, Spanien

Praktische Weiterbildung

2000	1 Monat Pflegepraktikum in der Viszeral- und Gefäßchirurgie, Universitätsklinikum Köln 1 Monat Praktikum Haematologie-Onkologie, Cedars-Sinai Hospital, Los Angeles, USA
2002	1 Monat Famulatur Innere Medizin, Notaufnahme, im Universitätsklinikum, Mailand, Italien 1 Monat Famulatur Innere Medizin, Immunologie und Haemostase, Universitätsklinikum Krakau, Polen 1 Monat Famulatur Innere Medizin, Kreiskrankenhaus Dormagen

2003 1 Monat Famulatur Herz-Thorax Chirurgie, MLU Halle

2004-2005 4 Monate Praktisches Jahr (PJ) Dermatologie, Hospital Universitario de la Princesa, Madrid, Spanien
4 Monate PJ Traumatologie, Hospital Universitario de la Princesa, Madrid, Spanien
4 Monate PJ Haematologie-Onkologie, MLU Halle-Saale

10. Veröffentlichungen

Schinke C, Czeslick E, Nestler F, Struppert A, Simm A, Sablotzki A. Immunomodulatory effects of L-Glutamine on intracellular cytokine synthesis of human monocytes. *Infections* 4, Volume 31, August 2003

Schinke C, Czeslick E, Struppert A, Nestler R, Simm A, Sablotzki A. Glutamin vs. Alanin-Immunmodulatorische Wirkung der Aminosäuren auf die intrazelluläre Zytokinsynthese von humanen Monozyten in Sepsis. *German Interdisciplinary Journal of Intensive Care medicine*, Band 40, Heft 5, 5/2003

Danksagung

Abschliessend möchte ich mich ganz besonders herzlich bei PD. Dr. med. Armin Sablotzki für die ausgezeichnete Unterstützung und Betreuung dieser Arbeit bedanken. Auch die Möglichkeiten der Teilnahme an Kongressen war für mich sehr wertvoll und hat mir neue Einblicke und Erfahrungen vermittelt. Bedanken möchte ich mich ebenfalls bei Anja Struppert für die unermüdliche Hilfe und Geduld bei den Messungen am Durchflusszytometer und bei den sonstigen, damals noch ungewöhnlichen Labortätigkeiten. Ein herzliches Dankeschön auch an Elke Czeslick, Andreas Simm, Frank Nestler und Phillip Röntgen, sowie an alle anderen, die bei dieser Arbeit mitgewirkt haben, für die freundliche Unterstützung und gute Zusammenarbeit.

Erklärung

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selber angefertigt habe und versichere, dass ich keine anderen als die angegebenen Mittel und Quellen benutzt habe.

Erklärung über frühere Promotionsversuche

Hiermit erkläre ich, dass ich keine früheren Promotionsversuche unternommen habe.