

## 6 Zusammenfassung

Das Multi-Organ-Versagen stellt eine der häufigsten Todesursachen bei der intensivmedizinischen Versorgung polytraumatisierter Patienten dar. Seit langem wird versucht, die Entwicklung dieses komplexen Geschehens durch die unterschiedlichsten Maßnahmen und verschiedene antiinflammatorische bzw. immunmodulierende Substanzen zu unterbrechen.

Die protektiven Effekte einer enteralen Ernährung gelten als erwiesen, jedoch bestehen hinsichtlich der Zusammensetzung und der protektiven Wirkung ihrer Monosubstanzen besonders im Bereich der sogenannten Immunonutrition kontroverse Meinungen. Für verschiedene Aminosäuren wurden bereits umfangreiche Studien durchgeführt.

Glycin ist die einfachste, nicht essentielle Aminosäure. In zahlreichen *in vitro* Untersuchungen konnte der zytoprotektive Effekt von Glycin gezeigt werden. Bei *in vivo* Untersuchungen zeigte Glycin sowohl in einem Endotoxin-Modell als auch in einem Modell zur partiellen Leberschämie / Reperfusion eine signifikante Reduktion des Leberschadens sowie der immuno/inflammatorischen Reaktion. Ziel dieser tierexperimentellen Untersuchung war es, sowohl den Einfluß der Vorfütterung einer glycinsupplementierten Rattendiät (Versuchsabschnitt I.), als auch den Einfluß einer "peri-" und "postoperativen" enteralen Ernährung (Versuchsabschnitt II.) mit einer glycinsupplementierten humanen Sondendiät auf die Letalität, das Ausmaß des Leberschadens und auf die Zytokinfreisetzung in einem der pathophysiologischen Situation nach schwerem Trauma angelehnten Two-hit-Modell (intestinale Ischämie/Endotoxin) (SMAO / ET) in der Ratte zu klären.

Abhängig vom Versuchsansatz wurden jeweils 6-24 erwachsene männliche Ratten des Stammes CrI:SD pro Gruppe mit einem durchschnittlichen Körpergewicht von  $288 \pm 42$  g randomisiert der Test- oder der Placebogruppe als Doppelblindstudie zugeteilt. In Versuchsabschnitt I. wurden die Tiere 72 Stunden mit einer Kontrolldiät (Placebo) bzw. einer mit Glycin supplementierten Rattendiät ernährt. Das Kontrollfutter bestand zu 50 % aus Saccharose, wohingegen die glycinsupplementierte Formel nur 45 % Saccharose, jedoch zusätzlich 5 % Glycin enthielt. In der weiteren Zusammensetzung unterschieden sich die isokalorischen Ernährungen nicht.

Die Sondenernährung (Versuchsabschnitt II.), welche über eine 5 Tage vor der Schädigung operierten Magensonde zugeführt wurde, unterschied sich in der Zusammensetzung nur durch die Supplementierung von 30 g Glycin / 1000 ml Diät (Impact®), die wiederum durch einen erhöhten Kohlenhydratanteil der Placebodiät angeglichen wurde. Dadurch entstanden isokalorische, jedoch nicht isonitrogene Diäten. Die Sondenernährung erfolgte entweder 72 h vor Beginn der SMAO/ET und wurde nach Aufwachen aus der Narkose fortgesetzt ("perioperative" Ernährung) oder nach SMAO/ET ("postoperative" Ernährung). Die so ernährten Tiere wurden mit 50 mg/kg KGW Pentobarbital narkotisiert. Anschließend wurde entweder eine Unterbindung der Arteria mesenterica cranialis (superior) für 45 Minuten (SMAO) durchgeführt oder eine Scheinischämie (sSMAO) vorgenommen. 6 Stunden später erfolgte die Injektion (i.p.) von LPS (*E. coli*, 055:B5; 15 mg/kg KGW) respektive physiologischer Kochsalzlösung (NaCl). Die Kontrollgruppen bestanden aus nichtinstrumentierten Ratten (Versuchsabschnitt I.) und Tieren, die lediglich eine Magensonde erhielten, jedoch normal weitergefüttert wurden (Versuchsabschnitt II.). Die Ratten wurden 3, 24 und 64 Stunden nach Applikation von LPS oder NaCl getötet, und Blut- sowie Gewebeproben (Lunge, Leber, mesenterialer

Lymphknoten und terminales Ileum) wurden gewonnen. Die 24-64 Stunden Letalität wurde dokumentiert; die Plasmaamino­säurezusammensetzung wurde mit Hilfe der HPLC gemessen, vor allem um die Plasmazytokinspiegel zu bestimmen. Weiterhin erfolgte die enzymatische Bestimmung der Leberparameter Aspartataminotransferase (AST), Alaninaminotransferase (ALT) sowie der Laktataminodehydrogenase (LDH) und die Messung des Gesamteiweißes und des Albumins im Plasma. Es wurden die proinflammatorischen Zytokinkonzentrationen von TNF- $\alpha$  und IL-6 sowie des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 im Plasma durch ELISA-Tests bestimmt und eine kompetitive RT-PCR zur Bestimmung der Zytokine in den Gewebeproben durchgeführt.

Die über 72 Stunden mit Glycin vorgefütterten Ratten nahmen  $4,65 \pm 16$  g, die mit der Placebodiät ernährten Tiere  $6,63 \pm 10,06$  an Körpergewicht zu. Die Ratten der "postoperativen" Sondenernährung, die bis zum Insult mit Normalfutter gefüttert wurden, nahmen  $14,49 \pm 16,33$ , die der "perioperativen" Sondenernährung in der Glycingruppe  $25,00 \pm 20,84$  und in der Placebogruppe  $26,50 \pm 21,26$ , die einer "perioperativen" Standarddiät  $30,00 \pm 8,29$  g Körpergewicht ab. Dabei zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen glycinsupplementierten und Kontrolldiäten beider Ernährungsformen.

Eine vor den Versuchen durchgeführte Kalibrierung der LPS-Konzentration ergab keine Letalität nach 5 mg/kg (n=4); 25 % durch 10 mg/kg (n=4); 25 % durch 15 mg/kg (n=8); 38 % nach 20 mg/kg (n=8) und 75 % nach 25 mg/kg und 100 % nach 30 mg/kg (n=4). Dabei korrelierte der Anstieg der untersuchten Leberenzyme mit der Höhe der LPS-Dosis.

Bei der 24-64 Stunden Letalität (alle verstorbenen Tiere starben vor Ablauf der 24 Stunden) zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Glycin- und Placebodiäten:

Versuchsabschnitt I: Rattendiät: SMAO / ET  $\Rightarrow$  Glycin / Placebo: 42 % (n=12), sSMAO / ET  $\Rightarrow$  Glycin : 25 %, Placebo: 17 % (n=12); SMAO und sSMAO / NaCl  $\Rightarrow$  Glycin / Placebo: 0 % (n=6); gesamt: Glycin: 22 % n=36; Placebo 19 % (n=36);

Versuchsabschnitt II: "postoperative" Sondenernährung: SMAO / ET  $\Rightarrow$  Glycin: 67 %, Placebo: 42 % (n=12); sSMAO / ET  $\Rightarrow$  Glycin: 58 %, Placebo: 33 % (n=12); gesamt: Glycin: 63 %, Placebo: 38 % (n=24); Standardformel: SMAO / ET  $\Rightarrow$  83 %; "perioperative" Sondenernährung: SMAO / ET  $\Rightarrow$  Glycin: 33 %; Placebo: 42 %; sSMAO / ET  $\Rightarrow$  Glycin 29 %; Placebo: 43 % (n=12); SMAO u. sSMAO / NaCl  $\Rightarrow$  Glycin / Placebo: 0 % (je n=6); gesamt: Glycin: 19 %, Placebo 26 % (n=36); Standardernährung: 58 % (n=12)).

Eine Bestimmung der Plasmaamino­säurekonzentration ergab eine signifikante Erhöhung der Glycinkonzentration nach Vorfütterung (Ih-Meßwerte) und Sondenernährung in den glycinsupplementierten Gruppen. Der fehlende Unterschied 3 h und 24 h nach Vorfütterung spricht für die Metabolisierung des Glycins, während aufgrund der Operation nur wenig/kein weiteres Futter aufgenommen wurde

Im Gegensatz zu den Letalitäten fand sich durch die Vorfütterung von Glycin eine signifikante Reduktion der Leberschädigung. Für die AST ließ sich nach 1 und 24 Stunden, für ALT und LDH nach 24 Stunden eine signifikant erniedrigte Aktivität in den SMAO/ET Gruppen sowie für die ALT und AST eine signifikante Reduktion in den sSMAO/ET Gruppen messen. Nach postoperativer Sondenernährung fielen signifikant niedrigere Werte nach 1 Stunde in der Gruppe SMAO/NaCl für die AST und nach 1 Stunde in der Gruppe sSMAO/ET für die LDH auf. Insgesamt ließen sich für die "postoperative" Immunonutrition deutlich niedrigere Enzymwerte beobachten als für die Vorfütterung. Bemerkenswert ist, daß sich 24 Stunden nach dem letzten Insult für alle gemessenen Enzyme (AST, ALT und LDH) in der Gruppe mit Unterbindung der Arteria mesenterica cranialis (superior) und Gabe

von physiologischer Kochsalzlösung kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen beiden Diäten fand. LPS potenzierte den Leberschaden nach intestinaler Ischämie erst 24 Stunden nach Schädigung, jedoch wurde dieser Anstieg durch Vorfütterung mit Glycin nahezu aufgehoben. In den Kontrollgruppen der nichtinstrumentierten Tiere ließen sich keine Abweichungen von der Norm und auch keine Unterschiede zwischen Glycin- und Placebofütterung beobachten.

Die Plasmazytokinmessungen zeigten in der Gruppe der stärksten Schädigung (SMAO/ET) eine signifikante Reduktion der TNF- $\alpha$  und IL-10 Konzentration durch die glycinsupplementierte Vorfütterung. Die IL-6 Produktion war um die Hälfte erniedrigt. Nach postoperativer Sondenernährung konnten wiederum keine signifikanten Unterschiede zwischen Glycin- und Placebogruppen ermittelt werden. Jedoch war hier eine signifikante Reduktion von TNF- $\alpha$  und besonders IL-6 sowie eine signifikante Erhöhung der IL-10 Konzentration gegenüber der Vorfütterung zu finden.

Die RT-PCR Untersuchungen ergaben für IL-6 eine signifikante Erniedrigung in Lunge und in den mesenterialen Lymphknoten. In der Leber war diese Reduktion nicht signifikant. Auch für IL-10 wurde eine signifikante Reduktion der mRNA Expression in Leber und Lunge nach glycinsupplementierter Vorfütterung gefunden. Diese Befunde korrelierten mit den erniedrigten Plasmazytokinspiegeln nach der Glycin-Vorfütterung.

Die mRNA Bestimmung der Leber ergab für IL-1 $\beta$  eine signifikante Reduktion in der Placebogruppe nach "postoperativer" Sondenernährung. Ebenfalls in Einklang mit den ELISA-Untersuchungen standen die sich unter der Nachweisgrenze befindenden Werte der SMAO/NaCl Gruppen beider Ernährungen für alle gemessenen Zytokine. Insgesamt zeigte sich für alle Zytokine eine tendenzielle bis signifikant verminderte mRNA-Expression von Lunge über Leber, mesenterialen Lymphknoten mit der niedrigsten Konzentration im Ileum.

Eine besondere Fragestellung war, ob die in Frage kommenden immunregulatorischen Substanzen in diesem Two-hit-Modell, auch wenn sie relativ spät im Krankheitsprozeß gegeben werden, einen normalerweise destruktiven Verlauf verändern können. Dieses konnte nicht für Glycin und nur eingeschränkt für die Immunonutrition gezeigt werden, da keine signifikante Senkung der Letalität erzielt wurde.

Als Nebenbefund dieser Arbeit wurde eine Reduktion der Leberschädigung sowie eine Reduktion der Freisetzung verschiedener proinflammatorischer Zytokine und eine verstärkte Produktion des Zytokins IL-10 durch die "postoperative" Ernährung mit einer sogenannten Immunonutrition (Impact®) beobachtet.

Erstmals konnte die Herunterregulierung von IL-6 und IL-10 mRNA nach Glycinvorfütterung beschrieben werden. Gerade für das Zusammenwirken der pro- und antiinflammatorischen Zytokineffekte liegen noch unzureichende Erkenntnisse vor.

Trotz erhöhten Plasmaglycinspiegeln durch die Sondenernährung scheint Glycin nur nach Vorfütterung die gewünschten Effekte zu zeigen. Der Vergleich der Letalität einer anderen Studie, in der die Leber im Vordergrund der Schädigungen und Untersuchungen stand mit den Ergebnissen dieser Untersuchungen, läßt den Schluß zu, daß Glycin besonders in einer ausreichend hohen Plasmakonzentration eine erfolgversprechende Substanz für die Entwicklung neuer Ernährungsformeln zu sein scheint.

## 7 Summary

Neuhoff de Lozada, K (1998):

### **Analysis of a glycine supplemented diet in a "two-hit" model in rats. Gene expression of cytokines in different compartments in the rat plus their modulation by glycine**

The multiple organ failure is known as one of the most frequent and often lethal complications during the intensive care of polytraumatized patients. For long, scientists have been trying to stop the development of this complex event by various measures and different antiinflammatory or immune modulating substances.

The protective effects of enteral diets are said to be proved, but its composition and the protective effect of its monosubstances especially in the field of immunonutrition-formulas are still discussed controversially.

Extensive studies have already been carried out for different amino acids. Glycine is the most simple nonessential amino acid. The cytoprotective effect of glycine could be proved in numerous in vitro studies. In the case of in vivo experiments, glycine has shown a significant reduction of the liver damage as well as the immuno/inflammatory reaction in both an endotoxin-model and a model of partial hepatic ischemia-reperfusion + sublethal LPS injection in rats.

The aim of this experimental study was to gain information about the influence of a prefed glycine supplemented diet as well as the influence of a peri- and postoperative feeding with a glycine supplemented enteral diet via a gastric tube on the mortality, the extent of the liver damage as well as on the release of cytokines in a two-hit model (intestinal ischemia / LPS) (SMAO / ET) in rats similar to the situation after a severe trauma.

Depending on the test conditions, 6 - 24 male Sprague-Dawley rats (CrI:SD) with an average weight of  $288 \pm 42$  g were assigned randomly to either the test or placebo groups in a double blind manner. The prefeeding groups were fed for 72 hours with a glycine supplemented powdered diet (45% Saccharine and 5% glycine) or a control diet (placebo, 50% Saccharine) with no more differences regarding the composition.

The liquid tube diet was fed through a gastric tube which was implanted 5 days before the injury. The supplement of 30 g Glycine / 1000 ml diet (Impact®) was the only difference in the composition of the two diets which were altered by an increased part of carbohydrates in the placebo diet. This led to isocaloric but not isonitrogenic diets. The tube diet was fed 72 hours before the onset of SMAO/ET and was continued after the recovery from anesthesia (perioperative nutrition) or started only after the insult (postoperative nutrition). The animals were anesthetized using 50 mg/kg BW pentobarbital. Briefly a laparotomy was performed and after the exposure of the arteria mesenterica cranialis (superior) the artery was occluded for 45 minutes (SMAO) or a shamoperation was carried out (sSMAO). LPS (*E. coli*, O55:B5, 15 mg/kg BW) or an equal amount of a 0,9% saline solution (NaCl) was given intraperitoneally 6 hours later. The control groups consisted of noninstrumentalized rats (prefed with test- or placebo diet) and animals which only received surgery for gastric tubes and were

fed a standard rat chow. The rats were killed 3, 24 and 64 hours after the application of LPS or NaCl and blood as well as tissue samples (lung, liver, mesenteric lymph nodes and ileum) were collected. The survival rates were monitored for 24-64 hours. The composition of plasma amino acids was evaluated by HPLC - especially in order to analyze the level of plasmaglycine.

Aspartataminotransferase (AST), Alaninaminotransferase (ALT), Laktataminodehydrogenase (LDH), total protein and albumine were measured in plasma. Plasma cytokine concentrations of TNF- $\alpha$  and IL-6 as well as IL-10 were quantified by using ELISA-kits and a competitive RT-PCR was performed to determine the mRNA levels of IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10 and TNF- $\alpha$  in the tissue samples.

Nutritional status was assessed by daily weight gain. Prefeeding (72 hours) of a glycine supplemented diet resulted in an average weight gain of  $4,65 \pm 16$  g, while animals fed a control diet gained  $6,63 \pm 10,06$  g weight. Animals of the postoperative enteral diet lost  $14,49 \pm 16,33$  g, those of a perioperative feeding regiment  $25,00 \pm 20,84$  g (Glycine) and  $26,50 \pm 21,26$  g in the placebo group. Those rats fed with a perioperative standard nutrition lost  $30,00 \pm 8,29$  g weight. No significant differences between glycine supplemented and control diets were found.

A calibration of the LPS concentration to evaluate the dose dependent survival preceding the experiments resulted in the following mortality rates: 0% after 5 mg/kg (n=4); 25 % after 10 mg/kg (n=4); 25 % after 15 mg/kg (n=8); 38 % after 20 mg/kg (n=8), 75 % after 25 mg/kg and 100 % after 30 mg/kg (n=4). There was a correlation between the increase of transaminases and the amount of LPS injected.

Concerning the mortality after 24 or 64 hours (all animals died within 24 hours) there were no significant differences between test and placebo diets (prefeeding: SMAO/ET  $\Rightarrow$  glycine / placebo : 42 % (n=12), sSMAO/ET  $\Rightarrow$  glycine : 25 %, placebo : 17 % (n=12), SMAO und sSMAO/NaCl  $\Rightarrow$  glycine / placebo : 0 % (n=6), total: glycine: 22 % n=36, placebo : 19 % (n=36); "postoperative" enteral formulated diet: SMAO/ET  $\Rightarrow$  glycine : 67 %, placebo : 42 % (n=12); sSMAO/ET  $\Rightarrow$  glycine: 58 %, placebo : 33 % (n=12); total: glycine: 63 %; placebo : 38 % (n=24); standard enteral diet: SMAO/ET  $\Rightarrow$  83 %; "perioperative" enteral formulated diet: SMAO/ET  $\Rightarrow$  glycine: 33 %; placebo : 42 %, sSMAO/ET  $\Rightarrow$  glycine 29 %, placebo : 43 % (n=12), SMAO u. sSMAO/NaCl  $\Rightarrow$  glycine / placebo : 0 % (je n=6); total: glycine : 19 %, placebo : 26 % (n=36); standard enteral diet: 58 % (n=12))

In contrast to the mortality, especially the prefeeding of a glycine supplemented diet led to a significant reduction of the liver damage: In glycine supplemented SMAO/ET-groups a significant lower activity was measured for AST after 1 to 24 hours, for ALT and LDH after 24 hours as well as a significant reduction in sSMAO/ET groups for ALI and AST.

The postoperative enteral glycine diet resulted in significant lower values at 1 hour after SMAO/NaCl for AST and after SMAO/ET for LDH. In general, much lower enzymelevels were found for the groups fed by the postoperative formula diets (immunonutrition) than for the prefeeding groups (powdered diet). It is remarkable, that after SMAO/NaCl no significant difference between glycine and placebo diets became obvious at 24 hours after the last insult for all measured enzymes (AST, ALI and LDH) Therefore LPS multiplied the liver damage after intestinal ischemia only 24 hours after the injury, but this increase could be nearly completely diminished by prefeeding glycine. No deviation from the norm and no differences between the feeding of either glycine or placebo diets could be stated in the control groups without undergoing surgery.

The analysis of plasma cytokines showed a significant reduction of TNF- $\alpha$  and IL-10 concentrations by prefeeding a glycine supplemented diet in the groups with the most severe damage (SMAO/ET)

The IL-6 production was decreased by half. Groups of the postoperative enteral diet (immunonutrition) showed again no significant differences between glycine and placebo diet. Nevertheless, in contrast to the prefeeding, there was a significant reduction of TNF- $\alpha$  and IL-6 as well as a significant increase of the IL-10 concentration.

**Effect of glycine on mRNA cytokine levels:** IL-6 was diminished significantly in the lung and mesenteric lymph nodes. There was no significant reduction in the liver. A significant reduction of mRNA expression in lung and liver could also be found for IL-10 in the glycine group (prefeeding). These results correlated with low concentrations of plasma cytokines which were detected after prefeeding of the glycine supplemented diet. The liver IL-1 $\beta$  mRNA was reduced significantly in the placebo group of the postoperative immunonutrition. The values for all measured cytokines in SMAO/NaCl groups which were below the detectable level correlated with the equally low plasma cytokine concentrations. All in all, a slightly to significant reduction of mRNA could be found for all cytokines in the lung, liver, mesenteric lymph nodes and the lowest concentration in the distal ileum.

The analysis of the plasma amino acids resulted in a significant increase of the glycine concentration after prefeeding and the enteral diet of the glycine supplemented groups. For prefed groups this difference was only significant after one hour which supports a metabolization of glycine, while there was no further intake of glycine due to the surgery.

One of the main questions was whether the relevant immun regulating substances of this two-hit model, even if fed relatively late during the process of injury, were able to change a normally destructive course. This could not be shown for glycine and only partly for the immunonutrition (Impact<sup>®</sup>) used in this study as no significant reduction of mortality was achieved.

A secondary result of this study was that a reduction of the liver damage as well as the reduction of various proinflammatory cytokines and a reinforced production of the antiinflammatory cytokine IL-10 could be achieved due to the postoperative feeding with an immunonutrition. For the first time the downregulation of IL-6 and IL-10 mRNA after the prefeeding with glycine was shown. The findings concerning the combination of pro- and antiinflammatory cytokines are still insufficient.

Although an increased level of plasma glycine could be maintained by feeding via a permanent gastric tube, glycine seems to have the desired effects only after prefeeding. The comparison between the results of another study in which the liver was the main subject of damage with the results of this study leads to the conclusion that glycine seems to be a successful substance for the development of new formulated diets especially when the plasma concentration is sufficiently high.