

Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Zentrum für Anästhesiologie und Intensivmedizin

Universitätsprofessor Dr. med. Christian Zöllner

Die Rolle von Sphingosin-1-Phosphat in der Sepsis

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Antonia Kondziella, geb. Bauer
aus Elmshorn

Hamburg 2020

Angenommen von der Medizinischen Fakultät am: 28.08.2020

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. Christian Zöllner

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. Jerzy-Roch Nofer

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	- 3 -
1.1	Sepsis	- 3 -
1.1.1	Grundlagen	- 3 -
1.1.2	Epidemiologie	- 4 -
1.1.3	Ätiologie	- 5 -
1.1.4	Diagnostik	- 7 -
1.1.4.1	Laborparameter	- 9 -
1.2	Sphingosin-1-Phosphat	- 11 -
1.2.1	Das Molekül	- 11 -
1.2.2	S1P Metabolismus	- 12 -
1.2.3	S1P-Rezeptoren	- 13 -
1.2.4	Therapeutische Ansätze	- 16 -
2	Fragestellung und Zielsetzung	- 17 -
3	Material und Methoden	- 18 -
3.1	Material	- 18 -
3.1.1	Chemikalien	- 18 -
3.1.2	Materialien	- 19 -
3.1.3	Geräte	- 20 -
3.2	Methoden	- 20 -
3.2.1	Studiendesign	- 20 -
3.2.2	Probengewinnung	- 21 -
3.2.3	Probenaufarbeitung	- 22 -
3.2.4	S1P-Messung	- 22 -
3.2.4.1	Deproteinisierung	- 23 -
3.2.4.2	Kalibrierung	- 23 -
3.2.4.3	Chromatographie und Isolation	- 24 -
3.2.4.4	Massenspektrometrie	- 25 -
3.2.4.5	Auswertung	- 27 -
3.2.5	Erhebung klinischer Daten	- 28 -
3.2.6	Score-Berechnung	- 29 -
3.2.7	Statistik	- 31 -
3.2.8	Ethikantrag und Einverständniserklärung	- 31 -
4	Ergebnisse	- 32 -
4.1	Kohortenbeschreibung	- 32 -
4.2	Demographische Daten des Studienkollektivs	- 33 -

4.3	Auswertung der primären Variable – S1P-Serum-Konzentration.....	- 34 -
4.4	Vergleich der S1P-Konzentration mit Sekundärvariablen	- 36 -
4.4.1	Korrelation von S1P mit dem Lipoprotein HDL	- 36 -
4.4.2	Korrelation von S1P mit zellulären Blutbestandteilen.....	- 39 -
4.4.2.1	Erythrozyten, Hämoglobin und Hämatokrit.....	- 40 -
4.4.2.2	Thrombozyten.....	- 41 -
4.4.3	Korrelation von S1P mit Albumin	- 42 -
4.4.4	Korrelation von S1P mit Nierenfunktionsparametern	- 44 -
4.4.5	Korrelation von S1P mit dem Sepsis-related Organ Failure Assesment	- 45 -
4.4.6	Korrelation von S1P mit inflammatorischen Markern	- 47 -
4.4.6.1	Sensitivität und Spezifität der inflammatorischen Marker.....	- 48 -
4.4.7	Korrelation von S1P und Mortalitätsraten	- 51 -
4.4.7.1	Kaplan-Meier-Kurve.....	- 51 -
4.4.7.2	ROC-Analyse.....	- 52 -
5	Beantwortung der Fragestellung	- 54 -
6	Diskussion	- 56 -
7	Zusammenfassung.....	- 69 -
8	Abstract.....	- 70 -
9	Abkürzungsverzeichnis	- 71 -
10	Abbildungsverzeichnis	- 73 -
11	Tabellenverzeichnis	- 74 -
12	Literaturverzeichnis	- 75 -
13	Lebenslauf	- 83 -
14	Danksagung.....	- 85 -
15	Eidesstattliche Erklärung	- 86 -

1 Einleitung

1.1 Sepsis

1.1.1 Grundlagen

Das Wort Sepsis stammt aus dem Griechischen und bedeutet Dekompensation oder Fäulnis. Erstmals ist es schon vor 2700 Jahren in den Schriften von Homer erwähnt worden (Geroulanos & Douka, 2006). Fast 3000 Jahre später ist die Sepsis noch immer eine Erkrankung, deren Pathomechanismus und Therapie intensiv beforscht wird.

Die Sepsis zeigt sich in Form eines Symptomkomplexes auf Grund einer inadäquaten immunologischen Reaktion des Organismus auf eine Infektion. In der aktuellen internationalen Sepsis-Leitlinie wird die Sepsis als lebensbedrohliche Organdysfunktion aufgrund einer fehlregulierten Körperantwort auf eine Infektion definiert (Singer, et al., 2016).

Die bei der Durchführung der Studie noch aktuelle deutsche Sepsis-Leitlinie von 2010 ist an die 1992 durch die *American College of Chest Physicians/ Society of Critical Care Medicine Consensus Conference* definierten vier Schweregrade angelehnt: (1) *Systemic Inflammatory Response Syndrom* (SIRS), (2) Sepsis, (3) schwere Sepsis und (4) septischer Schock.

Diese Leitlinie sieht die Sepsis als eine progressiv fortschreitende Erkrankung, bei der zunächst ein *Systemic-inflammatory response syndrome* (SIRS) vorliegt. Das SIRS äußert sich klinisch unspezifisch. Zu den Kriterien hierfür zählen (1) eine Hyper-/ Hypothermie mit ≥ 38 °C beziehungsweise ≤ 36 °C, (2) eine Tachykardie mit einer Herzfrequenz ≥ 90 /min., (3) eine Tachypnoe mit einer Atemfrequenz ≥ 20 /min. und (4) eine Leukozytose/ -penie mit $\geq 12.000/\text{mm}^3$ beziehungsweise $\leq 4.000/\text{mm}^3$. Bei einer Sepsis, dem zweiten Stadium, liegt zusätzlich ein mikrobiologischer Nachweis des Erregers oder ein diagnostischer Hinweis vor, der eine bakterielle Infektion hoch wahrscheinlich macht, wie ein pathologisches Röntgenbild. Eine schwere Sepsis ist zusätzlich geprägt durch eine akute Organdysfunktion, wie (1) einer Enzephalopathie, gekennzeichnet durch eine Vigilanzstörung, (2) einer Thrombozytopenie mit $\leq 100.000/\text{mm}^3$ oder einem Abfall von >30 % in 24 Std., (3) einer renalen Dysfunktion, definiert durch eine Diurese von $\leq 0,5$ ml/kg/Std. oder einem Serumkreatinin 2-fach über den Normwert, (4) einer metabolischen Azidose mit einem Base Excess ≤ -5 mmol/l beziehungsweise einer 1,5-fach erhöhten Laktatkonzentration oder (5)

einer Oxygenierungsstörung mit einem $\text{PaO}_2 \leq 10$ kPa oder einem $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ -Verhältnis ≤ 33 kPa. Im septischen Schock liegt zusätzlich einer Hypotonie vor, die medikamentös durch den Einsatz von Vasopressoren (Noradrenalin, Dobutamin) behandelt werden muss, um die Organperfusion aufrechtzuerhalten (Bone, et al., 1992). Klinisch sind die Stadien häufig nicht scharf voneinander zu trennen und gehen ineinander über.

1.1.2 Epidemiologie

Die Forschungsgruppe um Martin berichtet von stetig steigenden Inzidenzen in den USA (Martin, et al., 2003). Dombrovskiy zeigt zudem die Tendenz zu schwereren Verläufen (Dombrovskiy, et al., 2007). In den USA erkrankten jährlich über 751.000 Menschen (3 pro 1.000 Einwohner). Die Gesamtmortalitätsrate beträgt über 28% und bleibt eine Herausforderung für die Diagnostik und die Therapie (Angus, et al., 2001). Die Sepsis ist die häufigste Todesursache auf nicht-kardiologischen Intensivstationen in Industrienationen (Schulte, et al., 2013).

Die Prognose ist abhängig von Komorbiditäten des Patienten, wie hohes Alter, eine bestehende Immunsuppression sowie eine schwere Grunderkrankung (Chaudry, 1999). Durch wachsende Zahlen dieser Patientenpopulation im Rahmen des demographischen Wandels und zunehmende Antibiotikaresistenzen sind die weiterhin steigenden Inzidenzraten möglicherweise erklärbar.

Zahlen aus Deutschland gehen bei etwa 12% der intensivpflichtigen Patienten von einer Sepsis sowie bei weiteren 11% von einer schweren Sepsis/ einem septischen Schock aus (Engel, et al., 2007). Insgesamt werden steigende Fallzahlen mit einer Inzidenzzunahme von jährlich 5,7 % zwischen 2007 und 2013 beschrieben, wobei die Mortalitätsrate nur unbedeutend gesunken ist (Fleischmann, et al., 2016). Jährlich erkrankten in Deutschland 280.000 Menschen, von denen ca. 65.000 Patienten (25%) an den Folgen der Sepsis versterben (Brunkhorst, 2006), die Mortalität korreliert dabei positiv mit dem Schweregrad und steigt auf bis zu 60% bei Patienten im septischen Schock (Fleischmann, et al., 2016).

Die Sepsis verursacht hohe sozioökonomische Kosten. In Deutschland entfallen 32 % des Budgets der Intensivstationen auf die Behandlung von Patienten mit einer Sepsis, das entspricht einer Summe von 1,7 Milliarden € reiner Behandlungskosten (Brunkhorst, 2006). Vergleiche mit den USA zeigen auch dort immense Kosten von 16,7 Milliarden \$ pro Jahr (Chalupka & Talmor, 2012).

1.1.3 Ätiologie

Ursachen für das Entstehen eines SIRS können Infektionen sowie nicht infektiöse Gründe sein wie unter anderem Traumata, Verbrennungen, ein hämorrhagischer oder hypovolämischer Schock, Pankreatitiden. Zu einer Sepsis führt die Invasion von pathogenen Keimen oder deren Toxinen in die Blutbahn (Bone, et al., 1992).

Der häufigste Infektfokus ist mit 63% in den Atemwegen in Form von Pneumonien, gefolgt von intraabdominellen Infektionen (25%) (Brunkhorst, 2006). Zu 52% ist die Infektion auf gram-positive Bakterien und zu 37% auf gram-negative Bakterien zurückzuführen (Martin, et al., 2003).

Die überschießende Freisetzung verschiedener pro-inflammatorischer Zytokine mündet in einem „Zytokin-Sturm“ mit einer inadäquaten Immunantwort. In dieser Phase werden z.B. der Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α), Interleukin-1 (IL-1), Interleukin-6 (IL-6) und Interleukin-12 (IL-12) aus Zellen der angeborenen Immunabwehr wie den Monozyten, den CD4+-T-Zellen, den Makrophagen und den Endothelzellen ausgeschüttet. Dies führt durch Interaktionen mit Leukozyten und akute Phase Proteinen zu der klinischen Ausprägung eines SIRS, mit Temperaturregulationsstörungen, Steigerung von Atem- und Herzfrequenz sowie pathologischen Laborparametern der Leukozyten (Hotchkiss & Karl, 2003).

Ist die Phase der akuten Inflammation überwunden, kommt es möglicherweise zu einer zweiten hypo-inflammatorischen Phase, dem CARS (*Compensatory Anti-Inflammatory Response Syndrom*). Das CARS wiederum ist geprägt durch die Ausschüttung von Interleukin-4 (IL-4), Interleukin-10 (IL-10), Prostaglandin E₂ (PGE₂) sowie *Transforming-Growth-Factor* β (TGF- β) (Junger, et al., 1996) aus Makrophagen und Monozyten. Diese Immunsuppression stellt sich durch sinkende Zahlen von B-Zellen, CD4+-T-Zellen, Makrophagen und folliculären dendritischen Zellen dar, indem über negatives Feedback deren Aktivierung gehemmt und die Apoptose gesteigert wird (Hotchkiss & Karl, 2003).

Abbildung 1 fasst die Pathophysiologie der Sepsis, mit dem SIRS und CARS, zusammen.

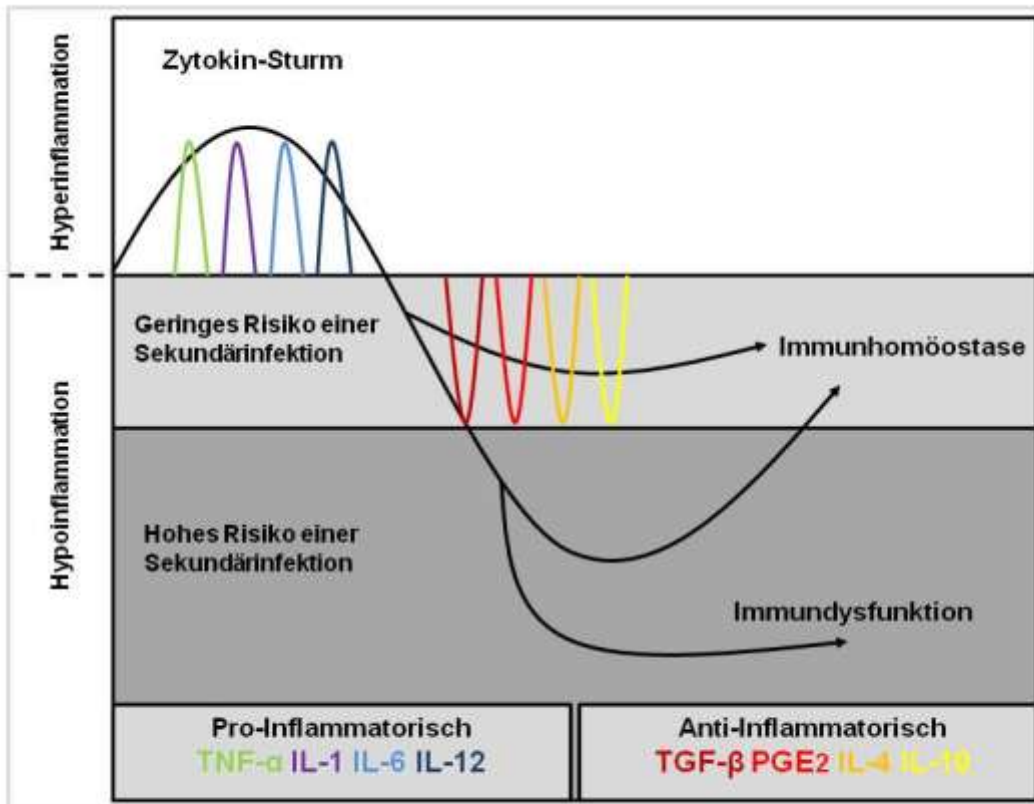


Abbildung 1: Darstellung der Pathophysiologie der Sepsis. Durch TNF- α , IL-1, IL-6, IL-12 wird eine Hyperinflammation ausgelöst, die sich klinisch als SIRS darstellt. Parallel oder nachfolgend verläuft das sogenannte CARS, gekennzeichnet durch die Immundepression durch TGF- β , IL-4, IL-10 und PGE₂. Das CARS, bildet für den Patienten ein hohes Risiko einer Sekundärinfektion. Je nach Erreger und Komorbiditäten des Patienten sind nach Ausschüttung der anti-inflammatorischen Zytokine die dargestellten unterschiedlichen Verläufe möglich. (modifiziert und frei nachgezeichnet nach (Boomer, et al., 2014))

Die ungerichtete Freisetzung all dieser bioaktiven Moleküle äußert sich klinisch in einer Vielzahl sehr unterschiedlicher Symptome:

1) Gerinnungssystem

Die Aktivierung der Gerinnungskaskade kann ausgelöst werden und zu einer disseminierten intravasalen Gerinnung führen. Hierdurch kann es zu Thrombembolien und einer Beeinträchtigung des Blutflusses kommen mit nachfolgender Minderperfusion lebenswichtiger Organe. Paradoxiweise besteht nach dem Verbrauch der Gerinnungsfaktoren und Thrombozyten die Gefahr von Blutungen (Remick, 2007).

2) Immunabwehr

Durch veränderte Zytokinkonzentrationen binden neutrophile Granulozyten vermehrt an Endothelzellen. Das Fehlen der Migration dieser Granulozyten in die Infektionsherde verhindert die Eliminierung pathogener Keime (Brown, et al., 2006).

Die verminderten Lymphozytenzahlen, sowohl von B- Zellen als auch von CD4+-T-Zellen entstehen durch dessen vermehrte Apoptose (Hotchkiss, et al., 2001). Dieser programmierte Zelltod wird durch die antiinflammatorisch wirkenden Mediatoren wie IL-10, TNF- α und PGE₂ ausgelöst (Ayala, et al., 1996).

3) Endotheliale Funktionsstörungen

Die Endothelzellen sind normalerweise durch die *Adherens Junctions* fest miteinander verankert und stellen damit eine unüberwindbare Barriere für intravasale Zellen und Plasmabestandteile dar. Ein „Aufbrechen“ dieser Verbindungen führt zu einem Austritt intravasaler Flüssigkeit. Ist dieser Schaden generalisiert, wie bei einer Sepsis, so äußert sich dies klinisch in einem Volumenmangelschock mit Ödemen und Hypotonie (Rivers, et al., 2001). Die Organperfusion verschlechtert sich und der Blutfluss ist gestört.

Diese Endothel-Lecks führen neben dem Austritt intravasaler Flüssigkeit auch zur Ausschwemmung pathogener Keime in den Organismus (Denk, et al., 2012). Die eigentlich physiologische Reaktion der Migration von Abwehrzellen durch die Endothelschranke, die bei einer lokalen Infektion auch lokal abläuft, verläuft in der Sepsis dann generalisiert. Hierdurch entstehen Organdysfunktionen, da eine generalisierte Entzündungsreaktion als Immunantwort auf die pathogenen Keime mit Schwellungen, Hypoxie und Durchblutungsstörungen der Organe abläuft.

1.1.4 Diagnostik

Es gibt bislang keinen diagnostischen Marker, der eine sichere und frühzeitige Diagnose der Sepsis zulässt oder ausschließt. Auch ein mikrobiologischer Erregernachweis ist in 30 % der Fälle nicht möglich. Ein Grund dafür ist, dass bereits frühzeitig mit einer antibiotischen Therapie begonnen wird, die einen Erregernachweis beispielsweise aus Blutkulturen unmöglich macht (Alberti, et al., 2002).

Die Deutsche Sepsis Gesellschaft hat eine Leitlinie publiziert (Abbildung 2), die anhand der klinischen Parameter (Vitalparameter) und der laborchemischen Parameter (Blutbild,

Nieren-Retentionsparametern, Blutgasanalyse) die Einteilung des Schweregrads der Sepsis zulässt (Sepsis-Gesellschaft, 2010). Die frühzeitige Diagnose sowie der Verdacht auf eine Sepsis sind erleichtert. Allerdings sind die klinischen Symptome unspezifisch und nicht sensitiv, damit ist die sichere Diagnosestellung nur möglich durch den Erregernachweis in der Blutkultur.

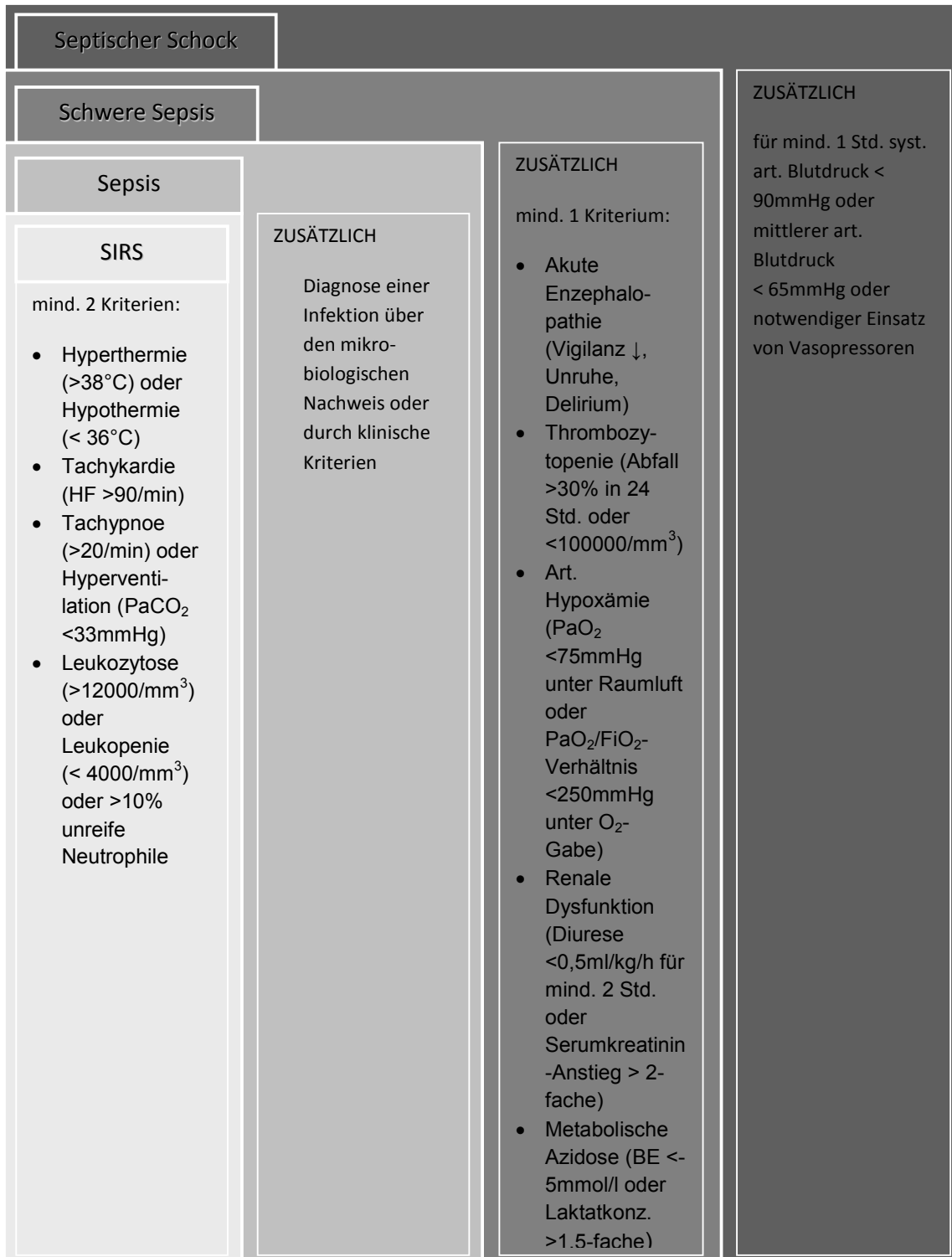


Abbildung 2: Diagnostische Kriterien der vier Sepsis-Stadien SIRS, Sepsis, schwere Sepsis und septischer Schock anhand der Leitlinie der Deutschen Sepsis Gesellschaft (Sepsis-Gesellschaft, 2010)

2016 ist die neue internationale Sepsis-Leitlinie „Sepsis 3“ publiziert worden. Eine aktualisierte deutsche Leitlinie wurde 12/2018 veröffentlicht (Brunkhorst, et al., 2018). Die Probengewinnung und Auswertung ist zu diesem Zeitpunkt bereits abgeschlossen gewesen, sodass sich diese Dissertation im Weiteren weiterhin auf die deutsche Sepsis-Leitlinie von 2010 bezieht. Unter der Annahme, dass jede Form der Sepsis mit einer Organdysfunktion einhergeht, ist in der neuen internationalen Leitlinie die Sepsis als Kombination aus Organdysfunktion und Infektion definiert. Als Diagnostik-*Tool* bezüglich der Organdysfunktion dient insbesondere der *Sepsis-related organ failure assessment Score* (SOFA-Score). Bei akutem Anstieg des SOFA-Scores (Atmung, Koagulation, Leberfunktion, Herzkreislauffunktion, Glasgow-Coma-Scale und Nierenfunktion) um ≥ 2 Punkte ist von einer Sepsis auszugehen. Der septische Schock wird zusätzlich durch den Einsatz von Vasopressoren und einer Laktatkonzentration von ≥ 2 mmol/l definiert. Das Stadium des SIRS sowie der Schweren Sepsis entfällt. Das neue Diagnostik-*Tool* zur frühzeitigen Erkennung einer Sepsis ist der *q(quick)-SOFA*. Der Verdacht einer Sepsis besteht bei einem systolischem Blutdruck ≤ 100 mmHg, einer Bewusstseinsveränderung sowie einer Atemfrequenz >22 /min (Singer, et al., 2016).

1.1.4.1 Laborparameter

1) Procalcitonin

Ein wichtiger Labormarker in Bezug auf die Sepsis-Diagnostik ist das Procalcitonin (PCT). PCT ist ein Vorläuferpeptid des Calcitonins und wird unter physiologischen Bedingungen in den C-Zellen der Schilddrüse produziert. Im Rahmen einer Sepsis sind zusätzlich Leber, Niere, Lunge und Adipozyten in der Lage das Prohormon zu produzieren (Morgenthaler, et al., 2003).

PCT ist ein früher Marker für den Nachweis einer bakteriellen Infektion, dabei ist neben der absoluten Plasmakonzentration des PCT auch dessen Verlauf wichtig. Um die Differentialdiagnose einer Sepsis auszuschließen beziehungsweise zu bestätigen, wird daher eine frühzeitige PCT-Bestimmung im Serum empfohlen (Luzzani, et al., 2003). Bei Serum-Werten von $< 0,5$ ng/ml gilt die Differentialdiagnose einer schweren Sepsis/ eines septischen Schocks als unwahrscheinlich, Werte von > 2 ng/ml hingegen weisen auf das Vorliegen einer Sepsis hin (Brunkhorst, et al., 2000).

2) Interleukin-6

Das Interleukin-6 (IL-6) wird als weiterer diagnostischer Entzündungsmarker häufig bestimmt. Es wird aus den Makrophagen, Endothelzellen und Fibroblasten freigesetzt und ist ein wichtiger Faktor, der die Produktion von Akute Phase Proteinen in der Leber stimuliert. Eine direkte Assoziation konnte zwischen dem Schweregrad der Sepsis, gemessen an dem klinischen Apache-II-Score, sowie der Mortalitätsrate und den IL-6-Spiegel gezeigt werden (Damas, et al., 1992). IL-6 wirkt vor allem auf das angeborene Immunsystem und ist somit bei Neugeborenen-Infektionen der wegweisende Marker. Der Normalwert von IL-6 liegt bei 1pg/ml.

3) C-reaktives Protein

Das C-reaktive Protein (CrP) wird wie die anderen Akute Phase Proteine in den Hepatozyten synthetisiert. Es führt zu Aktivierung des Komplementsystems und der Phagozyten (Clyne & Olshaker, 1999). Das CrP ist ein unspezifischer Marker für entzündliche Prozesse und Tumoren. Seine Konzentration im Blut korreliert mit der Entzündungsaktivität mit einer 12-24-stündigen Latenz.

Bei CrP-Werte von $\geq 50\text{mg/l}$ ist stark von einer Sepsis auszugehen (Póvoa, et al., 1998). Normwerte liegen bei $\leq 10\text{mg/l}$.

4) Laktat

Laktat entsteht als Endprodukt bei der anaeroben Glykolyse. Nach Rücktransport zur Leber kann es erneut als Produkt für die Gluconeogenese verwertet werden. Pathologisch erhöhte Laktatkonzentrationen entstehen bei Hypoxie sowie bei Minderperfusionen und treten somit auch bei einer Sepsis auf. Als normwertig gelten Konzentrationen von 0,6-2,4mmol/l (Herold, 2012). Ab Werten von $\geq 5,6\text{mmol/l}$ ist hingegen ein septischer Schock wahrscheinlich (Bakker, et al., 1996).

5) Leukozyten-Zahl

Leukozyten sind physiologische Blutzellen des menschlichen Immunsystems. Ihr Bildungsort ist das Knochenmark. Physiologische Konzentrationen liegen bei 3.800-10.500/ μl . Im Rahmen einer Sepsis kann es entweder zu einer Leukozytopenie ($< 4.000/\mu\text{l}$) oder zu einer Leukozytose ($> 12.000/\mu\text{l}$) kommen (Herold, 2012).

1.2 Sphingosin-1-Phosphat

1.2.1 Das Molekül

1884 ist das Molekül Sphingosin-1-Phosphat (S1P) erstmals von dem Arzt und Biochemiker Johann L. W. Thudichum beschrieben worden. Eine Isolation dessen ist ihm in der weißen und grauen Hirnmasse gelungen. Auf Grund des rätselhaften Aussehens und der für ihn unbekannt Stoffklasse hat Thudichum dem Molekül den Namen Sphingosin in Anlehnung an die mysteriöse Sphinx der griechischen Mythologie gegeben (Thudichum, 1884).

Anfang der neunziger Jahre ist S1P dann erstmals in die Klasse der bioaktiven Sphingolipide eingeordnet worden, nachdem Beobachtungen einen Einfluss auf das Zellwachstum gezeigt hatten (Zhang, et al., 1991).

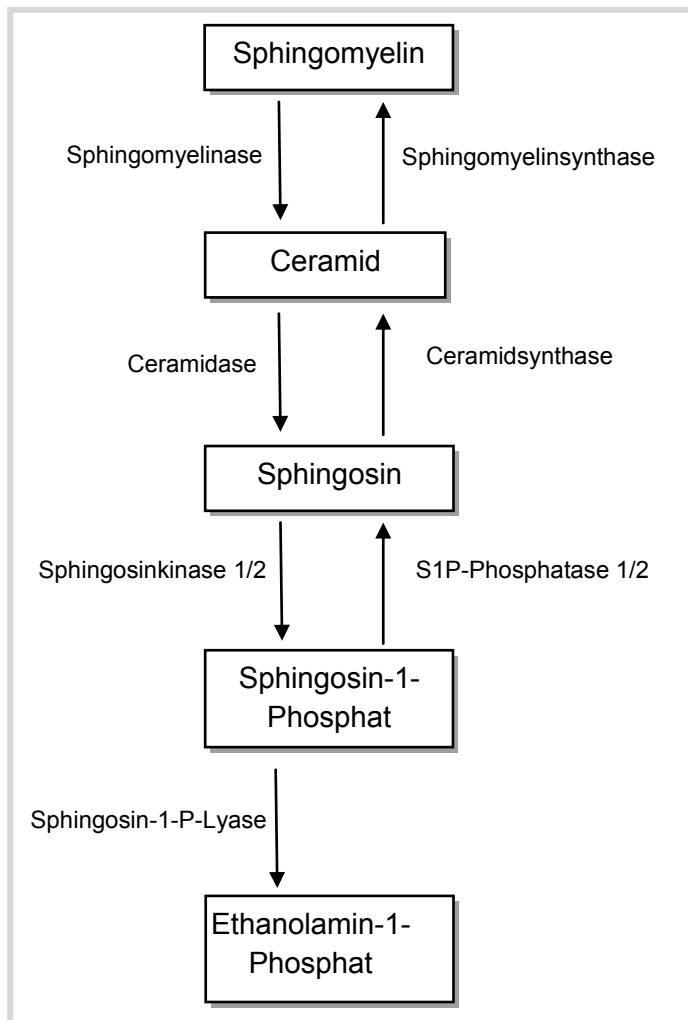


Abbildung 3: Sphingosin-1-Phosphat (S1P)-Syntheseweg mit De-novo-Synthese und Abbau von S1P

S1P wird aus Sphingosin ATP-abhängig durch Phosphorylierung durch die Sphingosinkinasen 1 und 2 vor allem in Mastzellen, Thrombozyten und Monozyten De-novo synthetisiert (Spiegel & Milstien, 2003). Die Sphingosine wiederum entstehen aus den Vorstufen Sphingomyelin und Ceramid.

Zwei Abbauewege ermöglichen die Regulierung der S1P-Konzentrationen. Zum einen ist durch eine Phosphatabspaltung durch die S1P-Phosphatase 1 und 2 eine Wiederherstellung von Sphingosinen möglich. Zum anderen wird S1P über die Sphingosin-1-Phosphat-Lyase irreversibel zu Ethanolamin-1-Phosphat abgebaut.

Die De-novo Synthese und damit der vermutlich hauptsächliche Syntheseweg des S1P ist in Abbildung 3 dargestellt.

Die Summenformel des Moleküls ist $C_{18}H_{38}NO_5P$, Abbildung 4 stellt die dazugehörige Strukturformel dar.

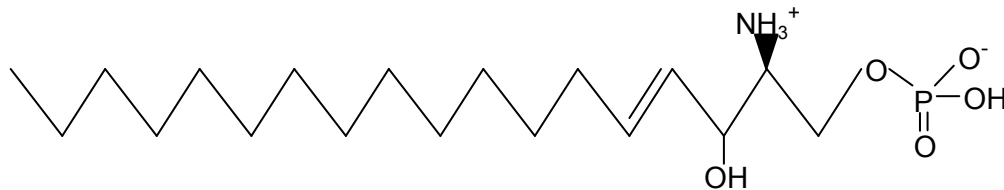


Abbildung 4: Strukturformel von Sphingosin-1- Phosphat

1.2.2 S1P Metabolismus

Freies S1P hat eine Halbwertszeit von etwa 15 Minuten, der schnelle Umsatz lässt auf eine hohe Speicherkapazität und/ oder schnelle Neubildung schließen (Venkataraman, et al., 2008).

Die S1P-Konzentration wird im Blut vor allem über hämatopoetische Zellen, insbesondere über die Erythrozyten reguliert. Den Erythrozyten fehlen ebenso wie den Thrombozyten die abbauenden Enzyme, Sphingosin-1-Phosphat-Lyase und S1P-Phosphatase 1 und 2 (Pappu, et al., 2007). Aber auch vaskuläre Endothelzellen sind neben den hämatopoetischen Zellen Produzenten und Speicherort von S1P (Venkataraman, et al., 2008). Lymphatische Endothelzellen sind vermutlich ein S1P Produzent im lymphatischen Gewebe (Pham, et al., 2010).

Für die Ausschüttung von S1P in lymphatischem Gewebe ist der Transporter *Spinster homolog 2* (Spns2) notwendig. Dieser stellt in den lymphatischen Endothelzellen produziertes S1P bereit und steuert darüber zusammen mit dem S1P-Rezeptor 1 (siehe 1.2.3) die Lymphozyten-Migration (Mendoza, et al., 2012).

Transportiert wird S1P zu etwa 60% an Apolipoprotein M (Apo M) gebunden, welches ein Proteinanteil des *High Density Lipoproteins* (HDL) darstellt (Christoffersen, et al., 2011). Zum anderen wird es an Albumin gebunden (35%) transportiert (Murata, et al., 2000). Ein kleiner Teil von 5% wird außerdem an *Low Density Lipoprotein* (LDL) gebunden transportiert (Kumaraswamy, et al., 2012).

S1P agiert direkt als *Second-Messenger* (Alvarez, et al., 2010) und auf indirektem Weg über Aktivierung von fünf G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (S1P-Rezeptor 1-5 (S1PR1-5)) (Rosen, et al., 2013).

1.2.3 S1P-Rezeptoren

Die S1P-Rezeptoren sind fünf unterschiedliche G-Protein (GTP-bindendes Protein)-gekoppelte Rezeptoren S1PR1, 2, 3, 4 und 5, von denen die Rezeptoren 1-3 die am besten untersuchten Rezeptoren sind. Bei S1PR1 und S1PR4 steht die Ankoppelung an inhibitorische G-Proteine (G_i) im Vordergrund. Durch Aktivierung führt dies unter anderem zur Hemmung der Adenylylcyclase (AC) und darüber zur Reduktion des cAMP- Spiegels und damit zu einer verminderten Aktivierung der Proteinkinase A (PKA) sowie zur Aktivierung der *Extracellular-signal Regulated Kinase* (ERK) aus der Gruppe der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAP-Kinasen) sowie der Phospholipase C (PLC) mit weiterführender Aktivierung der Proteinkinase C. Die S1PR2 und 3 sind an drei weitere G-Proteine gekoppelt. Zum einen an G_i , welches zusätzlichen Einfluss auf die Rac-Kaskade, eine Untereinheit der *Ras homologue* (Rho)-Kaskade, nimmt und diese vermutlich als Gegenregulation zu S1PR1 inaktiviert. Des Weiteren binden S1PR2 und 3 an Phospholipase-C-gekoppelte G-Proteine (G_q) und an $G_{12/13}$, das für die Aktivierung der Rho-Kaskade verantwortlich ist. Der S1PR5 wirkt sowohl über G_i als auch über $G_{12/13}$. Zusammenfassend hat die Aktivierung von G_i Einfluss auf die Proliferation und die Apoptose von Zellen, während G_q über Signalwege den Metabolismus steuert und $G_{12/13}$ Migration, Adhäsion und Barrierefunktion beeinflusst (Rosen & Goetzl, 2005). Abbildung 5 zeigt eine Übersicht über die verschiedenen Signalwege der S1P-Rezeptoren (Spiegel & Milstien, 2003) (Löffler, et al., 2006).

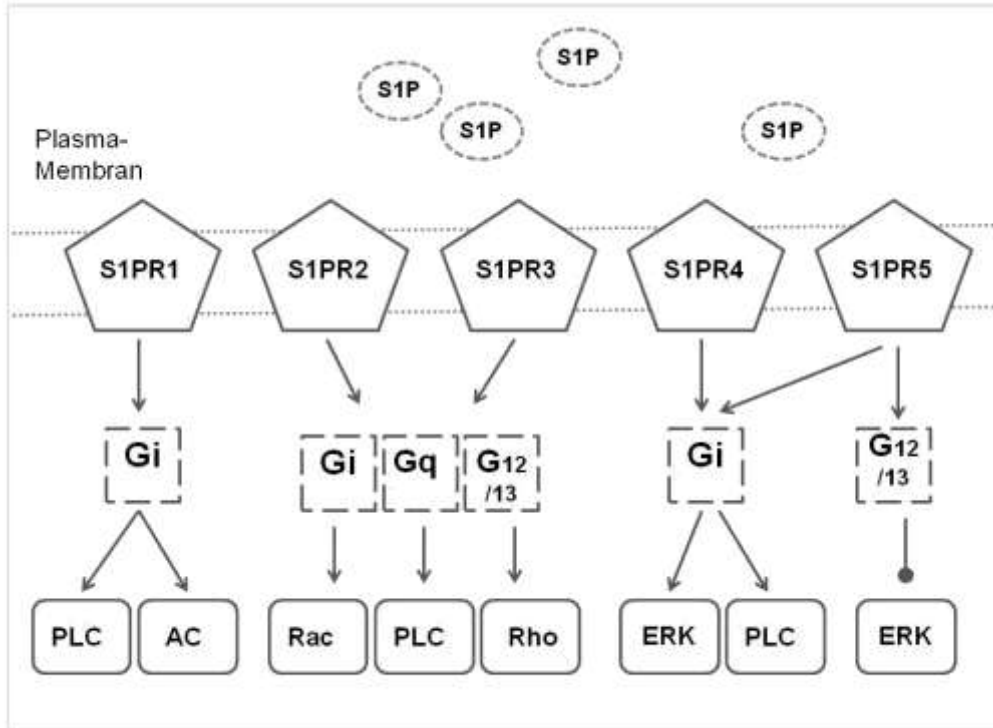


Abbildung 5: Übersicht über die molekularebiologischen Signalwege der fünf G-Protein-gekoppelten S1P-Rezeptoren, (modifiziert und freinachgezeichnet nach (Spiegel & Milstien, 2003))

Die unterschiedlichen Signalwege führen zu entsprechenden Reaktionen der einzelnen Zelle. Im Folgenden werden die klinischen Auswirkungen auf die Organe durch die Aktivierungen der Signalwege zusammengefasst (Abbildung 5).

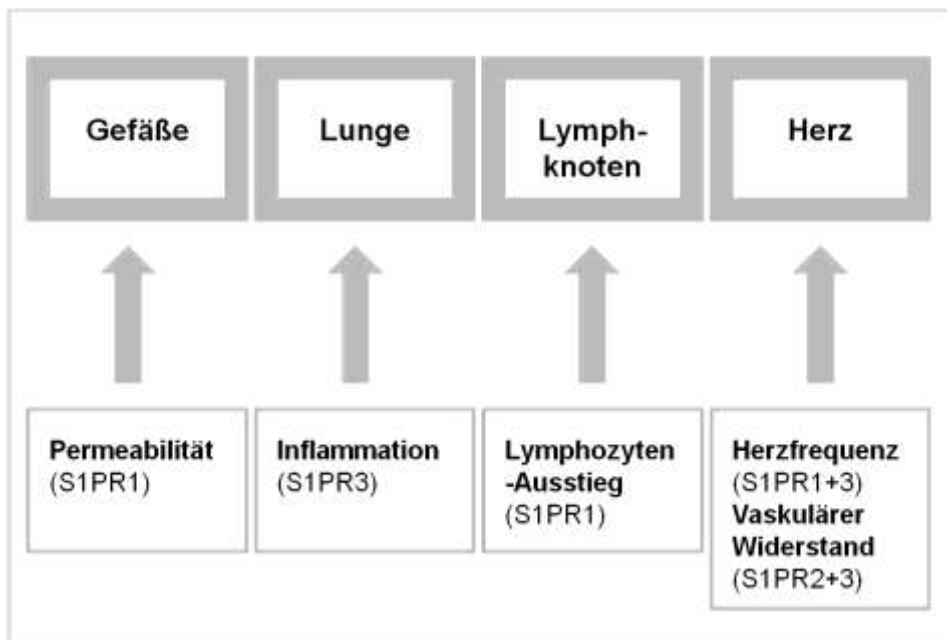


Abbildung 6: Darstellung einiger wichtiger Wirkmechanismen der S1P- Rezeptoren an unterschiedlichen Organen des menschlichen Organismus (modifiziert nach (Rosen, et al., 2013)).

1) Migration von Abwehrzellen

Der wichtige Rezeptor im Bezug auf die lymphozytäre Migration ist der S1PR1. Wegweisend für Migration ist der S1P-Gradient von Lymphorganen versus Lymphe und Blut. Die physiologische Homöostase wird aufrecht erhalten durch niedrige S1P-Konzentrationen in den Lymphorganen durch den Abbau von S1P durch S1P-Lyase sowie die hohen S1P-Spiegel durch S1P-produzierende Erythrozyten im Blut und rezeptorkontrolliertes Einschwemmen aus Endothelzellen durch Spns2 in der Lymphe. Weiterhin migriert S1P von den niedrigen S1P-Konzentrationen in den Lymphorganen zu den hohen in Blut und Lymphe in Abhängigkeit von entgegengesetzter Konzentration des S1PR1 (Baeyens, et al., 2015). Entsprechend konnten Studien im Mausmodell einen T-Zell-Arrest in den Lymphorganen aufgrund von *Knockout* des S1PR1-Rezeptors mit entsprechend begleitendem Anstieg der S1P-Konzentration zeigen (Matloubian, et al., 2004). Ebenso verhindert eine verminderte Plasma-S1P-Konzentration im Mausmodell nach *Knockout* der S1P-produzierenden Sphingosinkinase 1/2 die Migration der Lymphozyten (Pappu, et al., 2007). Die Gabe eines S1PR1-Antagonisten wirkt im Mausmodell auf gleiche Weise lymphopen (Tarrasóna, et al., 2011).

Der Rezeptor S1PR2 nimmt Einfluss auf die Makrophagen-Migration. Ein Modell mit experimentell durch *Thioglycollate* induzierter Peritonitis zeigt bei S1PR2 *Knockout*-Mäusen einen Anstieg an Makrophagen um 44 %. Somit ist davon auszugehen, dass die Aktivierung des S1PR2 zur Abnahme der Makrophagen-Migration in entzündetes Gewebe führt (Michaud, Im, & Hla, 2010).

2) Endothelfunktion

Das Auflösen der Zellverbindungen, der *Adherens Junctions*, korreliert mit dem pathophysiologischen Schweregrad der Sepsis (Wallez Y, 2008), (Bazzoni & Dejana, 2004). Über die verschiedenen Rho-GTPasen wird die Barrierefunktion gesteuert. Ist der S1PR1 auf Endothelzellen exprimiert wirkt er als Stabilisator. Durch Bindung von S1P an den S1PR1 kommt es durch Aktivierung der Rac-Kaskade und durch Umbildung des Aktinzytoskeletes zur Ausbildung von *Adherens Junction* zwischen den Endothelzellen, diese verhindern das Auftreten eines vaskulären Lecks (Camerer, et al., 2009). Hierzu fungiert die Rho-Kaskade über S1PR2 (Sanchez, et al., 2007) und S1PR3 antagonistisch (Sammani, et al., 2010). In der Pathologie der Sepsis entsteht eine Dysbalance zwischen diesen beiden GTPasen, ausgelöst durch verschiedene pro-inflammatorische Moleküle wie TNF- α (Yi & Ulich, 1992), Thrombin (van Nieuw Amerongen, et al., 2008) oder TGF- β (Clements, et al., 2005), welche

Rac inhibieren oder Rho aktivieren. Im Tierversuch zeigt sich der Zusammenhang der intakten zellulären Integrität mit S1P und dem S1PR1 (Camerer, et al., 2009). McVerry et al. beschreiben weiterhin die Abnahme eines vaskulären Lecks bei intravenöser S1P-Substitution in LPS-induzierten Lungenschädigungen (McVerry, et al., 2004).

3) Hämodynamik

Die Aktivierung des S1PR2 führt im Mausmodell über Vasokonstriktion zu Blutdrucksteigerung (Olivera, et al., 2010). Ursächlich hierfür ist vermutlich eine S1PR2-abhängige Aktivierung von TNF- α (Scherer, et al., 2010).

Eine Aktivierung von S1PR3 bewirkt ebenfalls eine Hypertension, sowie eine Bradykardie (Forrest, et al., 2004).

Zusätzlich wird somit über die S1P-Rezeptoren die, bei Sepsis-Patienten häufig massiv eingeschränkte, Hämodynamik reguliert.

1.2.4 Therapeutische Ansätze

Das S1P-Analogon FTY-720, auch unter dem Namen Fingolimod oder dem Handelsnamen Gilenya® bekannt, ist ein nicht-selektiver S1P-Rezeptor-Modulator. Vor allem über Wirkung auf S1PR1 wirkt Fingolimod immunsuppressiv. Durch Phosphorylierung von FTY-720 durch die Sphingosin-Kinase-2 wird es zu FTY-720-P aktiviert. Die aktivierte Form führt zu einer Internalisierung des S1PR1, dadurch entsteht der in 1.2.3 bereits beschriebene Lymphozytenarrest im lymphatischen Gewebe und eine Immunsuppression (Chun & Hartung, 2010). Dieser therapeutische Ansatz kommt in der Behandlung der Multiplen Sklerose zum Einsatz (Radue, et al., 2012). Weiterhin zeigte sich in einem Tierversuch mit Ratten, dass FTY-720 zu einer Reduktion des Plasmavolumen-Verlusts bei induzierter Sepsis führt (Lundblad & Axelberg, 2013).

Weitere Substanzen sind in der laborchemischen und klinischen Erforschung und sollen ihren Einsatz in der Therapie von unter anderem Psoriasis, Systemischem Lupus erythematodes, Chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen und akuten viralen Lungenentzündungen finden (Gonzalez-Cabrera, et al., 2014).

2 Fragestellung und Zielsetzung

Die Sepsis ist eine dysregulierte immunologische Reaktion auf ein infektiöses Pathogen. Wichtiger Mechanismus, der zum klinischen Verlauf einer Sepsis beiträgt, ist die endotheliale Funktionsstörung, die möglicherweise durch S1P im Blut beeinflusst wird.

- 1) Regelmäßig kommt es in der Sepsis zu einem kapillären Leck, das durch den Zusammenbruch der endothelialen Schranke gekennzeichnet ist. Die endotheliale Funktionsstörung führt zu einer Volumenverschiebung von intra- nach extravasal und bedingt den relativen Volumenmangel septischer Patienten. Dies führt nachfolgend zu einer Hypotension sowie Organminderperfusion und zum Organversagen. S1P kann über den S1PR1, dem vermutlich dominanten Rezeptor auf Endothelzellen, im Tierexperiment die endotheliale Schranke aufrechterhalten. Somit ist nicht ausgeschlossen, dass durch eine Veränderung der Blut-S1P Spiegel die endotheliale Schranke mit beeinflusst wird.

Hypothese 1: Die S1P-Konzentration ist in Patienten mit einer Sepsis reduziert.

- 2) Der septische Schock ist darüber hinaus durch eine volumenrefraktäre Hypotension definiert, die den Einsatz von Vasopressoren notwendig macht, um den Perfusionsdruck und die Organversorgung aufrechtzuerhalten. S1P ist möglicherweise an der Regulation des Blutdruckes beteiligt, wie tierexperimentelle Studien zeigen.

Hypothese 2: Der S1P-Spiegel im septischen Schock ist im Vergleich zu septischen Patienten, die keine Vasopressoren bedürfen, erniedrigt.

- 3) Die klinische Definition der Sepsis befindet sich im Wandel. Im Fokus steht die Organfehlfunktion, die im SOFA Score erfasst werden. Weiterhin gibt es inflammatorische Biomarker, die in der klinischen Routine als Verlaufsparemeter der Sepsis eingesetzt werden.

Hypothese 3: Der S1P-Spiegel korreliert mit klinischen Scorings sowie anderen Entzündungsmakern.

- 4) Es bleibt unklar inwieweit S1P im Menschen reguliert wird, denkbar wäre, dass die S1P-Konzentration von den S1P-Quellen oder seinen Trägermolekülen abhängt.

Hypothese 4: Die S1P-Konzentration korreliert mit der Konzentration seiner Trägermoleküle sowie den Speicherorten.

3 Material und Methoden

3.1 Material

In den folgenden Kapiteln sind die verwendeten Materialien und Geräte tabellarisch dargestellt.

3.1.1 Chemikalien

In Tabelle 1 sind die verwendeten Chemikalien aufgeführt.

Tabelle 1: Chemikalienliste

Gegenstand	Bezeichnung	Hersteller
Silikonisierungsreagenz	Sigmacote®	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Acetonitril	LiChrosolv Acetonitril für LC-MS	Merck Chemicals GmbH, Schwalbach
H₂O	LiChrosolv Water für LC	Merck Chemicals GmbH, Schwalbach
Ameisensäure	Formic acid für MS	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Methanol	LiChrosolv Methanol für LC-MS	Merck Chemicals GmbH, Schwalbach
C17-(S1P-)Puder	D-erythro-sphingosine-1-phosphate (d17:1)	Avanti Polar Lipids, Alabaster, USA
S1P-Puder	S9666 Sigma	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Fetales Kälber-Serum	FBS Biochrom	Merck Chemicals GmbH, Schwalbach

3.1.2 Materialien

Tabellarisch sind die die verwendeten Materialien aufgeführt.

Tabelle 2: Materialienliste

Gegenstand	Bezeichnung	Hersteller
Blutentnahmeröhrchen	Serum-Gel-Monovette 7,5 ml	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
Blutentnahmeröhrchen	EDTA-KE-Monovette 7,5 ml	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
Blutentnahmeröhrchen	Gerinnungs-Monovette 3 ml	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
Blutgasanalyse- Probennehmer	PICO50	Radiometer GmbH, Willich
Reaktionsgefäß	Eppendorf Tubes 1,5ml	Eppendorf AG, Hamburg
Pipettenspitzen	epT.I.P.S. 1000 µl	Eppendorf AG, Hamburg
Pipette	Eppendorf Reference 1000 µl	Eppendorf AG, Hamburg
Mikrotiterplatten	PP-Microplatte, 96 well, U-Boden	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Säule	Zorbax SB-C8	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
Pasteurpipette	Pasteurpipette, 150 mm	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe
Gummissauger	Gummissauger, 1,8 ml	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe

3.1.3 Geräte

Die Tabelle stellt die zur Aufarbeitung der Proben verwendeten Geräte dar.

Tabelle 3: Geräteliste

Gegenstand	Bezeichnung	Hersteller
Zentrifuge	Megafuge 1.0	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Zentrifuge	Centrifuge 5810	Eppendorf AG, Hamburg
Vortexer	Certomat MV	B. Braun Biotech International GmbH, Melsungen
Zentrifuge	Centrifuge 5425 R	Eppendorf AG, Hamburg
Pumpen (LC)	Prostar 210	Varian Medical Systems, Palo Alto, USA
Column Oven (LC)	Prostar 510	Varian Medical Systems, Palo Alto, USA
Massenspektrometer	MS 1200	Varian Medical Systems, Palo Alto, USA
Trockenschrank	UM 800	Memmert GmbH und Co. KG, Schwabach

3.2 Methoden

3.2.1 Studiendesign

Es wurden 100 Patienten in eine prospektive Kohortenstudie eingeschlossen. Alle Patienten wurden stationär auf der Intensivstation des Universitätsklinikums Eppendorf behandelt. Das Kollektiv von 100 Patienten teilt sich in 3 Untergruppen auf: Gruppe A = SIRS oder Sepsis bestehend aus 40 Patienten sowie Gruppe B = schwere Sepsis und Gruppe C = septischer Schock mit jeweils 30 Patienten. Zusätzlich sind 20 gesunde Probanden als Kontrollgruppe eingeschlossen worden.

Um in die Studie eingeschlossen zu werden haben die Patienten die Kriterien eines SIRS, einer Sepsis, einer schweren Sepsis oder eines septischen Schocks erfüllt. Die Kriterien wurden nach der unter 1.1.4 erläuterten Leitlinie der Deutschen Sepsis-Gesellschaft festgelegt (Sepsis-Gesellschaft, 2010) (siehe Abbildung 2).

Ausschlusskriterien sind ein Kardiogener Schock, eine Schwangerschaft oder Stillzeit, ein fehlendes Einverständnis sowie ein moribunder Patient gewesen.

Der Tag des Einschlusses ist als Tag 0 festgelegt worden.

Das Studiendesign hat die Blutentnahmen in der Gruppe A an Tag 1 vorgesehen, in Gruppe B und C an den Tagen 1, 3 und 7, soweit die Studienteilnehmer nicht vorzeitig von der

Intensivstation auf eine Normalstation verlegt worden oder verstorben sind. Ein Studientag ist definiert von 6 Uhr morgens bis um 6 Uhr morgens des Folgetages. Der Endpunkt der Studie ist die Entlassung von der Intensivstation beziehungsweise an Tag 28 nach Studieneinschluss. An diesem Zeitpunkt ist evaluiert worden, ob der Patient überlebt hat.

Die Kontrollgruppe (=K) bestand aus 20 gesunden medizinischen Angestellten und Studenten des Universitätsklinikums Eppendorf. Bei den Probanden sind zum Zeitpunkt der Studienteilnahme keine akuten Erkrankungen bekannt gewesen. Es ist eine einmalige Blutentnahme erfolgt.

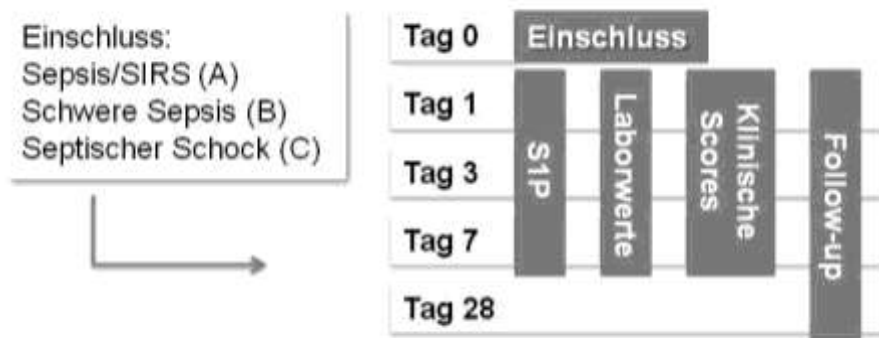


Abbildung 7: Graphische Darstellung des Studiendesigns

3.2.2 Probengewinnung

Die Probengewinnung ist von April 2014 bis November 2014 erfolgt.

Zugangsort und Art der Blutentnahme variieren innerhalb des Patientenkollektivs, je nach Vorhandensein von Abnahmesystemen. Priorisiert wurde die arterielle Blutentnahme über einen arteriellen Zugang. Bei Fehlen eines solchen Zugangs ist auf eine venöse Abnahme ausgewichen worden.

Zu jedem Zeitpunkt ist je ein Serum-, ein EDTA- und ein Gerinnungsröhrchen sowie eine BGA abgenommen worden, in denen im Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin des Universitätsklinikums Eppendorfs folgende Parameter bestimmt worden sind:

- Blutbild und Differentialblutbild
- Gerinnungsparameter (Quick, INR, apTZ, Thrombinzeit, Fibrinogen)
- HDL, LDL, VLDL, Albumin

- Lebertransaminasen (GOT, GPT, GLDH), Bilirubin
- Laktat, Kreatinin, Harnstoff
- Entzündungsparameter (CrP, IL-6, PCT)

Für die Messung des S1P-Spiegels sind ein weiteres Serum- und Plasma-Röhrchen Vollblut abgenommen worden, welche innerhalb von höchstens drei Stunden im Labor der Klinik für Intensivmedizin aufgearbeitet worden sind.

3.2.3 Probenaufarbeitung

Nachdem das Serum-Röhrchen zwei Stunden bei Raumtemperatur aufrecht gestanden hat, ist es in der Megafuge 1.0 für 15 Minuten bei 3.000 rpm mit Ausschwingrotor ohne Bremse zentrifugiert worden. Zur Aliquotierung sind etwa 400µl des Überstands in Eppendorftubes in der Größe von 1,5ml pipettiert worden. Die Tubes sind mit dem Gruppennamen (A/ B/ C/ K), der Durchnummerierung innerhalb der Gruppe, sowie dem Studientag beschriftet und bei -20°C eingefroren worden.

Das Plasma-Röhrchen ist in der Centrifuge 5810 für 15 Minuten bei 3.000 rpm mit Ausschwingrotor ohne Bremse zentrifugiert worden. Zur Aliquotierung sind ebenfalls etwa 400µl des Überstands in Eppendorftubes in der Größe von 1,5ml pipettiert worden. Die Tubes sind mit dem Gruppennamen (A/ B/ C/ K), der Durchnummerierung innerhalb der Gruppe sowie dem Studientag beschriftet und bei -20°C eingefroren worden.

Die Eppendorftubes sind bis zur Bestimmung des S1P-Spiegels bei -80°C gelagert worden.

3.2.4 S1P-Messung

In Kooperation mit dem Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie sind die S1P-Messungen durchgeführt worden.

Die Methodik der S1P-Messung ist von unserem Kooperationslabor in Seattle entwickelt worden (Shimizu, et al., 2007). Mithilfe der entsprechenden Protokolle ist die Messmethode auch am Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie etabliert worden.

Sämtliche verwendete Eppendorf-Tubes und Mikrotiterplatten müssen silikonisiert sein. Hierfür sind sie mit einer Pasteur-Pipette mit Sigmacote® befüllt worden, das im gleichen

Schritt wieder entfernt worden ist. Nach Absaugung des überschüssigen Silikons folgen eine Waschung mit H₂O und eine anschließende Trocknung im Trockenschrank bei 60°C über Nacht.

Die Messung der S1P-Konzentration in den Blutproben der Studienteilnehmer ist in Doppelbestimmung durchgeführt worden.

3.2.4.1 Deproteinisierung

Die Serum-/ Plasma-Proben der Probanden sind im ersten Schritt deproteinisiert worden. In die Eppendorf-Tubes sind hierfür jeweils 180µl Acetonitril (AcN) (80%ig) und 10µl eines internen Standards, D-erythro-sphingosine-1-phosphat (C17-S1P), sowie 20µl des Patientenserums/ -plasmas pipettiert worden. Als nächstes sind die Eppendorf-Tubes mit dem Vortexer Certomat MV durchmischt worden. Daraufhin sind sie 15 Minuten bei 10.000 rcf bei 4°C in der Zentrifuge 5424R zentrifugiert worden. Von dem entstandenen Überstand sind 50µl in ein *Well* einer Mikrotiterplatte pipettiert worden und mit 50µl Acetonitril (80%) verdünnt worden.

3.2.4.2 Kalibrierung

Für die Kalibrierung ist für jeweils drei Mikrotiterplatten eine Standardreihe in dreifacher Bestimmung gemessen worden. Der S1P-Feststoff S9666 ist für die Standardreihe in den Konzentrationen 0µM, 0,1µM, 0,3µM, 1µM und 3µM fetalem Kälberserum zugesetzt worden.

Das mit S1P angereicherte Kälberserum der Standardreihe ist dann wie die Patientenseren behandelt worden, also zunächst deproteinisiert und dann gemessen.

Nach Befüllen der ersten 15 *Wells* mit der dreifachen Standardreihe, je 50µl plus 50µl Acetonitril, sind die nächsten drei *Wells* ausschließlich mit 10µl Acetonitril befüllt worden, um Messverfälschungen der folgenden Probandenproben zu minimieren.

Als weiterer Kontrolle sind jeweils die letzten sechs *Wells* mit 5µl Acetonitril und 50µl eines Kontroll-Serums befüllt worden. Statt der Patientenproben ist dreifach 20µl der Serumprobe, quality control low (qcL), einer gesunden Probandin zugefügt worden und

außerdem drei weitere mit 20µl der gleichen gesunden Serumprobe, quality control high (qcH), der vorher 1µl S1P (=10mM; S9666) zugesetzt worden ist.

Für alle Mikrotiterplatten sind die gleichen Qualitätskontrollen verwendet worden. Nach Beendigung der Messungen ist kontrolliert worden, ob die S1P-Serumwerte nicht um mehr als ± 20% vom ersten gemessenen Wert abweichen, ansonsten ist die Mikrotiterplatte erneut gemessen worden.

Tabelle 4 zeigt eine beispielhafte Belegung einer Mikrotiterplatte, mit der Standardreihe zu Beginn, dann drei Leerwerten, mittig den Serumproben der Patienten und am Ende den Qualitätskontrollen.

Tabelle 4: Beispielbestückung einer Mikrotiterplatte mit der Standardreihe zu Beginn (A1- B3), dann den Leerwerten (B4- B6), den Probanden- Werten (B7- H6) und zuletzt den Qualitätskontrollen (H7- H12)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0µM	0µM	0µM	0,1µM	0,1µM	0,1µM	0,3µM	0,3µM	0,3µM	1µM	1µM	1µM
B	3µM	3µM	3µM	AcN	AcN	AcN	C-1.1	C-1.1	C-1.3	C-1.3	C-1.7	C-1.7
C	C-2.1	C-2.1	C-2.3	C-2.3	C-2.7	C-2.7	C-3.1	C-3.1	C-3.3	C-3.3	C-3.7	C-3.7
D	C-4.1	C-4.1	C-4.3	C-4.3	C-4.7	C-4.7	C-5.1	C-5.1	C-5.3	C-5.3	C-5.7	C-5.7
E	C-6.1	C-6.1	C-6.3	C-6.3	C-6.7	C-6.7	B-1.1	B-1.1	B-1.3	B-1.3	B-1.7	B-1.7
F	B-2.1	B-2.1	B-2.3	B-2.3	B-2.7	B-2.7	B-3.1	B-3.1	B-3.3	B-3.3	B-3.7	B-3.7
G	A-1.1	A-1.1	A-2.1	A-2.1	A-3.1	A-3.1	A-4.1	A-4.1	A-5.1	A-5.1	A-6.1	A-6.1
H	A-7.1	A-7.1	A-8.1	A-8.1	A-9.1	A-9.1	qcH	qcH	qcH	qcL	qcL	qcL

3.2.4.3 Chromatographie und Isolation

Zur Auftrennung der Serumproben ist im nächsten Schritt eine Flüssigchromatographie (engl. *Liquid chromatography* = LC) durchgeführt worden. Die Serumprobe ist zusammen mit zwei Elutionsmitteln durch die Säule Zorbax SB-C8 im Column Oven bei 40°C mit einer Flussrate von 0,35ml/Min gepumpt worden. Als Elutionsmittel sind 0,1% Ameisensäure in H₂O und ein ameisensaures (0,1%) Gemisch aus Methanol/ Acetonitril (50:50) zum Einsatz gekommen. Im Verlauf der Chromatographie ist der Anteil der lipophilen Komponente zur

Elution der Analyten aus der Trennsäule gesteigert worden. Den zeitlichen Verlauf dieses binären Gradienten zeigt Tabelle 5.

Tabelle 5: Zeitlicher Verlauf des Elutionsmittelgradienten

Zeit [Min:Sek]	Methanol/ Acetonitril [%]	Ameisensäure [%]
0:00	40	60
2:10	95	5
3:30	40	60

Auf Grund des lipophilen Charakters der reversed-phase-Säule wird S1P während der ersten 2 Minuten und 10 Sekunden an die Säule gebunden. Hydrophile Moleküle hingegen sind nicht gebunden und somit abgetrennt worden. Im zweiten Schritt wird der Gradient verändert, um die lipophilen Moleküle von der Säule abzuspülen. Nach 3 Minuten und 30 Sekunden ist der Gradient wieder auf das Ausgangsniveau gestellt worden, um für die nächste Messung die gleichen Ausgangsbedingungen zu erreichen.

3.2.4.4 Massenspektrometrie

Die in der Chromatographie isolierten lipophilen Moleküle gelangen dann in das Tandem-Massenspektrometer. Im ersten Schritt der Massenspektrometrie wird die zu analysierende Substanz ionisiert. Hierfür wird eine Elektrospray-Ionisation (ESI) verwendet. Bei dieser Methode werden aus der Probe durch Bildung eines elektrischen Feldes Aerosole mit Ionen gebildet. Dieses Verfahren der Ionisation ist auf Grund der guten Anwendung bei großen Molekülen und der molekülschonenden Methode ausgewählt worden. Die entstandenen Ionen gelangen dann in den Quadrupol-Analysator des Massenspektrometers. Dort werden sie wiederum mit Hilfe eines elektrischen Feldes nach ihrem Masse-Ladungs-Verhältnis (m/q) sortiert. Nach Auswahl des Mutterions werden die Ionen in der nachgeschalteten Kollisionszelle durch Stöße mit einem Inertgas weiter zu kleineren Ionen fragmentiert, welche dann wiederum im zweiten Analysator nach ihrem Masse-Ladungs-Verhältnis aufgetrennt werden. Bei S1P ist der Massenübergang $380,1 > 264$ und bei C17-S1P $366,1 > 250$ gewählt worden. Die Detektion der Tochterionen über die Zeit hat das in Abbildung 8 dargestellte Chromatogramm ergeben, wobei der erste Peak nach 2,8 Minuten die Messung von C17 darstellt und der zweite nach 3 Minuten die von S1P, da C17-S1P ein C-Atom weniger enthält als S1P, somit weniger lipophil als S1P ist und vor S1P von der Säule eluiert

wird. In Abbildung 9 wird noch einmal das Einzelchromatogramm der S1P-Messung abgebildet.

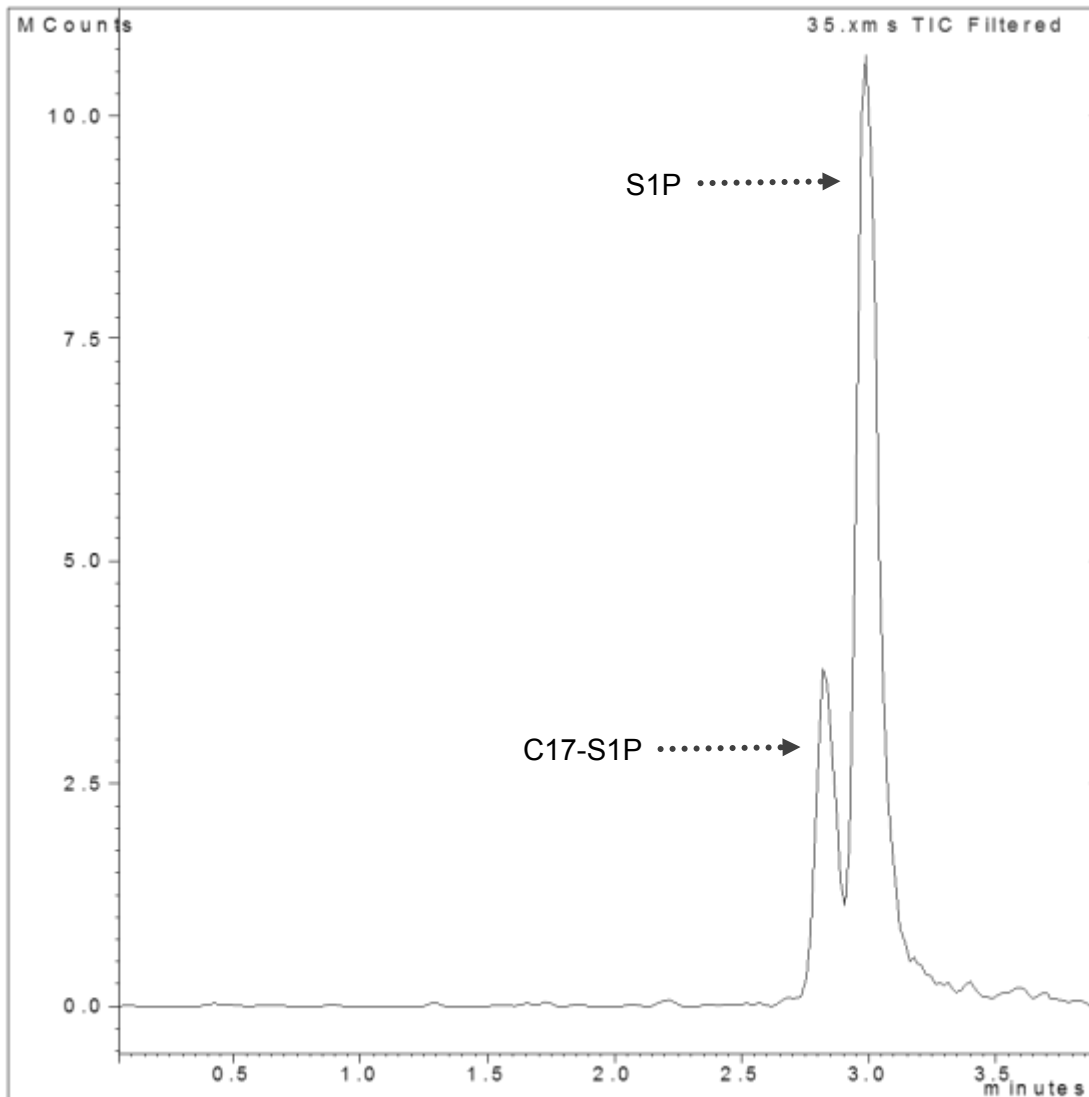


Abbildung 8: Chromatogramm des internen Standard C17-S1P und S1P mit der Anzahl der gemessenen Ionen aufgetragen gegen die Zeit

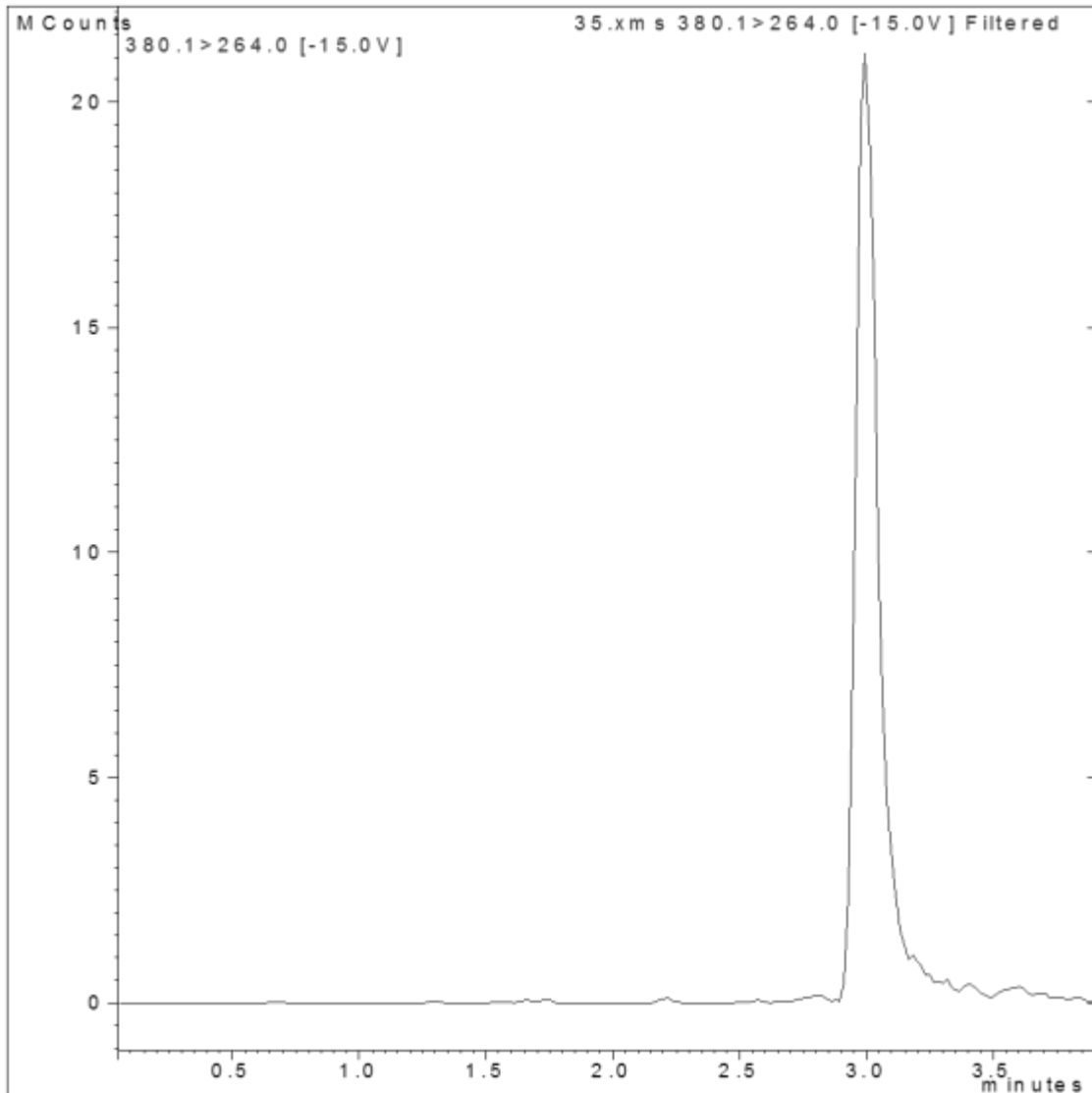


Abbildung 9: Einzelchromatogramm von S1P mit der Anzahl der gemessenen Ionen aufgetragen gegen die Zeit

3.2.4.5 Auswertung

Mit dem Programm MS Data Review® sind die Flächen unterhalb der Kurven (AUC) von S1P beziehungsweise dem internen Standard C17 berechnet worden. Danach sind diese in Microsoft Excel® exportiert worden. Zunächst sind die Flächen von S1P und C17 der Standardreihe integriert worden. Nach Berechnung der Quotienten aus S1P und der Konstanten C17 für die Standardkonzentrationen sind diese in eine Kalibrierungsgerade eingetragen worden (siehe Abbildung 10). Anhand der Geradengleichung der Kalibrierungsgerade kann dann für die Serumproben der Patienten die S1P-Konzentration errechnet werden. In der Beispielgerade ist die Formel $x=y/3,1811$, wobei x der herauszufindende S1P-Wert ist und y den Flächenquotienten von S1P/ C17 der Serumprobe

darstellt. Mit Berechnung des Mittelwerts der Doppelbestimmung der Serumproben werden dann die S1P-Konzentrationen der Patienten ermittelt.

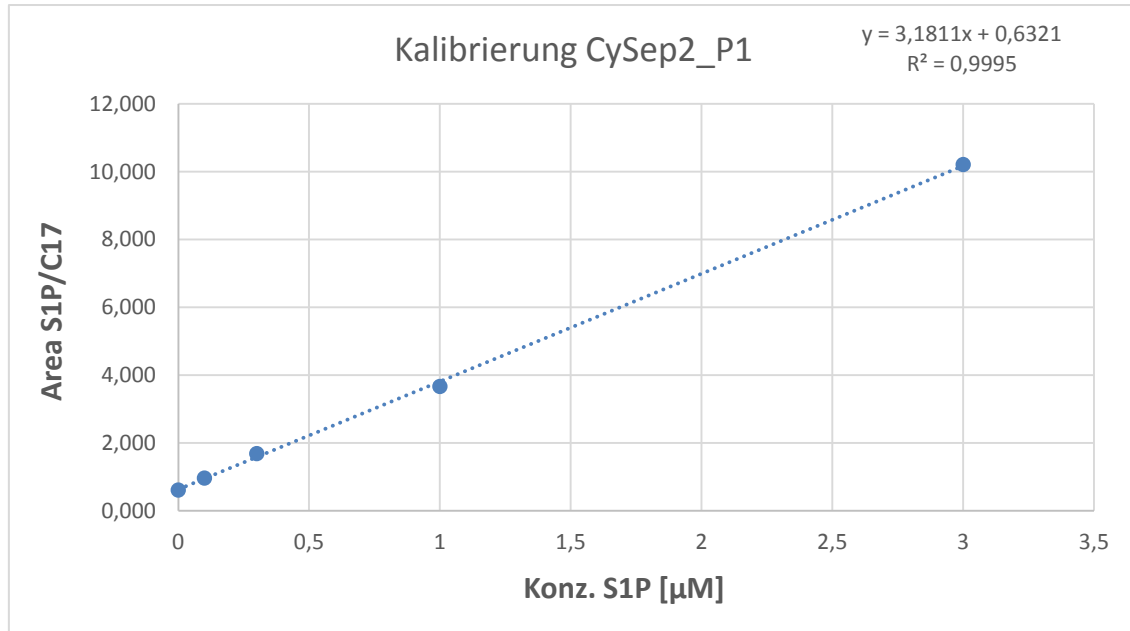


Abbildung 10: Beispiel-Kalibrierungsgerade anhand der Messwerte der Standardreihe

3.2.5 Erhebung klinischer Daten

Die Patienten sind während ihres Aufenthalts auf der Intensivstation kontinuierlich überwacht worden, sodass stetige Vitalzeichenkontrollen mittels Messungen von Blutdruck, Herzfrequenz und Temperatur erfolgt sind. Ebenso sind in regelmäßigen Abständen Blutgasanalysen durchgeführt worden und die Beatmung/ Sauerstoffgabe sowie die Bilanzierung sind dokumentiert worden. Auch die Medikamentengaben sind Bestandteil der regelhaften Dokumentation.

An jedem Studientag ist außerdem zur Abschätzung der Bewusstseinslage des Probanden die *Glasgow-Coma-Scale* bestimmt worden. Bewertet werden hierfür die verbale Kommunikation (1-5 Punkte), die motorische Bewegungsreaktion (1-6 Punkte), sowie die Augenöffnung (1-4 Punkte) des Patienten. Sodass ein Höchstwert (volles Bewusstsein) von 15 Punkten erreicht werden kann und der Minimalwert (tiefes Koma) bei 3 Punkten liegt.

3.2.6 Score-Berechnung

24 Stunden nach der Aufnahme auf den Intensivstationen wird der *Simplified-Acute-Physiology-Score II* (SAPS II) bestimmt. Die Berechnung dieses Scores ermöglicht eine Einschätzung über den allgemeinen Gesundheitszustand bei Aufnahme. In die Auswertung fließen Kreislaufparameter, Laborparameter und vorbestehende Risikofaktoren, wie Alter und chronische Erkrankungen ein. Eine genaue Aufschlüsselung der Kriterien ist Tabelle 6 und Tabelle 7 zu entnehmen.

Tabelle 6: Kriterien des **S**(implified) **A**(cute) **P**(hysiology) **S**(core)- II Teil 1

Punkte	0	1	2	3	4	5	6	7	9	10	11	12	13
<u>max. Herzfrequenz</u> [Min]	70-119		40-69		120-159			≥160			<40		
<u>max. syst. Blutdruck</u> [mmHg]	100-199		≥200			70-99							<70
<u>max. Temperatur</u> [°C]	<39,0			≥39,0									
<u>PaO₂/ FiO₂</u> [mmHg]							≥200		100- <200		<100		
<u>Urinausfuhr</u> [l/d]	≥1,0				0,5- <1,0						<0,5		
<u>max. Harnstoff</u> [mg/dl]	<60						60- <180			≥180			
<u>max. Leukozyten</u> [10 ³ /mm ³]	1,0- <20,0			≥20,0								<1,0	
<u>max. Kalium</u> [mmol/l]	3,0- <5,0			≥5,0/ <3,0									
<u>max. Natrium</u> [mmol/l]	125- <145	≥145				<125							
<u>min. Bicarbonat</u> [mmol/l]	≥20			15- 20			<15						
<u>max. Bilirubin</u> [mg/dl]	≤4,0				4,0- ≤6,0				>6,0				

Tabelle 7: Kriterien des **S**(implified) **A**(cute) **P**(hysiology) **S**(core)- II Teil 2

Punkte	0	7	12	15	16	18
<u>Alter [J]</u>	<40	40-59	60-69	70-74	75-79	>80
Punkte	9		10		17	
<u>Chron. Leiden</u>	Metastasierende Neoplasie		Hämatologische Neoplasie		AIDS	
Punkte	0		6		8	
<u>Aufnahmestatus</u>	Geplant chirurgisch (>24h)		Medizinisch (≥7d ohne OP)		Ungeplant chirurgisch (<24h)	

An den Studientagen 1, 3 und 7 ist das Sepsis-related Organ Failure Assessment (SOFA) als Verlaufs-Score bestimmt worden. Der Score bewertet mögliche Organdysfunktionen, im Bereich Lunge, Herz, Niere, Leber und ZNS. Der genaue Aufbau des Scores ist in Tabelle 8 dargestellt. Durch Bestimmung des Schweregrads der Organdysfunktion ist dieser ein guter Parameter zur Abschätzung eines drohenden Multiorganversagens.

Tabelle 8: Kriterien des **S**(epsis-related) **O**(rgan) **F**(ailure) **A**(ssessment) – Score

Organdysfunktion Parameter	Punkte				
	0	1	2	3	4
<u>Respiratorische Insuffizienz</u> <i>PaO₂/FiO₂ min.</i> [mmHg]	≥400 (ohne Beatmung)	<400 (ohne Beatmung)	<300 (ohne Beatmung)	<200 (mit Beatmung)	<100 (mit Beatmung)
<u>Gerinnungsstörung</u> <i>Thrombozyten min.</i> [10 ³ /mm ³]	≥150	<150	<100	<50	<20
<u>Leberdysfunktion</u> <i>Bilirubin ges. max.</i> [mg/dl]	≤1,16	1,17-1,90	1,91-5,93	5,94-11,93	>11,94
<u>Kreislaufinsuffizienz</u> <i>Blutdruck min.</i> [mmHg]	MAP ≥ 70	MAP < 70	Dopamin ≤ 5 mcg/kg/Min oder Dobutamin	Dopamin > 5 mcg/kg/Min oder Noradrenalin ≤ 0,1 mcg/kg/Min	Dopamin > 15 mcg/kg/Min oder Noradrenalin > 0,1 mcg/kg/Min
<u>Störungen des ZNS</u> <i>Glasgow Coma Scale</i>	15	14-13	10-12	6-9	<6
<u>Niereninsuffizienz</u> <i>Serumkreatinin max.</i> [mg/dl] <i>Urinproduktion</i> [ml/d]	≤ 1,12	1,13-1,92	1,93-3,38	3,39-4,97 oder < 500	> 4,98 oder < 200

3.2.7 Statistik

Die Messwerte sind als Mediane mit Minimum und Maximum oder mit dem Interquartilsabstand dargestellt.

Zum Vergleich der Messwerte von mehr als zwei Gruppen wurde die Varianzanalyse nach Kruskal-Wallis und von nur zwei Gruppen der Wilcoxon-Mann-Whitney-Test angewendet. Ein $p < 0,05$ wurde als signifikant, ein $p < 0,01$ als hoch signifikant und $p < 0,001$ als höchst signifikant definiert.

Zur Darstellung von Korrelationen zwischen S1P und anderen Messwerten ist der Spearman oder Pearson Rangkorrelationskoeffizient verwendet worden.

Mit Hilfe einer linearen Regressions-Analyse wird die Korrelation zwischen S1P sowie den Entzündungsmarkern mit dem klinischen SOFA-Score beschrieben.

Die Entzündungsmarker, IL-6, CrP, PCT wurden mittels Grenzwertoptimierungskurven (ROC-Kurven) sowie den dazugehörigen Fläche unterhalb der Kurve (ROC AUC) mit S1P verglichen. Des Weiteren sind für die Entzündungsmarker jeweils die Spezifität und Sensitivität sowie der positive prädiktive und der negative prädiktive Wert berechnet.

Falls notwendig wurden die Daten logarithmiert, um eine Normalverteilung zu erzielen.

Die Überlebenswahrscheinlichkeit ist in Form einer Kaplan-Meier-Kurve dargestellt.

Sämtliche statistische Auswertung ist mit dem Programm Graphpad Prism 6.0f® (Graphpad Software®, La Jolla, CA, USA) erfolgt.

3.2.8 Ethikantrag und Einverständniserklärung

Eine Einverständniserklärung der Studienteilnehmer zur Studienteilnahme sowie zur Veröffentlichung ihrer anonymisierten Daten liegt vor. Diese ist von den Patienten oder deren bevollmächtigten Betreuern unterschrieben worden. Eine Zustimmung der Ethikkommission der Ärztekammer Hamburg im Rahmen der Deklaration von Helsinki liegt unter der Bearbeitungsnummer PV455 ebenfalls vor.

4 Ergebnisse

4.1 Kohortenbeschreibung

In die Studie sind 100 Patienten und 20 gesunde Probanden als Kontrollgruppe eingeschlossen worden. Insgesamt sind 11.706 Variablen untersucht worden, 388 (3,3%) sind aufgrund von Datenverlust sowie Entnahmefehlern nicht erhoben.

In die Gruppe A sind 40 Patienten mit der Diagnose SIRS oder Sepsis eingeschlossen worden. Bei diesen ist gemäß Studienprotokoll eine Probenentnahme an Tag 1 erfolgt. Die Gruppe B schließt 30 Patienten im Stadium einer schweren Sepsis ein. Bei 28 Patienten der Gruppe B ist an Tag 3 Blut abgenommen worden, zwei Patienten sind vor dem zweiten Abnahmezeitpunkt verlegt worden. An Tag 7 hat die Gruppe B noch aus 14 Patienten bestanden, drei Patienten sind vor der dritten Blutentnahme verstorben, 11 weitere sind vorher verlegt worden. In Gruppe C sind ebenfalls 30 Patienten eingeschlossen worden. Sie haben die Kriterien eines septischen Schocks erfüllt. Vor der Blutentnahme an Tag 3 sind zwei Patienten auf die Normalstation verlegt worden. Die dritte Blutentnahme ist in der Gruppe C bei 19 Patienten vorgenommen worden, sieben Patienten sind vorher verlegt worden, zwei sind verstorben.

Tabelle 9: Zusammenfassung der Probengewinnung aufgeteilt nach Gruppen und den jeweiligen Abnahmezeitpunkten

Einschluss von 100 Patienten						
Gruppe A [n=40]		Gruppe B [n=30]			Gruppe C [n=30]	
Tag 1 [n=40]		Tag 1 [n=30]	Tag 3 [n=28]	Tag 7 [n=14]	Tag 1 [n=30]	Tag 3 [n=28]
						Tag 7 [n=19]
Gewinnung von 189 S1P-Werten						

An Tag 28 ist ein *Follow-up* durchgeführt worden. Bei 1 % [n=1] der Patienten liegt ein *lost to Follow-up* vor.

4.2 Demographische Daten des Studienkollektivs

Tabelle 10 fasst die demographischen Basisdaten zusammen.

58% der Patienten waren Männer, 42% Frauen. Das mediane Alter betrug 60 Jahre. Die Kontrollgruppe ist hoch signifikant ($p < 0,01$) jünger als die Patientengruppe. Innerhalb der Patientengruppen gab es keine signifikanten Unterschiede. In Bezug auf Geschlecht und BMI sind keine signifikanten Unterschiede zu beobachten.

Der SAPS II Score gibt die Sepsis-Stadien mit steigenden Punktzahlen wieder. Im Median liegt der Wert in Gruppe A bei 28 Punkten, bei Gruppe B bei 34 und bei Gruppe C bei 42 Punkten.

Gastrointestinale und intraabdominelle Infektionen sind in 39% der Auslöser einer Sepsis ($n=39$, 39%), gefolgt von Infektionen des Respirationstrakts ($n=23$, 23%). Des Weiteren sind Infektionen des Urogenitaltrakts ($n=6$, 6%), Infektionen des zentralen Nervensystems ($n=5$, 5%) sowie Katheter-assoziierte-, Wund- und Haut-Infektionen ($n=5$, 5%) diagnostiziert worden. 22% ($n=22$, 22%) der Infektionen kann nicht näher beschrieben werden.

Die Aufenthaltslänge auf der Intensivstation sowie im Krankenhaus ist mit dem Schweregrad der Sepsis assoziiert. So ist die Behandlungszeit auf der Intensivstation bei der schweren Sepsis um ein vierfaches, beim septischen Schock um ein fünffaches höher als die der Gruppe A.

Die Zahl der Todesfälle steigt mit dem Schweregrad der Sepsis. An einer Sepsis/ einem SIRS sind drei Patienten verstorben, in Gruppe B und C sind hingegen je acht Patienten verstorben. Die Gesamtmortalität aller Sepsis-Stadien liegt bei 19%. Die Betrachtung der Todesfälle auf der Intensivstation zeigt eine etwa zehnfach höhere Sterberate in den beiden schweren Sepsis-Stadien im Vergleich zur Gruppe A. Die Haupttodesursache war ein sepsisbedingtes Multiorganversagen.

Tabelle 10: Überblick über die demografischen Daten und über die Daten bezüglich des Krankheitsverlaufs von der an Sepsis erkrankten Studienpopulation (Gruppe A+ B+ C) und der Kontroll-Gruppe K mit Kennzeichnung der signifikanten Unterschiede. Bei medianen Angaben mit Interquartilsabstand (IQR).

Charakteristikum	Gruppe K [n=20]	Gruppe A [n=40]	Gruppe B [n=30]	Gruppe C [n=30]	Gesamt (A,B,C) [n=100]
medianes Alter [J] (IQR)	37 (16)	59 (21) *	60 (19) *	65 (18) *	60 (19)
Geschlecht					
♂ [n] (%)	11 (55)	22 (55)	20 (67)	16 (53)	58 (58)
♀ [n] (%)	9 (45)	18 (45)	10 (33)	14 (47)	42 (42)
medianer BMI (IQR)	—	24,6 (5,2)	24,7 (7,2)	26,1 (3,7)	25,2 (5)
Aufnahmegrund					
Medizinisch [n] (%)	—	20 (50)	20 (67)	16 (53)	56 (56)
Chirurgisch [n] (%)	—	20 (50)	10 (33)	14 (47)	44 (44)
medianer SAPS II-Score (IQR)	—	28 (18)	34 (11) ×	42 (17) ^	33 (18)
Medianer ICU-Aufenthalt [d] (IQR)	—	2 (5)	8 (22) °	11 (40) °	7 (9)
medianer Krankenhausaufenthalt [d] (IQR)	—	20 (22)	17 (22)	26 (40)	21 (24)
Todesfälle [n] (%) auf ICU	—	1 (2,5)	7 (23) "	7 (23) "	15 (15)
Todesfälle [n] (%)	—	3 (7,5)	8 (27) "	8 (27) "	19 (19)

* p<0,01 vs. Kontrollgruppe

× p<0,05 vs. Kontrollgruppe

^ p<0,001 vs. Kontrollgruppe

° p<0,01 vs. Gruppe A

" p<0,05 vs. Gruppe A

Die S1P-Konzentration ist weder Alters- noch Geschlechtsabhängig.

4.3 Auswertung der primären Variable – S1P-Serum-Konzentration

Bei den ersten 30 Proben ist die S1P-Konzentration sowohl im Serum als auch im Plasma gemessen worden. Die Messwerte der Seren zeigen konstant einen etwa 2,5-fach höheren Wert als die der Plasma-Konzentrationen.

Bei Probanden ist als Referenzwert eine mittlere S1P-Konzentration von 458,8µg/l (236-830µg/l) gemessen worden. An Tag 1 zeigen die Patienten der Gruppe A und B im Vergleich dazu eine mediane Konzentration von 246,7µg/l (125-402µg/l) beziehungsweise von 234,7µg/l (96-526µg/l). Beide Gruppen liegen damit 50% unter denen der Kontrollgruppe. Eine Unterscheidung zwischen diesen beiden Gruppen ist anhand der S1P-Konzentrationen nicht möglich. In Gruppe C ist die S1P-Konzentration mit Werten von 149,7µg/l (66-250µg/l) um 70% erniedrigt.

Die S1P-Konzentrationen der Sepsis-Patienten sind höchst signifikant ($p < 0,001$) erniedrigt im Vergleich zur Kontrolle. Die S1P-Konzentrationen von Gruppe C ist im Vergleich zu Gruppe A/ B ebenfalls höchst signifikant ($p < 0,001$) erniedrigt.

Im Verlauf bleiben die S1P-Konzentrationen konstant erniedrigt. Gruppe B zeigt an Tag 3 einen medianen Wert von $210 \mu\text{g/l}$ ($83\text{-}421 \mu\text{g/l}$) und von $217 \mu\text{g/l}$ ($115\text{-}504 \mu\text{g/l}$) an Tag 7, die Streuung der Werte innerhalb der Gruppe nimmt zu. An Tag 3 ist in Gruppe C eine S1P-Konzentration von $119 \mu\text{g/l}$ ($52\text{-}320 \mu\text{g/l}$) und an Tag 7 von $133 \mu\text{g/l}$ ($55\text{-}375 \mu\text{g/l}$) gemessen worden.

In Tabelle 11 sind die S1P-Konzentrationen aller Gruppen und Tage zusammengefasst.

Tabelle 11: S1P-Konzentrationen der Gruppe A = SIRS/ Sepsis, der Gruppe B = schwere Sepsis und der Gruppe C = septischer Schock sowie der Kontrollgruppe K von Tag 1, 3 und 7 jeweils als Median und (Minimum-Maximum) angegeben.

	Gruppe K [n=20]	Gruppe A [n=40]	Gruppe B [n=30]	Gruppe C [n=30]
S1P – Tag 1 [$\mu\text{g/l}$]	458,8 (235,5-830,1)	246,7^x (124,8-402,3)	234,7^x (95,5-525,5)	149,7^{*,**,-} (65,5-250,1)
S1P – Tag 3 [$\mu\text{g/l}$]	—	—	210 (83-421)	119⁻ (52-320)
S1P – Tag 7 [$\mu\text{g/l}$]	—	—	217 (115-504)	133^o (55-375)

* $p < 0,001$ vs. Kontrollgruppe

^x $p < 0,01$ vs. Kontrollgruppe

^o $p < 0,001$ vs. Gruppe A

⁻ $p < 0,001$ vs. Gruppe B

^o $p < 0,01$ vs. Gruppe B

Abbildung 11 stellt die S1P-Konzentrationen der Patienten und Probanden als Punktediagramm dar.

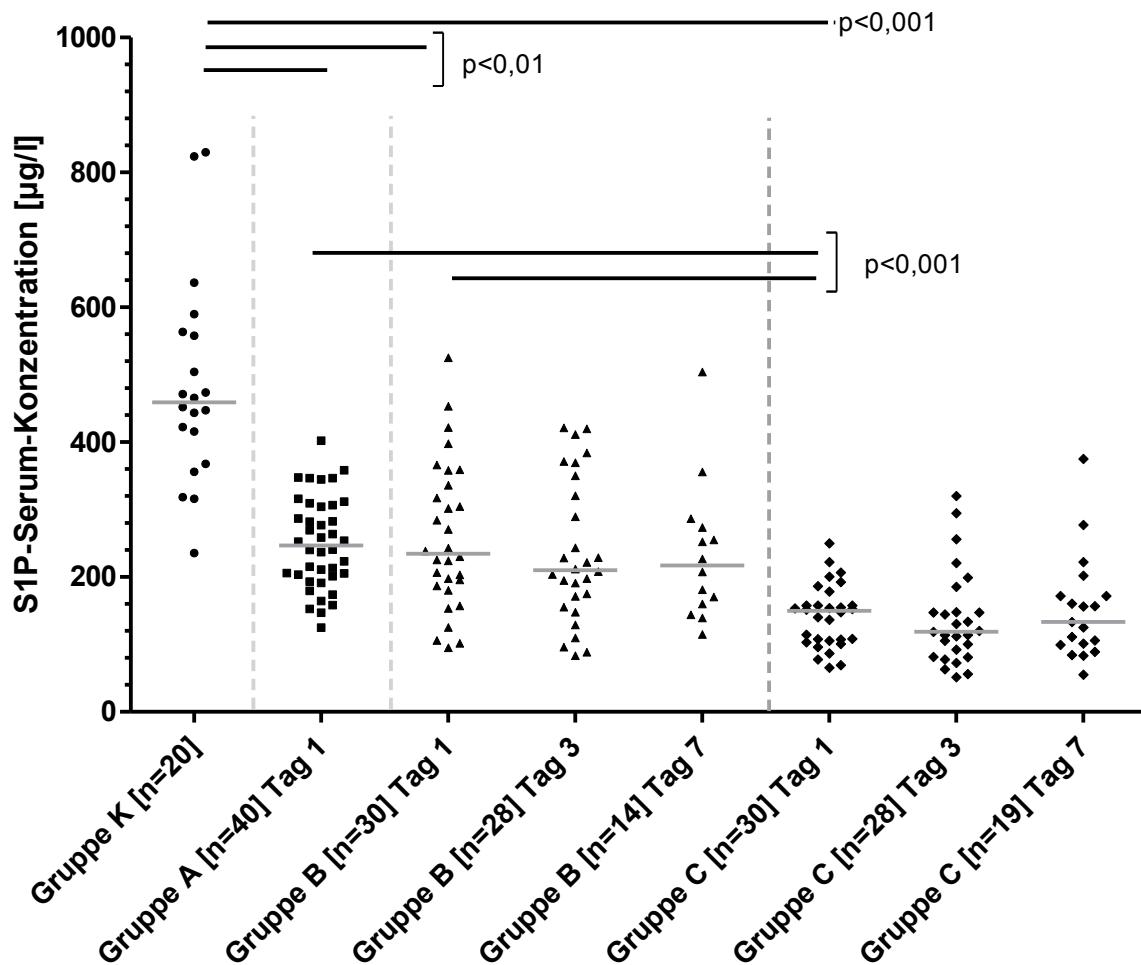


Abbildung 11: S1P-Konzentration im Serum von der Kontrollgruppe und den Gruppen der Sepsis-Stadien an Tag 1, 3 und 7. Die Balken stehen für die Mediane der Gruppen, die Symbole stehen für die einzelnen Patientendaten.

4.4 Vergleich der S1P-Konzentration mit Sekundärvariablen

In den folgenden Abschnitten wird nur Tag 1 analysiert, da sich die Messwerte für S1P an Tag 3 und 7 konstant zeigen.

4.4.1 Korrelation von S1P mit dem Lipoprotein HDL

Dieser Abschnitt beschäftigt sich mit der Korrelation zwischen S1P und dem Lipoprotein HDL. Tabelle 12 fasst die Daten zusammen.

HDL ist ein Trägerprotein für S1P. Der Vergleich der Kontrollgruppe mit den Patientengruppen A, B, C zeigt höchst signifikant ($p < 0,001$) erniedrigte HDL-Konzentrationen. In der Kontrollgruppe sind HDL-Konzentrationen im Median von 55mg/dl gemessen, in Gruppe A lag der Median bei 33mg/dl, in Gruppe B bei 23mg/dl und am niedrigsten in Gruppe C bei 14mg/dl. Damit unterscheiden sich auch die Schwerestadien SIRS/ Sepsis und septischer Schock höchst signifikant ($p < 0,001$) voneinander.

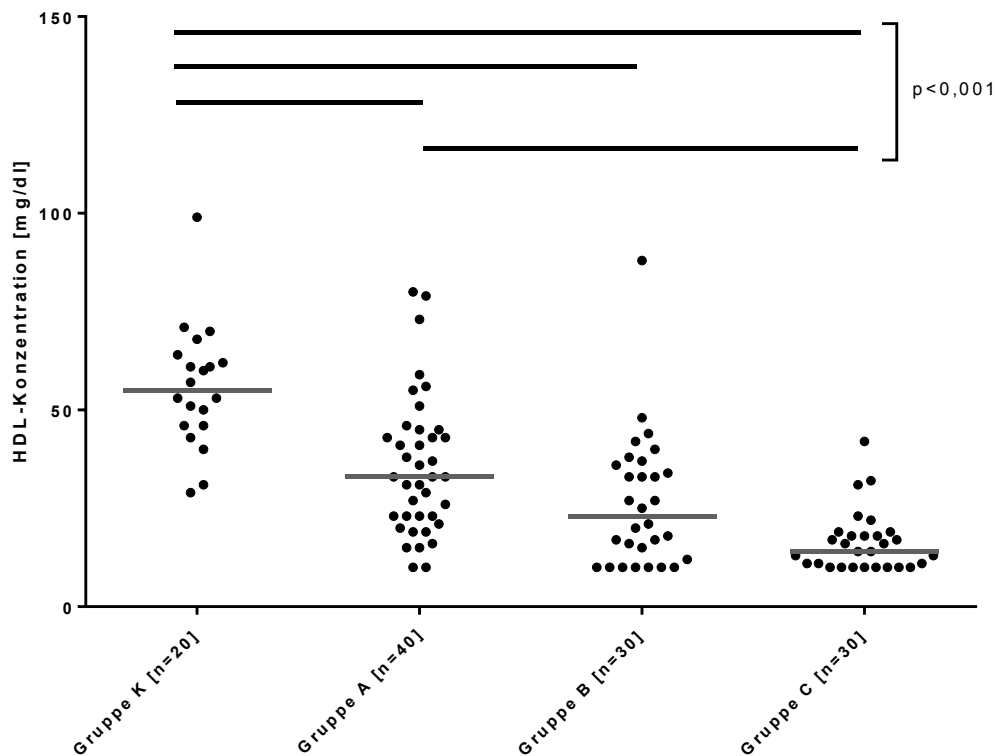


Abbildung 12: HDL-Konzentration im Plasma in der Kontrollgruppe und den Patienten an Tag 1. Die Balken stehen für die Mediane der Gruppen, die Punkte symbolisieren einzelne Patientendaten. Die hoch signifikanten ($p < 0,01$) Unterschiede sind markiert.

Tabelle 12: Messwerte an **Tag 1** der Kontroll-Gruppe K, sowie von Sepsis/ SIRS = Gruppe A, schwerer Sepsis = Gruppe B und septischem Schock = Gruppe C. Konzentration von S1P und Lipoproteinen jeweils als Median und (Minimum-Maximum). Korrelation von HDL mit der S1P-Konzentration ist mit dem Spearman-Rank angegeben.

	Gruppe K [n=20]	Gruppe A [n=40]	Gruppe B [n=30]	Gruppe C [n=30]	Korrelation mit S1P
S1P [µg/l]	458,8 (235,5-830,1)	246,7 * (124,8-402,3)	234,7 * (95,5-525,5)	149,7 *,",- (65,5-250,1)	— —
HDL [mg/dl]	55,0 (29-99)	33,0 * (<10-80)	23,0 * (<10-88)	14,0 *," (<10-42)	r=+0,40 p<0,001

* $p < 0,001$ vs. Kontrollgruppe

^x $p < 0,01$ vs. Kontrollgruppe

["] $p < 0,001$ vs. Gruppe A

⁻ $p < 0,001$ vs. Gruppe B

Mit Hilfe des Spearman Rangkorrelationskoeffizienten ist die Korrelation zwischen S1P und HDL beobachtet worden. Es zeigt sich eine stark positive und hoch signifikante Korrelation mit $r=+0,40$ und $p<0,001$ (siehe Abbildung 13).

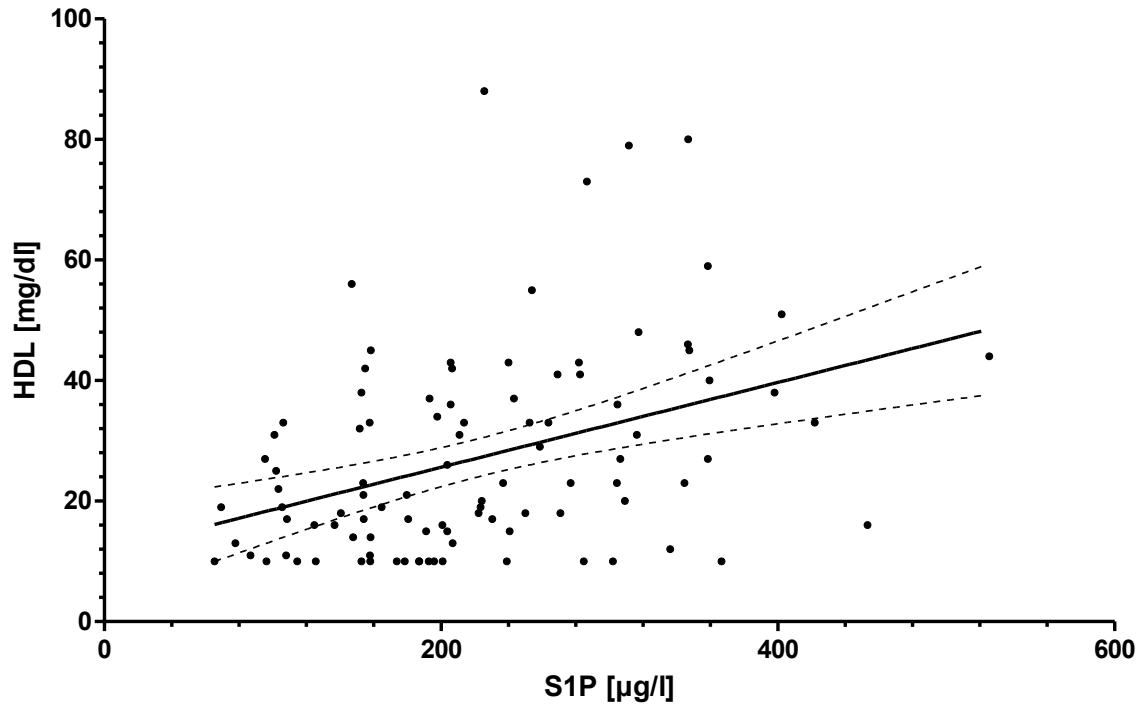


Abbildung 13: Darstellung der Korrelation von der S1P-Serum-Konzentration mit der HDL-Konzentration mit Hilfe des Spearman Rangkorrelationskoeffizienten der Patienten. Die Ausgleichsgerade und das 95%-Konfidenzintervall sind abgebildet.

4.4.2 Korrelation von S1P mit zellulären Blutbestandteilen

In Tabelle 13 werden die gemessenen Werte von Erythrozyten, Hämoglobin, Hämatokrit und Thrombozyten sowie deren Korrelation mit S1P dargestellt.

Tabelle 13: Messwerte an **Tag 1** der Kontroll-Gruppe K, sowie von Sepsis/ SIRS = Gruppe A, schwerer Sepsis = Gruppe B und septischem Schock = Gruppe C. Konzentration von S1P und zellulären Blutbestandteilen jeweils als Median und (Minimum-Maximum). Korrelation der Analyte mit der S1P-Konzentration mit dem Spearman Rank gezeigt.

	Gruppe K [n=20]	Gruppe A [n=40]	Gruppe B [n=30]	Gruppe C [n=30]	Korrelation mit S1P
S1P [µg/l]	458,8 (235,5-830,1)	246,7 ° (124,8-402,3)	234,7 ° (95,5-525,5)	149,7 *,",-' (65,5-250,1)	— —
Erythrozyten [10 ¹² /l]	4,7 (4,3-5,4)	3,6 * (2,2-4,9)	3,2 * (2,2-4,6)	3,0 *,^ (2,3-4,4)	r=+0,28 p<0,01
Hämoglobin [g/dl]	15 (13-16,5)	10,6 * (7,1-14,0)	9,6 * (6,3-15,2)	9,3 *,^ (6,3-12,3)	r=+0,27 p<0,01
Hämatokrit [%]	43,9 (39,5-49,6)	32,3 * (20,0-40,4)	29,9 * (19,3-46,5)	27,7 * (18,9-36,0)	r=+0,26 p<0,01
Thrombozyten [10 ⁹ /l]	223,5 (162-302)	211,0 (65-567)	250,0 (45-812)	159,9 (24-1124)	r=+0,29 p<0,01

* p<0,001 vs. Kontrollgruppe

° p<0,01 vs. Kontrollgruppe

" p<0,001 vs. Gruppe A

^ p<0,05 vs. Gruppe A

- p<0,001 vs. Gruppe B

4.4.2.1 Erythrozyten, Hämoglobin und Hämatokrit

Die Zahl der Erythrozyten sind im Vergleich zur Kontrollgruppe in allen Patientengruppen höchst signifikant ($p < 0,001$) erniedrigt. Die Erythrozytenzahl nimmt mit dem Schweregrad der Sepsis ab. Abbildung 14 stellt diesen Zusammenhang graphisch dar.

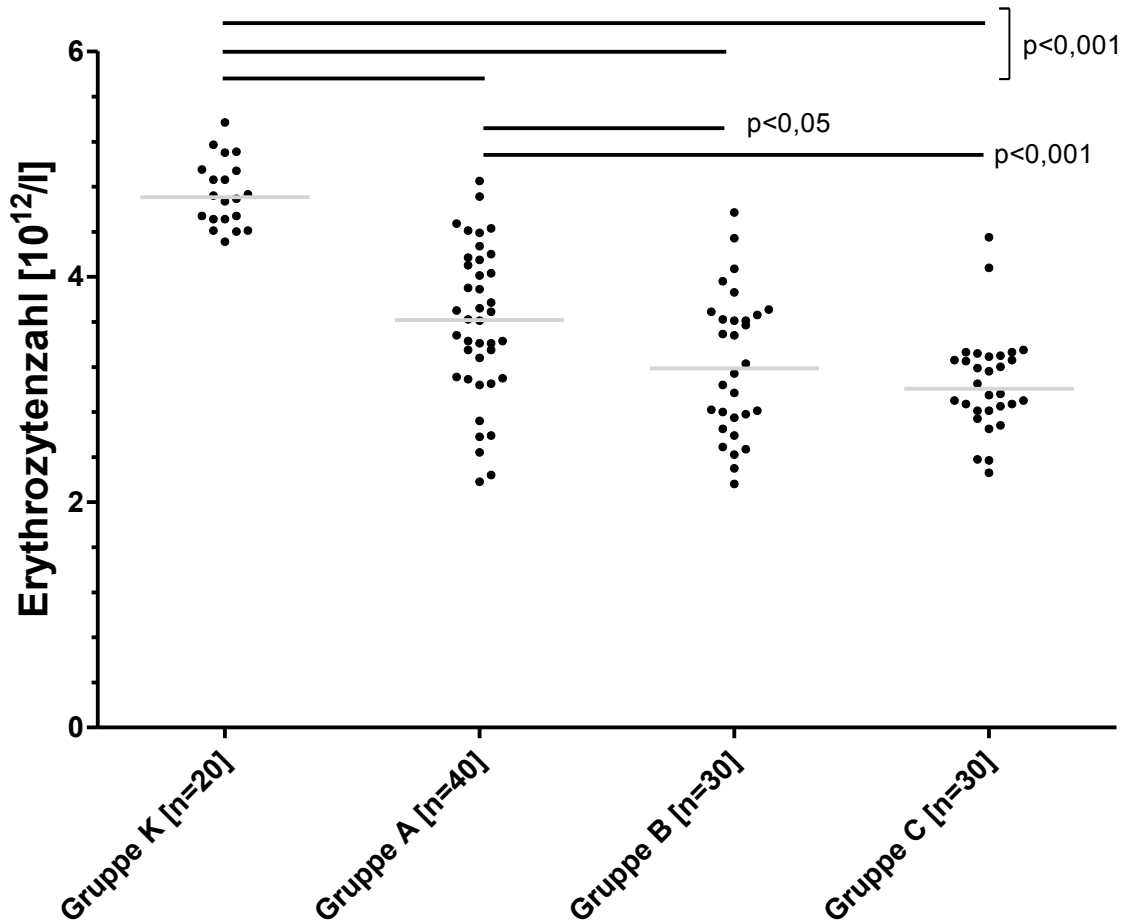


Abbildung 14: Erythrozytenzahl von der Kontrollgruppe und den Gruppen der Sepsisstadien an Tag 1. Die Balken stehen für die Mediane der Gruppen, die Punkte symbolisieren einzelne Patientendaten. Die hoch signifikanten ($p < 0,01$) Unterschiede sind vermerkt.

Mit steigendem Schweregrad der Sepsis sinken auch die Hämoglobin- und Hämatokritkonzentrationen. Somit sind diese in der Kontrollgruppe höchst signifikant ($p < 0,001$) höher. Gruppe C weist signifikant ($p < 0,05$) niedrigere Werte als Gruppe A auf.

Bei Betrachtung des Spearman Rangkorrelationskoeffizienten zeigt sich eine Korrelation zwischen der Erythrozyten- und der S1P-Konzentration mit $r=+0,28$ und $p<0,01$, die in Abbildung 15 dargestellt ist.

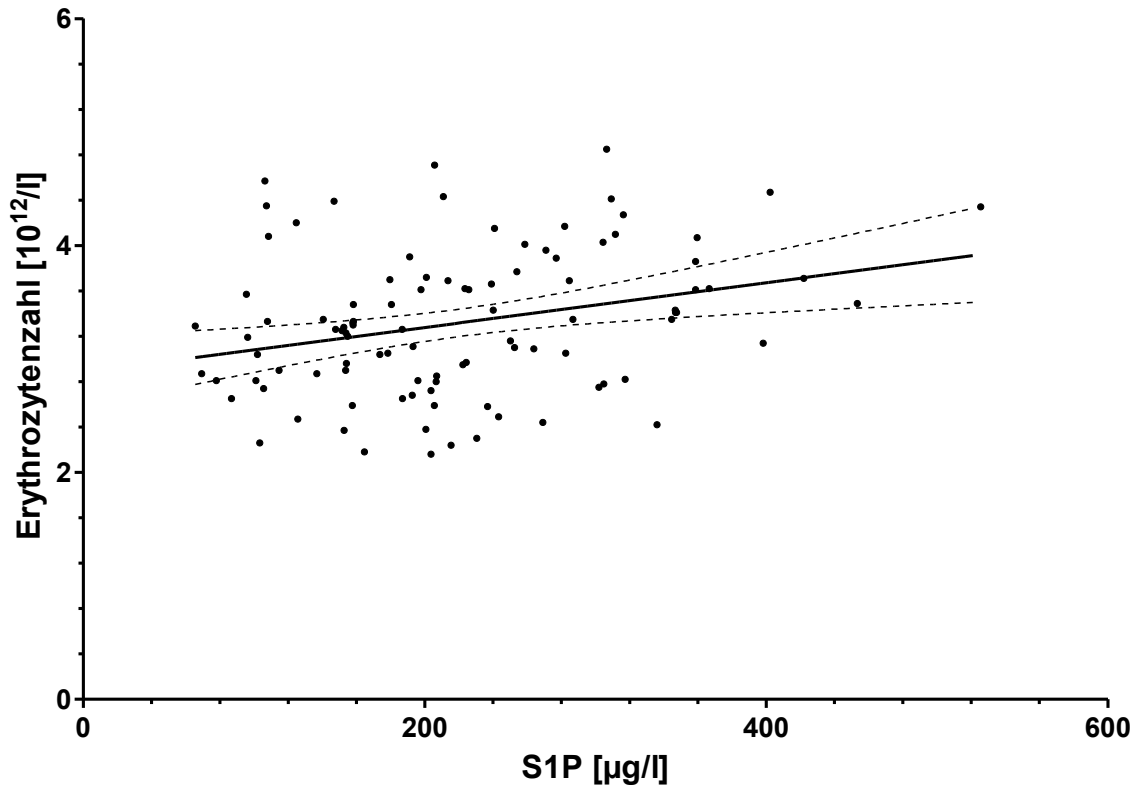


Abbildung 15: Darstellung der Korrelation von der S1P-Serum-Konzentration mit der Erythrozytenzahl mit Hilfe des Spearman Rangkorrelationskoeffizienten der Patienten. Die Ausgleichsgerade und das 95%-Konfidenzintervall sind abgebildet.

Die Korrelationsberechnung von S1P und Hämoglobin ergibt $r=+0,27$ und $p<0,01$, mit dem Hämatokrit $r=+0,26$ und $p<0,01$.

4.4.2.2 Thrombozyten

Ein Zusammenhang zwischen der Thrombozytenzahl, einem S1P-Speicher, und dem Sepsis-Schweregrad ist nicht erkennbar. Der Median liegt in der Kontrollgruppe bei $224 \times 10^9/l$, bei der SIRS/Sepsis-Gruppe bei $211 \times 10^9/l$, in der schweren Sepsis-Gruppe bei $250 \times 10^9/l$ und in der Gruppe mit septischem Schock bei $160 \times 10^9/l$. Bei Betrachtung des Zusammenhangs von S1P und den Thrombozyten mit Hilfe des Spearman Rangkorrelationskoeffizienten ist hingegen eine positive und hoch signifikante Korrelation festzustellen ($r=+0,29$, $p<0,01$).

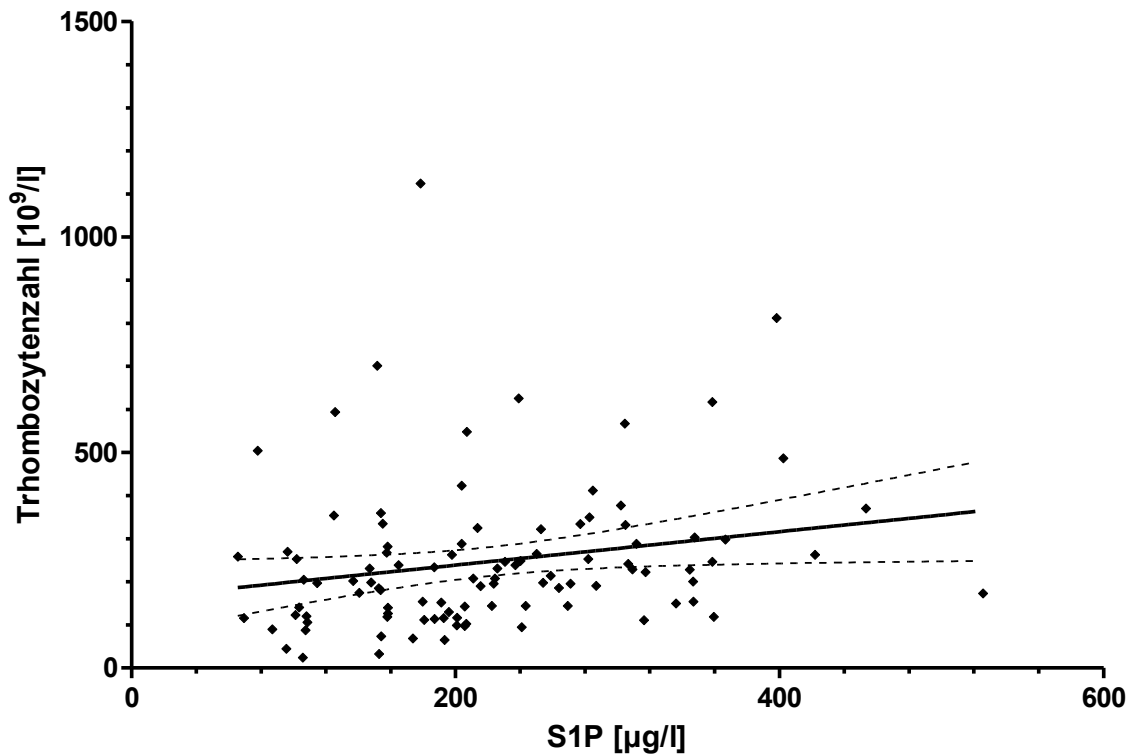


Abbildung 16: Darstellung der Korrelation von der S1P-Serum-Konzentration mit der Thrombozytenzahl mit Hilfe des Spearman Rangkorrelationskoeffizienten der Patienten. Die Ausgleichsgerade und das 95%-Konfidenzintervall sind abgebildet.

4.4.3 Korrelation von S1P mit Albumin

Das in der Leber produzierte Albumin wurde gemessen, da es als mögliches Transportprotein von S1P gilt.

Mit dem Schweregrad der Erkrankung sinken die Albumin-Konzentrationen (siehe Tabelle 14). Die Kontrollgruppe zeigt etwa doppelt so hohe Werte wie die Patientengruppen. Der Median der Kontrolle unterscheidet sich jeweils höchst signifikant ($p < 0,001$) von dem der drei Sepsis-Stadien. Die Patienten mit septischem Schock zeigen mit einem Median von 16 g/l außerdem hoch signifikant ($p < 0,01$) niedrigere Werte als die der Gruppe A.

Ergebnisse

Tabelle 14: Messwerte an **Tag 1** der Kontroll-Gruppe K, sowie von Sepsis/ SIRS = Gruppe A, schwerer Sepsis = Gruppe B und septischem Schock = Gruppe C. Konzentration von S1P mit Albumin als Median und (Minimum-Maximum). Korrelation der Analyte mit der S1P-Konzentration ist mit dem Spearman Rank angegeben.

	Gruppe K [n=20]	Gruppe A [n=40]	Gruppe B [n=30]	Gruppe C [n=30]	Korrelation mit S1P
S1P [µg/l]	458,8 (235,5-830,1)	246,7^x (124,8-402,3)	234,7^x (95,5-525,5)	149,7^{*,",-} (65,5-250,1)	— —
Albumin [g/l]	42,0 (39,0-47,0)	22,0[*] (12,0-36,0)	20,0[*] (10,0-34,0)	16,0^{*,°} (10,0-37,0)	r=+0,32 p<0,01

* p<0,001 vs. Kontrollgruppe

^x p<0,01 vs. Kontrollgruppe

["] p<0,001 vs. Gruppe A

[°] p<0,01 vs. Gruppe A

⁻ p<0,001 vs. Gruppe B

Zwischen Albumin und der S1P-Konzentration gibt es eine positive Korrelation (s. Abbildung 17).

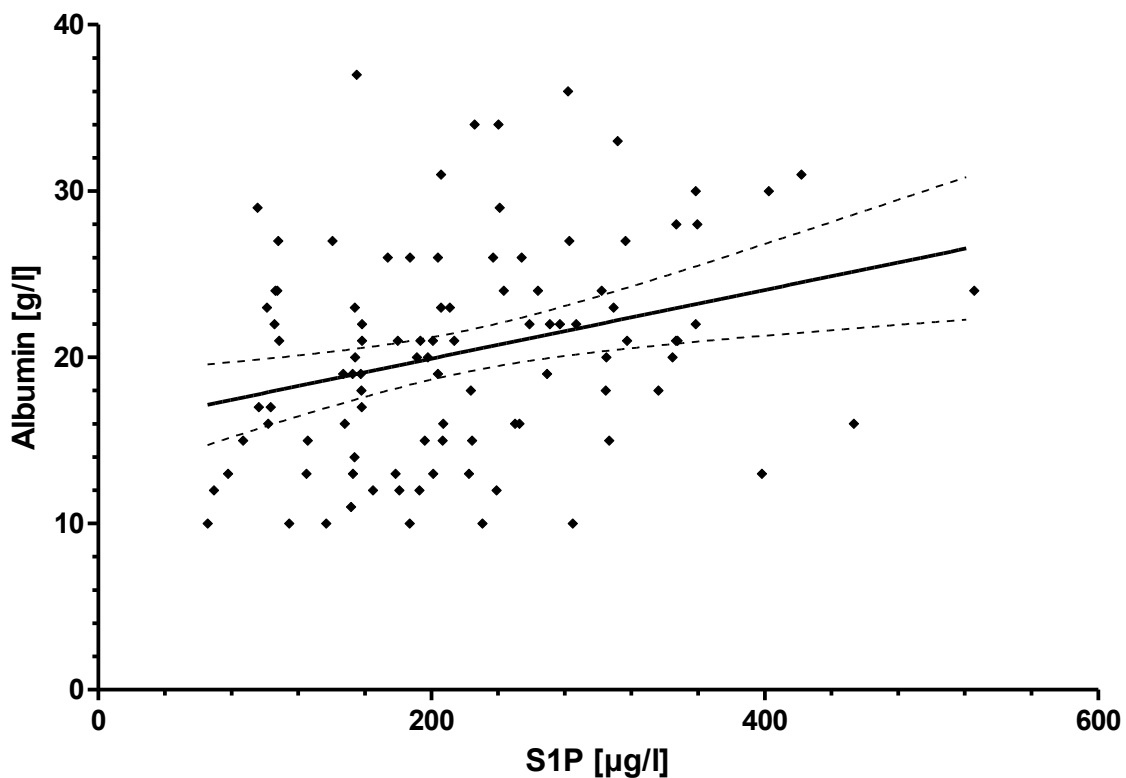


Abbildung 17: Darstellung der Korrelation von der S1P-Serum-Konzentration mit der Albumin-Konzentration mit Hilfe des Spearman Rangkorrelationskoeffizienten der Patienten. Die Ausgleichsgerade und das 95%-Konfidenzintervall sind abgebildet.

4.4.4 Korrelation von S1P mit Nierenfunktionsparametern

Zur Quantifizierung der Nierenfunktion ist der Kreatinin-Wert bestimmt worden. Alle Daten hierzu finden sich in Tabelle 15.

Mit steigendem Schweregrad der Erkrankung sind die Kreatinin-Werte erhöht mit medianen Werten von 0,88mg/dl in der Kontrollgruppe, 0,94mg/dl in Gruppe A, 1,26mg/dl in der Gruppe mit schwerer Sepsis und 1,32mg/dl bei der septischer Schock-Gruppe.

Tabelle 15: Messwerte an **Tag 1** der Kontroll-Gruppe K, sowie von Sepsis/ SIRS = Gruppe A, schwerer Sepsis = Gruppe B und septischem Schock = Gruppe C. Konzentration von S1P und den Nierenfunktions-Parametern jeweils als Median und (Minimum-Maximum). Korrelation der Analyte mit der S1P-Konzentration ist mit dem Spearman Rank angegeben.

	Gruppe K [n=20]	Gruppe A [n=40]	Gruppe B [n=30]	Gruppe C [n=30]	Korrelation mit S1P
S1P [µg/l]	458,8 (235,5-830,1)	246,7^x (124,8-402,3)	234,7^x (95,5-525,5)	149,7^{*,'',-} (65,5-250,1)	— —
Kreatin [mg/dl]	0,88 (0,7-1,09)	0,94 (0,37-6,67)	1,26 (0,28-3,85)	1,32^{°,'} (0,47-5,04)	r=-0,25 p<0,05

* p<0,001 vs. Kontrollgruppe

^x p<0,01 vs. Kontrollgruppe

['] p<0,05 vs. Kontrollgruppe

^{''} p<0,001 vs. Gruppe A

[°] p<0,05 vs. Gruppe A

⁻ p<0,001 vs. Gruppe B

Im Spearman Rangkorrelationskoeffizient zeigt sich des Weiteren eine signifikante negative Korrelation von S1P mit Kreatinin mit r=-0,25 und p<0,05. Abbildung 18 stellt das dazugehörige Diagramm dar.

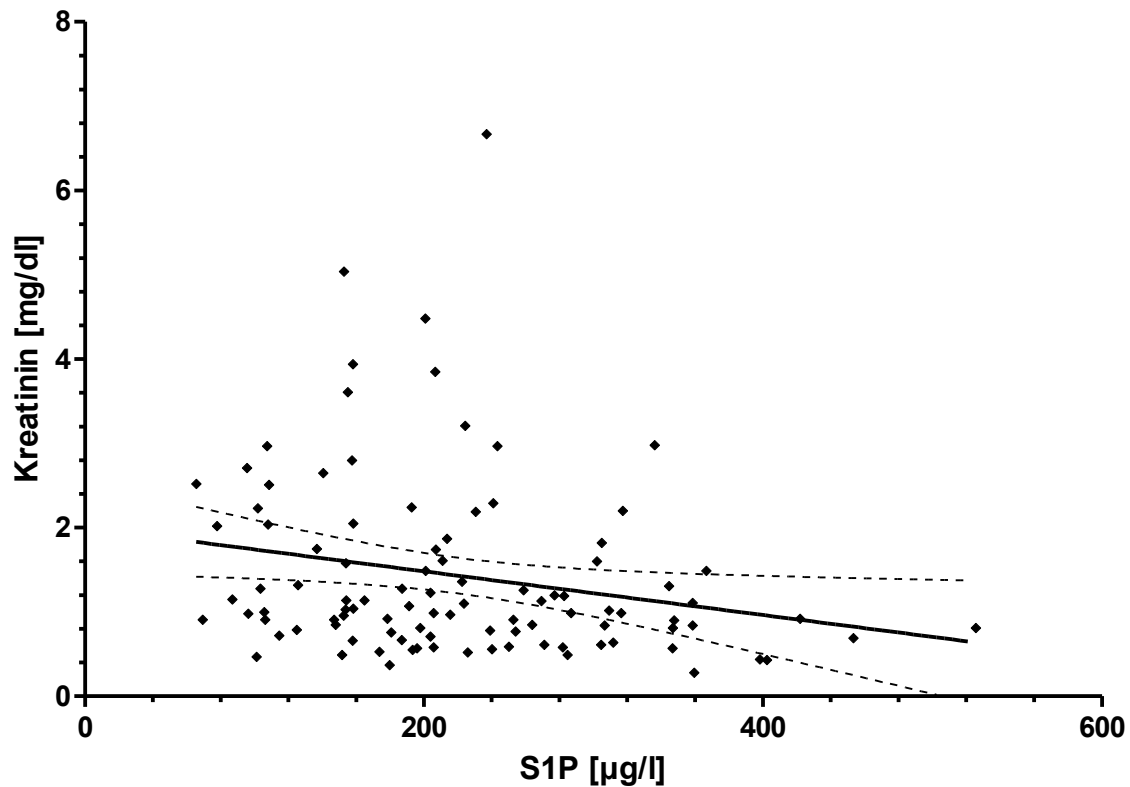


Abbildung 18: Darstellung der Korrelation von der S1P-Serum-Konzentration mit der Kreatinin-Konzentration mit Hilfe des Spearman Rangkorrelationskoeffizienten der Patienten. Die Ausgleichsgerade und das 95%-Konfidenzintervall sind abgebildet.

4.4.5 Korrelation von S1P mit dem Sepsis-related Organ Failure Assessment

Zur Einschätzung des klinischen Schweregrades dient der SOFA-Score. An Tag 1 erzielt die Gruppe C mit einem medianen Wert von 9 einen höchst signifikant ($p < 0,001$) höheren Wert als die Gruppe B mit 5 und die Gruppe A mit einer Punktzahl von 4 (siehe Tabelle 16).

Im Verlauf der Erkrankung persistieren die SOFA-Scores der Gruppe B und C auf konstant höherem Niveau als die der Gruppe A. Die Patienten mit septischem Schock zeigen im Verlauf des Beobachtungszeitraums einen Rückgang der medianen SOFA-Score-Werte, bleiben aber über den Punktzahlen der Gruppe A und B. Abbildung 19 stellt die Werte in Form eines Balkendiagramms dar.

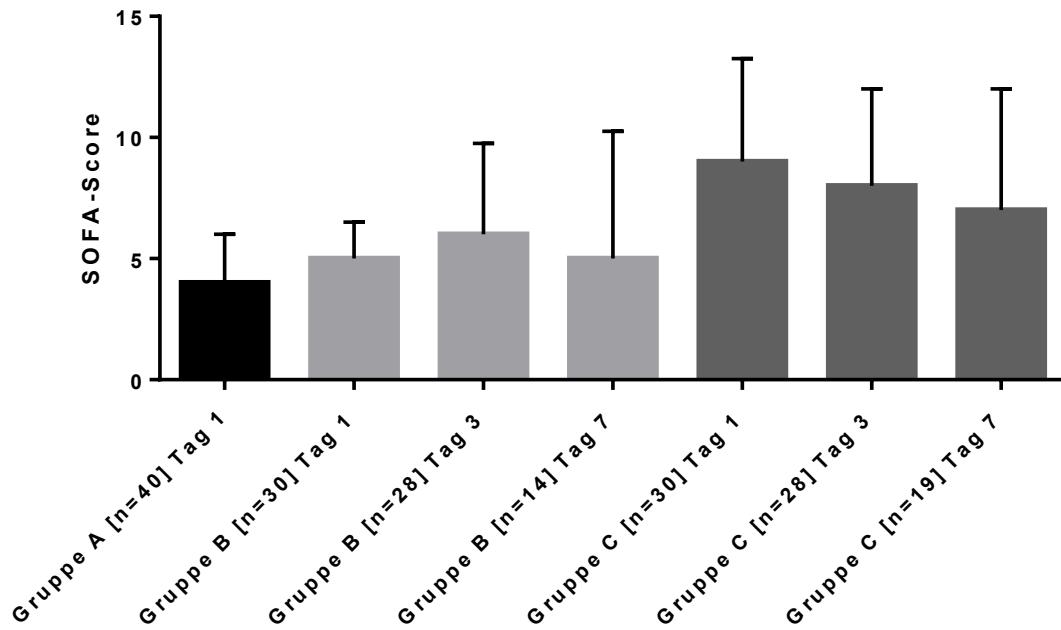


Abbildung 19: Darstellung der SOFA-Score-Werte der drei Schweregrad-Gruppen über den Beobachtungszeitraum von 7 Tagen. Die medianen Werte mit den Interquartilsabstand werden gezeigt.

Der Spearman Rangkorrelationskoeffizient zeigt eine höchst signifikante ($p < 0,001$) negative ($r = -0,51$) Korrelation zwischen der S1P-Konzentration und dem SOFA-Score.

Tabelle 16: Messwerte an **Tag 1** der Kontroll-Gruppe K, sowie von Sepsis/ SIRS = Gruppe A, schwerer Sepsis = Gruppe B und septischem Schock = Gruppe C. Konzentration von S1P und dem SOFA-Score jeweils als Median und (Minimum-Maximum). Korrelation der Analyte mit der S1P-Konzentration mit dem Spearman-Rangkoeffizienten angegeben.

	Gruppe K [n=20]	Gruppe A [n=40]	Gruppe B [n=30]	Gruppe C [n=30]	Korrelation mit S1P
S1P [µg/l]	458,8 (235,5-830,1)	246,7^x (124,8-402,3)	234,7^x (95,5-525,5)	149,7^{*,",-} (65,5-250,1)	— —
SOFA-Score	—	4 (0-9)	5 (2-13)	9^{",-} (5-19)	$r = -0,51$ $p < 0,001$

* $p < 0,001$ vs. Kontrollgruppe

^x $p < 0,01$ vs. Kontrollgruppe

["] $p < 0,001$ vs. Gruppe A

⁻ $p < 0,001$ vs. Gruppe B

Mit Hilfe einer linearen Regression (Abbildung 20) ist die Korrelation zwischen S1P und dem klinischen Verlaufsscore der Sepsis, dem SOFA-Score, an Tag 1 gezeigt. Es zeigt sich eine hoch signifikante ($p < 0,01$) negative Korrelation mit dem Wert $r^2 = 0,21$. Somit fallen die Punktzahlen des SOFA-Scores umso höher aus je geringer die S1P-Konzentrationen sind.

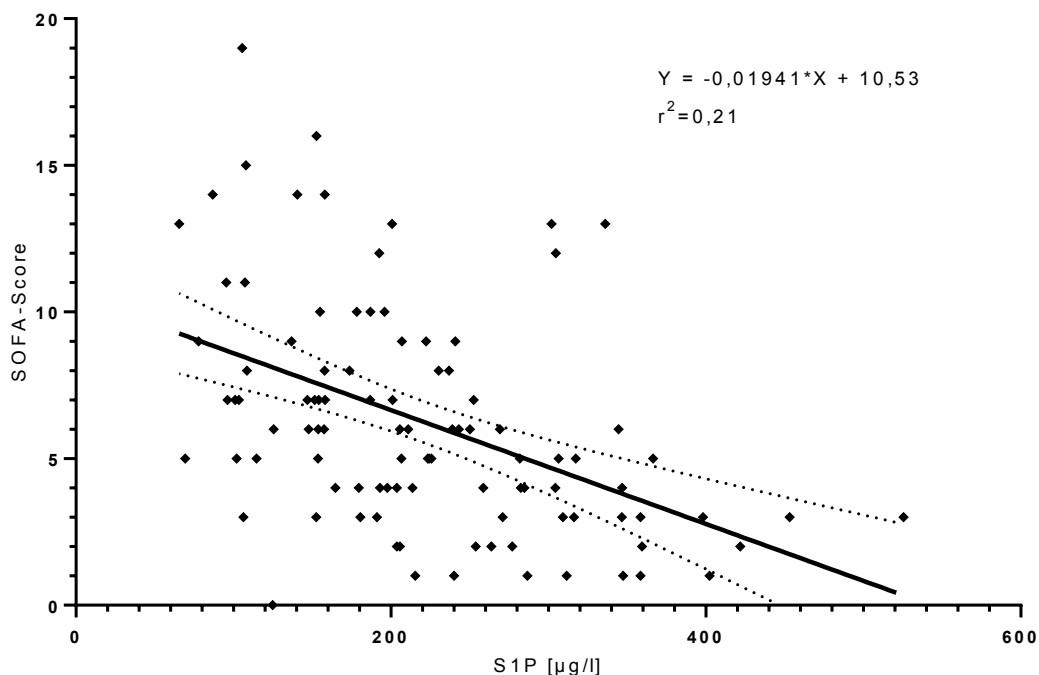


Abbildung 20: Lineare Regression von der S1P-Konzentration im Serum [µg/l] und dem SOFA-Score. Die Ausgleichsgerade und das 95%-Konfidenzintervall sind dargestellt. Die Punkte stehen jeweils für den SOFA-Score in Assoziation mit der S1P-Konzentration von den einzelnen Patienten an Tag 1.

4.4.6 Korrelation von S1P mit inflammatorischen Markern

S1P ist mit den klinisch relevanten Entzündungsmarkern CrP, PCT, IL-6 und Laktat verglichen worden. Eine Zusammenfassung aller Werte ist in Tabelle 17 zu finden.

Mit medianen CrP-Werten von 92,5mg/l in Gruppe A, 152,5mg/l in Gruppe B und 193,5mg/l in Gruppe C wies der Entzündungsmarker CrP lediglich einen signifikanten ($p < 0,05$) Unterschied zwischen der Gruppe C und den Gruppen A und B auf.

Die medianen Laktat-Werte liegen bei 1,3mmol/l in der Gruppe A, in Gruppe B bei 1,3mmol/l und bei 1,6mmol/l in Gruppe C. Die Gruppe des septischen Schocks unterscheidet sich diesbezüglich signifikant ($p < 0,05$) von den beiden anderen Gruppen.

Die PCT- und IL-6-Werte der Gruppe C differieren jeweils hoch signifikant ($p < 0,01$) zu Gruppe A und signifikant ($p < 0,05$) zu Gruppe B. Der Median für PCT steigt zwischen den Gruppen von 0,39µg/l (Gruppe A) auf 0,92µg/l (Gruppe B) und auf 1,87µg/l (Gruppe C). Für IL-6 sind ebenfalls mit dem Schweregrad steigende mediane Werte von 100ng/l in Gruppe A, 123ng/l in Gruppe B und von 340ng/l in Gruppe C gemessen worden. Auffallend sind die

immensen Streuungsbreiten bei IL-6 zwischen 2,5ng/l und 19424ng/l und bei PCT von 0,03µg/l bis 224µg/l.

Tabelle 17: Messwerte an **Tag 1** der Kontroll-Gruppe K, sowie von Sepsis/ SIRS = Gruppe A, schwerer Sepsis = Gruppe B und septischem Schock = Gruppe C. Konzentration von S1P und Entzündungsmarkern jeweils als Median und (Minimum-Maximum). Korrelation der Analyte mit der S1P-Konzentration mit dem Spearmann-Rank gezeigt.

	Gruppe K [n=20]	Gruppe A [n=40]	Gruppe B [n=30]	Gruppe C [n=30]	Korrelation mit S1P
S1P [µg/l]	458,8 (235,5-830,1)	246,7 ° (124,8-402,3)	234,7 ° (95,5-525,5)	149,7 *,",- (65,5-250,1)	— —
PCT [µg/l]	—	0,39 (0,03-34,2)	0,92 (0,07-13,6)	1,87 ",^ (0,09-224)	r=-0,52 p<0,01
IL-6 [ng/l]	—	100,1 (2,5-5699)	123,4 (6-28353)	339,7 ',^ (18,5-19424)	r=-0,39 p<0,01
CrP [mg/l]	—	92,5 (<5-336)	152,5 (<5-280)	193,5 × (24-395)	r=-0,28 p<0,01
Laktat max. [mmol/l]	—	1,3 (0,4-2,9)	1,3 (0,6-3,4)	1,6 ×,^ (0,7-8,5)	r=-0,24 p<0,05

* p<0,001 vs. Kontrollgruppe

° p<0,01 vs. Kontrollgruppe

" p<0,001 vs. Gruppe A

' p<0,01 vs. Gruppe A

× p<0,05 vs. Gruppe A

- p<0,001 vs. Gruppe

^ p<0,05 vs. Gruppe B

Der Vergleich der vier Entzündungsmarker mit S1P zeigt für alle eine signifikante negative Korrelation mit der S1P-Konzentration. Der Spearman Rangkorrelationskoeffizient bestätigt dies für PCT mit r=-0,52 und p<0,01, für IL-6 mit r=-0,39 und p<0,01, für CrP mit r=-0,28 und p<0,01 sowie für Laktat mit r=-0,24 und p<0,05.

4.4.6.1 Sensitivität und Spezifität der inflammatorischen Marker

Die Aussagekraft der S1P-Konzentration liegt in Bezug auf das Erkennen einer Sepsis bei einer Sensitivität von 87,0% und bei einer Spezifität von 85,9%. Der *Cut-Off*-Wert, ab dem eine Erkrankung als wahrscheinlich anzunehmen ist, liegt bei 340µg/l. Für die Sepsis besteht in etwa eine Lebenszeitprävalenz von 2%. Anhand dieser Annahme wurde der negative prädiktive Wert der S1P-Bestimmung von 99,7% errechnet.

Weiterhin ist die S1P-Konzentration als Marker für das Vorliegen eines septischen Schocks geprüft worden. Mit einem *Cut-Off*-Wert von <186,9µg/l zeigt S1P als Marker eine Sensitivität

von 83,3% sowie eine Spezifität von 80,0%. Die Berechnung des negativen prädiktiven Werts hat 91,8% ergeben. Der positive prädiktive Wert liegt bei 64,4%. Tabelle 18 ist zu entnehmen, dass S1P hinsichtlich der Prädiktion eines septischen Schocks damit weit höhere Werte als die anderen Entzündungsmarker erzielt.

In aktueller Literatur wird darüber hinaus HDL als potentieller Sepsis-Marker gehandelt. Bei einem *Cut-Off-Wert* von 19,5mg/dl zeigt HDL ebenfalls bessere Werte als die etablierten Entzündungsmarker. Vor allem die Spezifität mit 71,0% und der positive prädiktive Wert mit 55,0% sind dennoch geringer als die von S1P.

Tabelle 18: Berechnung der Sensitivität, Spezifität, des negativen prädiktiven Werts und des positiven prädiktiven Werts für die Güte der Entzündungsmarker im Bezug auf das Vorhandensein eines **septischen Schocks**. Die *Cut-Off-Werte* sind aus der ROC AUC berechnet.

	Cut-off-Wert	Sensitivität [%]	Spezifität [%]	negativer prädiktiver Wert [%]	positiver prädiktiver Wert [%]
Sphingosine-1-Phosphat (S1P)	<186,9 [µg/l]	83,3	80,0	91,8	64,4
Procalcitonin (PCT)	>1,55 [µg/l]	70,0	71,6	84,8	51,4
Interleukin-6 (IL-6)	>180,0 [ng/l]	66,7	68,7	82,8	47,7
C-reaktives Protein (CrP)	>145,0 [mg/l]	56,7	61,4	76,8	38,6
Laktat	>1,55 [mmol/l]	58,6	65,2	78,6	41,9
HDL	<19,5 [mg/dl]	82,8	71,0	90,6	55,0

Mit Hilfe der Grenzwertoptimierungskurven (ROC) sind diese Ergebnisse nochmals dargestellt. Auch hier zeigt sich S1P mit einer AUC von 0,88 (95% Konfidenzintervall, 0.82–0.95) als zuverlässiger Prädiktor für einen septischen Schock (siehe Abbildung 21). Im Vergleich dazu liegt die AUC der ROC bei PCT bei 0.75 (95%-Konfidenzintervall, 0.64–0.85), von IL-6 bei 0.71 (95%-Konfidenzintervall, 0.60–0.83), bei Laktat bei 0.69 (95%-Konfidenzintervall, 0.58–0.81) und von CrP bei 0.67 (95%-Konfidenzintervall, 0.55–0.78). HDL weist mit Werten der AUC von 0,79 (95%-Konfidenzintervall, 0,70-0,88) auch bei diesem Test einen besseren Wert als die anderen Entzündungsmarker auf, aber einen deutlich geringeren als S1P. Abbildung 22 stellt die ROC's der etablierten Entzündungsmarker dar.

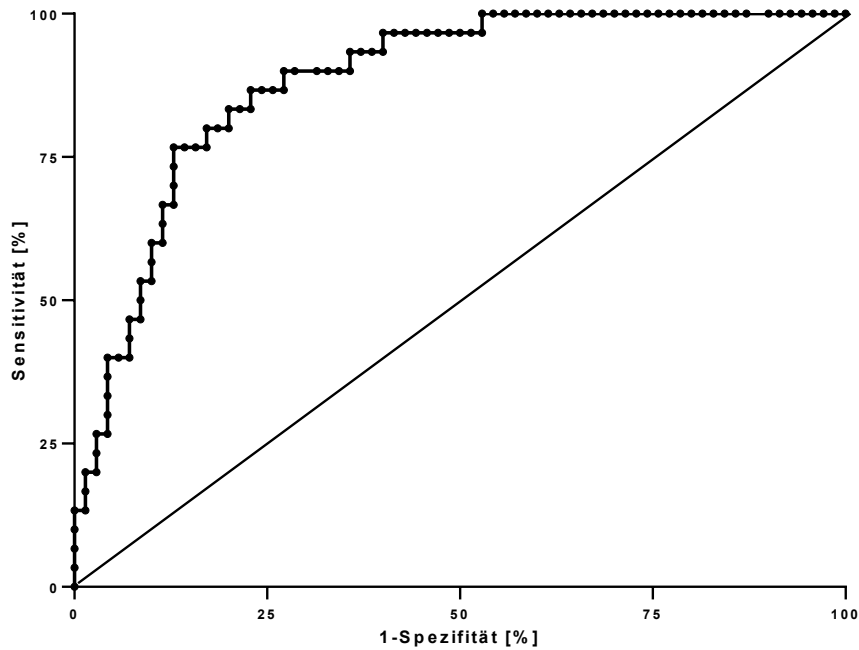


Abbildung 21: Grenzwertoptimierungskurve (ROC) von S1P in Bezug auf das Vorliegen eines septischen Schocks. AUC von 0,88 (95% Konfidenzintervall, 0,82–0,95).

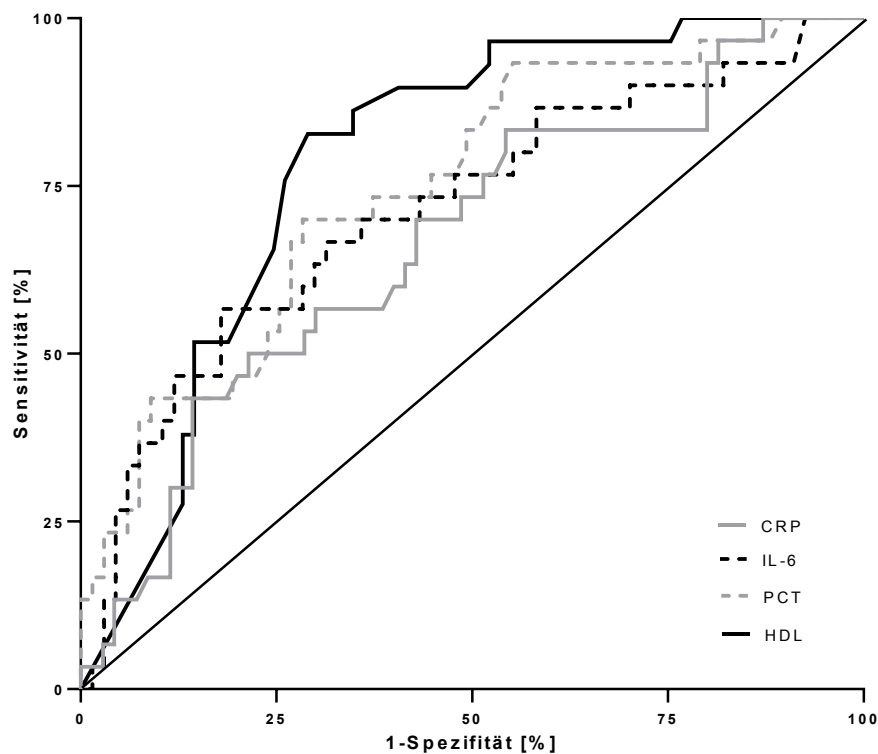


Abbildung 22: Grenzwertoptimierungskurven (ROC) der etablierten Entzündungsmarker PCT, IL-6 und CrP sowie von HDL in Bezug auf das Vorliegen eines septischen Schocks. AUC von PCT 0,75 (95%-Konfidenzintervall, 0,64–0,85), von IL-6 0,71 (95%-Konfidenzintervall, 0,60–0,83), von CrP 0,67 (95%-Konfidenzintervall, 0,55–0,78) und von HDL 0,79 (95%-Konfidenzintervall, 0,70–0,88).

4.4.7 Korrelation von S1P und Mortalitätsraten

In diesem Abschnitt werden die Mortalitätsraten in den drei Patientengruppen betrachtet. In Gruppe A versterben signifikant weniger Patienten. Vergleicht man die Tage bis zum Versterben mit den an Tag 1 gemessenen S1P-Konzentrationen ergibt sich eine positive, nicht signifikante Korrelation im Spearman-Rank-Test.

Tabelle 19: Messwerte der Kontroll-Gruppe K, sowie von Sepsis/ SIRS = Gruppe A, schwerer Sepsis = Gruppe B und septischem Schock = Gruppe C. Konzentration von S1P als Median und Minimum-Maximum (...) und die Mortalitätsraten als Anzahl und Prozentsatz mit den Signifikanzniveaus angegeben. Korrelation der Analyte mit der S1P-Konzentration gezeigt.

	Gruppe K [n=20]	Gruppe A [n=40]	Gruppe B [n=30]	Gruppe C [n=30]	Korrelation Überleben [d] mit S1P
S1P [µg/l]	458,8 (235,5-830,1)	246,7^x (124,8-402,3)	234,7^x (95,5-525,5)	149,7^{*,",-"} (65,5-250,1)	—
Todesfälle [n] (%)	—	3 (7,5)	8 (27)[^]	8 (27)[^]	r=+0,14

* p<0,001 vs. Kontrollgruppe

^x p<0,01 vs. Kontrollgruppe

["] p<0,001 vs. Gruppe A

⁻ p<0,001 vs. Gruppe B

[^] p<0,05 vs. Gruppe A

4.4.7.1 Kaplan-Meier-Kurve

Im vorangegangenen Abschnitt (4.4.6.1) wurden *Cut-Off*-Werte für das Vorliegen einer Sepsis beziehungsweise eines Septischen Schocks anhand der S1P-Konzentrationen mit Hilfe der ROC-Analyse errechnet. Die Patienten wurden dann anhand ihrer S1P-Konzentrationen an Tag 1 in drei neue Gruppen unterteilt. Die erste Gruppe beinhaltet alle Patienten, die einen S1P-Wert von >340µg/l aufwiesen, bei denen laut den *Cut-Off*-Werten nicht von einer Sepsis auszugehen ist. In der zweiten Gruppe (S1P= 340-188µg/l) sind somit Patienten mit einer Sepsis vertreten, die aber den *Cut-Off*-Werten nach zu urteilen keinen septischen Schock zeigen. In die letzte Gruppe sind mit S1P-Konzentrationen von <188µg/l Patienten mit vermutetem Septischen Schock eingeschlossen. Mit Hilfe einer Kaplan-Meier-Kurve wurde hieraus das prozentuale Überleben der Patienten untersucht.

In Gruppe 1 versterben etwa 8%, in Gruppe 2 12% und in Gruppe 3 etwa 23% der Patienten. Somit steigen die Sterberaten im Vergleich zwischen den Gruppen jeweils um etwa 40% an.

Die Kaplan-Meier-Kurven zeigen keinen signifikanten Unterschied im Bezug auf die Überlebenschancen. Tendenziell ist dennoch von einer geringeren

Überlebenswahrscheinlichkeit bei niedrigeren S1P-Konzentrationen auszugehen. Die Kaplan-Meier-Kurve hierzu ist in Abbildung 23 dargestellt.

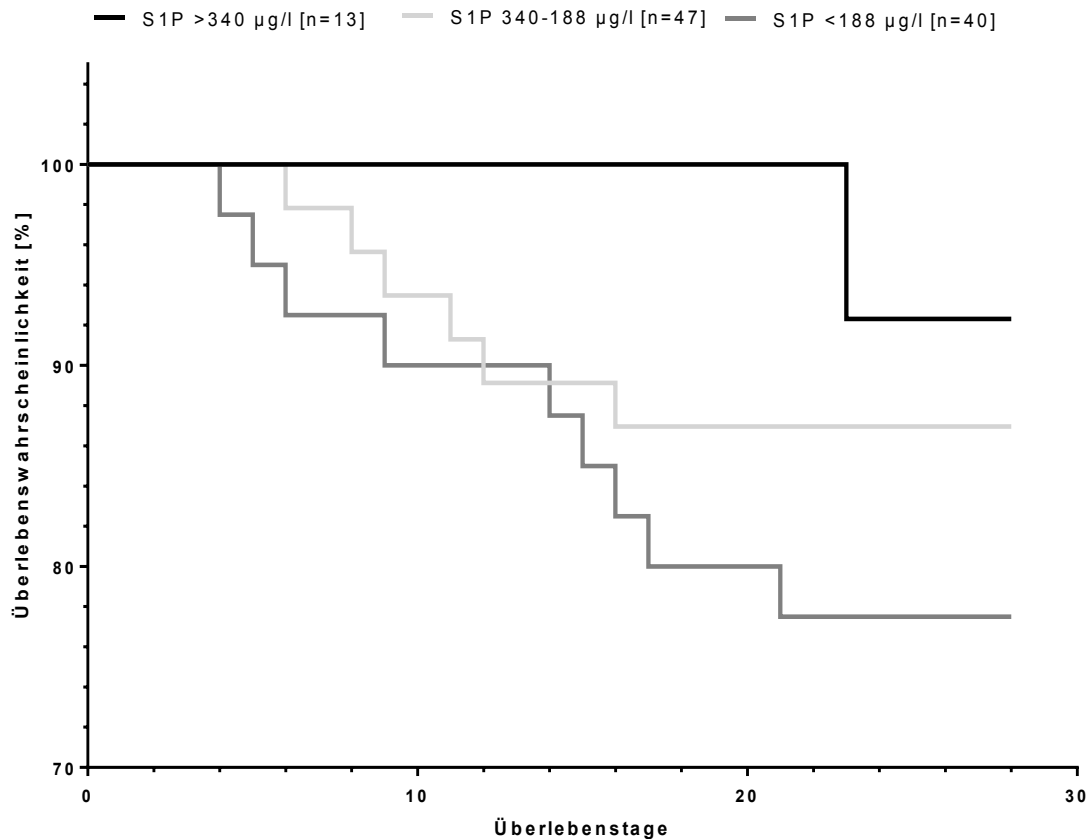


Abbildung 23: Kaplan-Meier-Kurven zur Darstellung der Überlebenswahrscheinlichkeit. Die S1P-Konzentrationen unterteilen das Patientenkollektiv in drei Gruppen: S1P <187µg/l, S1P <340µg/l und S1P >340µg/l. Die Überlebenstage sind nach Aufnahme auf die Intensivstation gezeigt.

4.4.7.2 ROC-Analyse

Mit Hilfe einer ROC-Kurve wurde außerdem ein S1P-Cut-Off-Wert zur Einschätzung des Risikos zu Versterben bestimmt. Bei einem Cut-Off-Wert von 237,9µg/l liegen die Sensitivität hierfür bei 93,75% und die Spezifität hierfür bei 44,05%. Anhand dieser S1P-Konzentration wurden wiederum zwei neue Gruppen gebildet. In der Gruppe mit S1P-Konzentrationen von über 237,9µg/l liegt die Überlebenswahrscheinlichkeit laut der Kaplan-Meyer-Kurve bei 98%. Die Gruppe mit Werten < 237,9µg/l unterscheidet sich hiervon hoch signifikant ($p < 0,01$). Die Überlebenswahrscheinlichkeit liegt bei diesen Patienten bei etwa 74%. Grafisch ist dieses in Abbildung 24 dargestellt.

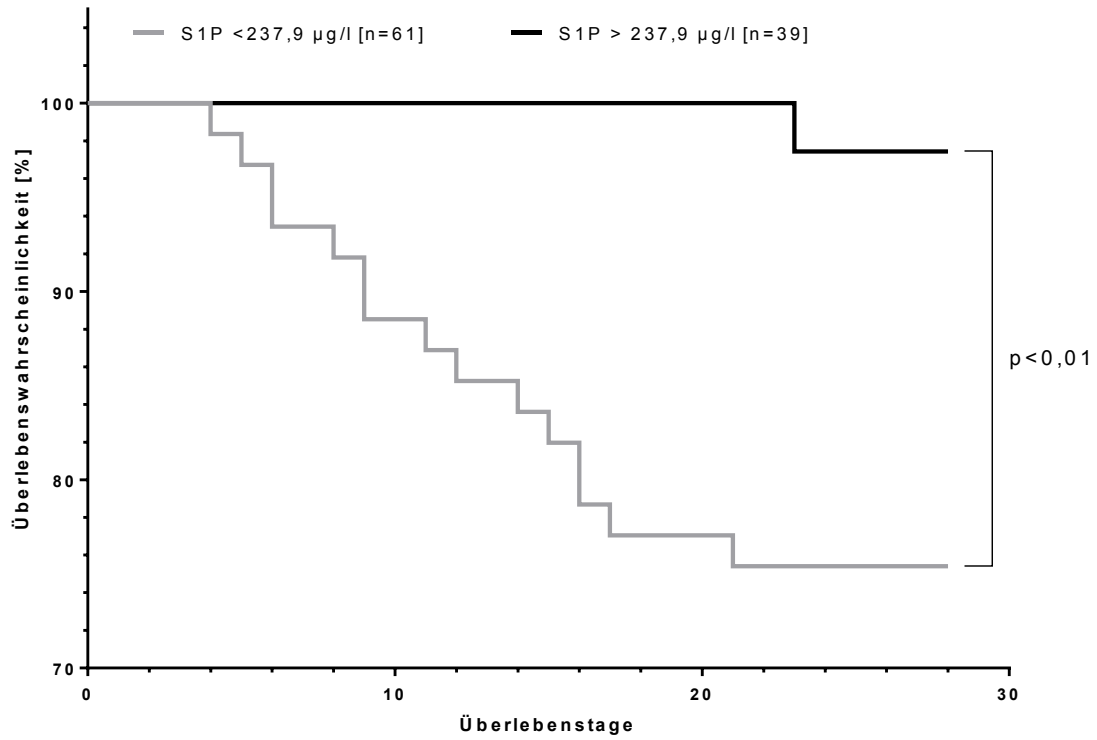


Abbildung 24: Kaplan-Meier-Kurven zur Darstellung der Überlebenswahrscheinlichkeit. Die S1P-Konzentrationen unterteilen das Patientenkollektiv in zwei Gruppen: S1P < 237,9µg/l und S1P > 237,9µg/l. Die Überlebenstage sind nach Aufnahme auf die Intensivstation gezeigt.

5 Beantwortung der Fragestellung

Zu Beginn der vorliegenden Dissertation sind vier Hypothesen aufgestellt worden. Der folgende Abschnitt befasst sich mit der Auswertung dieser.

1) Bei an einer Sepsis erkrankten Patienten ist die Serum-S1P-Konzentration reduziert.

In der Dissertation ist die S1P-Konzentration im Serum von gesunden Kontrollteilnehmern mit derer der Patienten mit einer Sepsis verglichen worden. Bezogen auf die Serum-S1P-Konzentration an Tag 1 ist diese bei Patienten mit einer Sepsis signifikant erniedrigt. In der Kontrollgruppe ist eine Serum-S1P Konzentration von 458,8 μ g/l gemessen worden. Im Vergleich dazu zeigt sich im Durchschnitt aller Patienten eine Serum-S1P-Konzentration von 213,5 μ g/l, dies entspricht einer Reduktion um 53,5%. Somit kann die Hypothese der Reduktion der S1P-Konzentration im Serum bestätigt werden und die weiterführenden Untersuchungen sind bei wahrer Grundhypothese sinnvoll.

2) Der S1P Spiegel im septischen Schock ist im Vergleich zu septischen Patienten erniedrigt.

Die niedrigsten Serum-S1P Konzentrationen finden sich im klinischen Stadium des septischen Schocks. Patienten im septischen Schock haben eine mittlere Serum-S1P Konzentrationen von 149,7 μ g/l, dies entspricht einer Reduktion um 67,4% im Vergleich zu der gesunden Kontrolle sowie einer Reduktion von 47,4% im Vergleich zu Patienten mit einer Sepsis ohne Erreichen des Stadiums Septischer Schock. Eine ROC Analyse ergibt zudem, dass S1P eine ebenso hohe Sensitivität und Spezifität hat einen septischen Schock zu diagnostizieren wie der SOFA Score. Neben der in Hypothese 1 beleuchteten Reduktion der S1P-Serum-Konzentration kann gezeigt werden, dass die Werte der an einer Sepsis erkrankten Patienten gegenüber dem Stadium des Septischen Schocks noch einmal signifikant erniedrigt sind. Somit kann auch die zweite Hypothese bestätigt werden. Zusätzlich zur Möglichkeit der S1P-Konzentration als allgemeiner Sepsismarker zeigt sich eine Option der S1P-Konzentration als Marker für den Septischen Schock.

3) Die S1P-Konzentration ist sowohl mit anderen Entzündungsmarkern als auch mit dem klinischen Scoring für Sepsiserkrankungen assoziiert.

Es sind die in der Literatur vorbeschriebenen Inflammationsparameter sowie Marker des Schocks CrP, IL-6, PCT und Laktat zum Vergleich mit der S1P-Konzentration bestimmt worden. Für diese Marker kann ebenfalls gezeigt werden, dass sie mit dem Schweregrad der Sepsis assoziiert sind. Im Gegensatz zur S1P-Konzentration finden sich bei den

fortgeschrittenen Stadien steigende CrP, IL-6 und PCT Parameter. Somit sind sinkende S1P Spiegel mit den oben genannten Entzündungsmarkern negativ korreliert. Darüber hinaus zeigt sich eine enge Assoziation von der S1P-Konzentration mit dem SOFA Score und somit mit der klinischen Ausprägung der Sepsis. Hohe S1P Werte waren dementsprechend mit niedrigen Scorewerten assoziiert. Insbesondere im Bezug auf die neue internationale Sepsisleitlinie ist die Korrelation der S1P-Konzentration bezüglich des bedeutsamer gewordenen SOFA Scores von großem Interesse.

4) Die S1P-Konzentration ist mit seinen Trägermolekülen sowie den Speicherorten assoziiert.

In der Sepsis kommt es zu einer Hypolipoproteinämie, Anämie sowie Thrombozytopenie. Dies lässt sich auch in der vorliegenden Kohorte nachvollziehen. S1P zeigt dabei eine enge Assoziation mit seinem Trägermolekül HDL sowie seinen Speicherorten, den Erythrozyten und den Thrombozyten. Diese Erkenntnis gibt Aufschluss über einen möglichen Pathomechanismus bezüglich der erniedrigten S1P-Konzentration.

6 Diskussion

Die Sepsis hat die höchste Mortalitätsrate aller auf einer Intensivstation behandelten Erkrankungen (Schulte, et al., 2013). Die Pathophysiologie der Sepsis ist auch heute noch unvollständig verstanden und wandelt sich. Bislang existieren keine spezifischen Sepsis-Marker im Blut und die Therapie erfolgt meist nur symptomatisch.

In die CySep-Studie wurden 100 Patienten eingeschlossen. Anhand der zu diesem Zeitpunkt gültigen Kriterien zur Unterteilung der Sepsis-Stadien (Sepsis-Gesellschaft, 2010) sind die Patienten in die drei Gruppen SIRS/ Sepsis, schwere Sepsis und septischer Schock eingeteilt worden. Die Beobachtung bezüglich der Aufenthaltslänge auf der Intensivstation und der Mortalität unterstreichen die Stadieneinteilung. Ebenso belegen höhere Punktzahlen des SOFA- und SAPS-II-Scores die Unterschiede.

Die S1P-Konzentration unterscheidet sich bei allen an einer Sepsis erkrankten Patienten deutlich von der von gesunden Probanden und eine Identifizierung des septischen Schocks anhand niedriger Serum-S1P Werte ist möglich.

Somit ist davon auszugehen, dass die S1P Spiegel in der Sepsis tatsächlich erniedrigt sind und innerhalb eines verlängerten Intensivaufenthaltes auch erniedrigt bleiben, was bei einem möglichen Einsatz von S1P als Sepsis Marker zu beachten wäre, da trotz der kurzen Halbwertszeit von 15 Minuten (Venkataraman, et al., 2008), eine zeitunkritische Diagnostik möglich ist.

Eignet sich die S1P-Konzentration als Marker für Organdysfunktion und Sepsis-Mortalität?

Die führende Todesursache von Sepsis-Patienten ist das Multiple Organversagen. Um das Risiko für das Vorliegen eines Multiplen Organversagens abschätzen zu können ist das *Sepsis-related Organ Failure Assessment* auf Intensivstationen eingeführt worden. Mit Hilfe dieses Scores kann das Sterblichkeitsrisiko zuverlässig abgeschätzt werden (J. -L. Vincent, et al., 1996). Abbildung 25 zeigt den

Zusammenhang zwischen dem Ergebnis des SOFA-Scores und der Mortalitätsrate, hierbei ist

ab einem Wert von >11 mit einer nahezu hundertprozentigen Mortalität zu rechnen. In der CySep-Studie zeigen die Patienten mit schwererer Sepsis und septischem Schock höhere SOFA-Score-Werte und belegen somit zunächst die Richtigkeit der von uns vorgenommenen klinischen Einteilung.

Die Punktzahl des SOFA-Scores korreliert dabei negativ mit der S1P-Serum-Konzentration. In der vorliegenden Arbeit stellt sich sowohl mit Hilfe des Spearman-Rangkorrelationskoeffizienten als auch mit Hilfe der linearen Regressions-Analyse eine signifikante, negative Korrelation zwischen der S1P-Konzentration und dem Score dar. Somit könnte S1P als zukünftiger Surrogat-Parameter den SOFA Score eventuell sogar ersetzen.

Insbesondere die neue internationale Sepsis-Leitlinie unterstreicht die klinische und diagnostische Relevanz des SOFA-Scores (Singer, et al., 2016). Die negative Korrelation zwischen der S1P-Konzentration und dem SOFA-Score veranschaulicht somit die Möglichkeit von S1P als potentiellen Marker zur Diagnostik einer Organdysfunktion.

Neben der Detektion eines Organversagens ist das Mortalitätsrisiko von Bedeutung. Wie in Abbildung 25 bereits beschrieben besteht ein enger Zusammenhang zwischen der Mortalitätsrate und dem Score-Wert. Bezüglich der S1P-Konzentration und der Mortalität besteht ebenfalls eine Korrelation, diese ist jedoch nicht signifikant. Dies deutet daraufhin, dass die S1P-Konzentration als Marker zur Diagnosestellung eines Organversagens möglicherweise geeignet ist, der SOFA-Score als Vorhersagewert bezüglich des Mortalitätsrisikos hingegen deutlich besser geeignet scheint. In diesem Zusammenhang ist eventuell jedoch von einer begrenzten Aussagekraft auszugehen, da die Mortalitätsraten der Patienten in der Gruppe mit schwerer Sepsis und der Gruppe mit septischem Schock in der CySep-

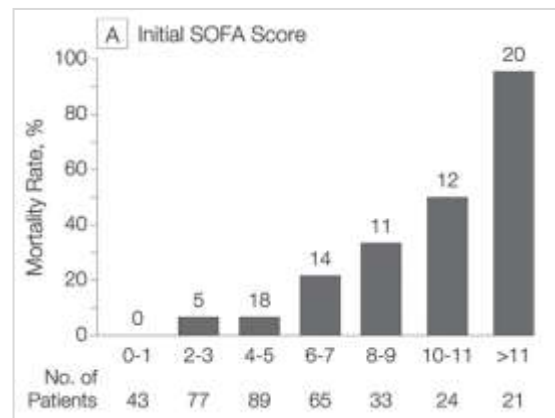


Abbildung 25: Zusammenhang von Mortalitätsraten mit der Höhe des SOFA-Scores (Ferreira, et al., 2001)

Studie bei jeweils 27% liegen. Eine deutschlandweit angelegte prospektive Observationsstudie zeigt hingegen eine Gesamtmortalität innerhalb der beiden schwereren Sepsis-Stadien von 55,2% (Engel, et al., 2007). Somit liegen die Mortalitätsraten der beiden schwereren Sepsis-Gruppen der CySep-Studie bei etwa der Hälfte im Vergleich mit den Patientendaten von Engel, et al. Im Rahmen einer erneuten Untersuchung mit größerer Studienpopulation könnte dieser Problematik der im deutschlandweiten Vergleich zu niedrigen Mortalitätsraten eventuell entgegenwirkt werden. Von großem Interesse wäre dann die erneute Untersuchung der Korrelation von Mortalität und S1P-Konzentration.

S1P als möglicher neuer Marker einer Entzündung, einer Sepsis und eines septischen Schocks?

In der Sepsis Diagnostik fehlen spezifische Labormarker, die den Schweregrad der Sepsis erfassen. Einige Marker werden in der klinischen Routine jedoch eingesetzt, zu ihnen gehören unter anderem das C-reaktive Protein (CrP), das Laktat, das Procalciton (PCT) sowie das Interleukin-6 (IL-6).

1) CrP

Bereits 1930 ist das C-reaktive Protein erstmals beschrieben worden (Tillett & Thomas Francis, 1930). Bis heute ist dies ein kostengünstiger Standardmarker in der Inflammationsdiagnostik, trotz seines sehr unspezifischen Charakters. In der Literatur werden CrP-Werte von 87mg/l als *Cut-Off-Wert* für das Erkennen einer Sepsis beschrieben (Póvoa, et al., 2005). Alle drei Sepsis-Stadien der CySep-Studie überschreiten diesen Wert ebenfalls. Dieses Ergebnis unterstreicht den unspezifischen Charakter des CrP-Werts, da anhand des CrP-Werts somit keine Unterscheidung zwischen den Sepsis-Stadien möglich ist und lediglich eine Infektion an sich erkannt zu werden scheint.

2) Laktat

Als weiterer Marker wurde die Konzentration von Laktat bestimmt. Laktat steigt im Rahmen einer Organminderperfusion und Organhypoxie an. Innerhalb der CySep-Studie wurden Laktatwerte von 1,3mmol/l in Gruppe A und B und signifikant höhere von 1,6mmol/l in Gruppe C gemessen. Die Studie von Bakker et al. berichtet über steigende Laktatwerte von >5,6mmol/l in der Gruppe des septischen Schocks (Bakker, et al., 1996). Die CySep-Studie kann diese hohen Konzentrationen nicht bestätigen. Die Tendenz der höheren Laktat-Werte in der Gruppe mit septischem Schock ist dennoch auch in dieser Studie gezeigt. Ursache der

unterschiedlichen Konzentrationen zwischen der zitierten Studie und den hier vorliegenden Ergebnissen, sind möglicherweise eine andere oder zeitigere Therapie.

3) PCT

Als Marker für eine Sepsis und zur Unterscheidung zwischen bakteriellen und nicht bakteriellen Infektionen wird das PCT immer wieder diskutiert. Die PCT-Konzentrationen steigen mit dem Schweregrad signifikant an. Als *Cut-Off-Wert* für bakterielle systemische Infektionen wird in der Literatur eine PCT-Konzentration von $>0,5\mu\text{g/l}$ angegeben (Aikawa, et al., 2005). Gruppe B und C der CySep-Studie bestätigen diese Werte mit deutlich darüber liegenden Konzentrationen. Der Median von der SIRS/ Sepsis-Gruppe liegt mit $0,39\mu\text{g/l}$ etwas unter dem Grenzwert.

4) IL-6

Als vierter Entzündungsmarker wurde Interleukin-6 gemessen. Innerhalb der CySep-Studie zeigt sich dieser Blutwert als sehr variabel. Immense Streuungsbreiten limitieren die Aussagekraft. Die Studiengruppe um Harbarth hat zur Erkennung einer Sepsis einen *Cut-Off-Wert* von 200ng/l publiziert (Harbarth, et al., 2001). In der CySep-Studie erreichen lediglich die Patienten mit septischem Schock im Median diese Konzentrationen.

Die S1P-Konzentration korreliert mit allen oben genannten Entzündungsmarkern negativ, somit sind niedrigere S1P-Konzentrationen mit hohen Werten der vorbeschriebenen Entzündungsmarker assoziiert. Die beste Korrelation wurde für S1P und PCT berechnet und lässt daher möglicherweise tatsächlich auf einen neuen Inflammationsmarker hoffen. Da PCT im Vergleich zu den anderen Entzündungsmarkern die beste Spezifität und Sensitivität in Bezug auf das Anzeigen einer Sepsis hat, wäre S1P möglicherweise auch Sepsis-spezifisch (Harbarth, et al., 2001).

Zur Evaluierung der Testgüte von S1P-Konzentrationen wurden lineare-Regressionen berechnet, welche in Bezug zum SOFA-Score -als Marker einer Organdysfunktion- gestellt wurden. Mit einem $r^2=0,21$ korreliert die S1P-Konzentration um ein 7-faches besser mit dem Sepsis-spezifischen SOFA-Score als das CrP. Auch IL-6 zeigt mit einem $r^2=0,05$ eine vierfach niedrigere Korrelation als S1P, ebenso PCT mit einer etwa dreifach niedrigeren. Die lineare Regression zwischen dem SOFA-Score, S1P und den anderen Inflammationsmarkern unterstützt die mögliche Validität der S1P-Konzentrationsbestimmung als zukünftigen Marker der Sepsis.

Unter der Annahme, dass bei Krankenhauseinlieferung in 2% der Fälle eine **Sepsis-Erkrankung** vorliegt (Martin, 2012), wurde die Sensitivität und die Spezifität für die S1P-Konzentration berechnet. Eine Sepsis liegt bei einem *Cut-Off*-Wert von 340µg/l mit einer Sensitivität von 87,0% und einer Spezifität von 85,9% vor. Im Vergleich dazu zeigt die Studie von Castelli et al. für CrP-Werte bei einem *Cut-Off*-Wert von 90mg/l eine Sensitivität von 74% und eine Spezifität von 85% (Castelli, et al., 2004). Für Procalcitonin ist in der Studie von Aikawa et al. bei einem *Cut-Off*-Wert von 0,5µg/l eine Sensitivität von 64,4% und eine Spezifität von 86% bestimmt worden (Aikawa, et al., 2005). Für IL-6 werden bei einem *Cut-Off*-Wert von 200ng/l eine Sensitivität von 67% und eine Spezifität 72% angegeben (Harbarth, et al., 2001). Damit zeigt die S1P-Konzentration sowohl im Vergleich mit der CrP-Konzentration als auch mit der PCT- und IL-6-Konzentration eine höhere Sensitivität und Spezifität und eignet sich möglicherweise besser als prädiktiver Marker.

Die Sensitivität und die Spezifität der Entzündungsmarker einschließlich S1P wurden auch in Bezug auf einen **septischen Schock** ermittelt. Bei einem *Cut-Off*-Wert von 186,9µg/l zeigt Sphingosin-1-Phosphat eine Sensitivität von 83,3%, eine Spezifität von 80,0% für das Vorliegen eines septischen Schocks. Daher könnte S1P als auch als sensitiver Marker für die Diagnose eines septischen Schocks dienen.

In den Grenzwertoptimierungskurven (ROC) mit Berechnung der Fläche unterhalb der Kurve (AUC) wird die Klassifizierungsfähigkeit getestet (Hanley & McNeil, 1982). Bei Betrachtung der ROC-Kurven der Inflammationsmarker ist ein stärkeres Annähern der Kurve an die optimale Sensitivität und Spezifität von S1P im Vergleich mit den etablierten Entzündungsmarkern ersichtlich, gefolgt von PCT, IL-6 und CRP.

Mittels verschiedener statistischer Verfahren wurde der Zusammenhang zwischen den Inflammationsparametern und der S1P-Konzentration ebenso wie deren Güte zur Detektierung einer Sepsis-Erkrankung untersucht. Zusammenfassend zeigt sich die S1P-Konzentration im Vergleich mit allen anderen bisher eingesetzten Inflammationsmarkern als sensitiver und spezifischer im Bezug auf eine Sepsis-Erkrankung sowie auf das Vorliegen eines septischen Schocks. In der neuen internationalen Sepsis-S3-Leitlinie hat der SOFA-Score als diagnostischer und prognostischer Test an Bedeutung gewonnen. Vergleiche von S1P und anderen Inflammationsparametern mit dem SOFA-Score zeigten eine signifikantere Korrelation zwischen S1P und dem SOFA-Score. Dies deutet insgesamt auf eine bessere Güte von der S1P-Konzentration als Sepsis-Marker hin.

Warum könnte die S1P-Konzentration eine starke Korrelation mit dem Schweregrad der Sepsis und der Organfunktionsstörung in der Sepsis haben?

Die Ergebnisse dieser Studie belegen eine enge Assoziation mit dem Schweregrad der Sepsis. Im SOFA Score wird der Schweregrad der Sepsis evaluiert in dem er sechs verschiedene Organsysteme bewertet. Interessanterweise steht auch der erniedrigte S1P-Spiegel in starker Abhängigkeit zum Schweregrad der Sepsis.

Die Sepsis manifestiert sich mit Organdysfunktionen. Diese beruhen vor allem auf einer Störung der Organperfusion durch endotheliale Lecks. Durch den Verlust der endothelialen Integrität entsteht ein intravasaler Volumenmangel. Hierauf beruht die hämodynamische Instabilität der Patientin mit Sepsis, die sich insbesondere beim septischen Schock mit niedrigen Blutdrücken manifestiert. Aufgrund des Volumenmangels und der daraus resultierenden Minderperfusion von Organen kommt es zu Organdysfunktionen. Diese zeigen sich auch innerhalb der Studie mittels Erhöhung der Retentionsparameter und Verminderung von Humanalbumin im Rahmen einer Lebersynthesestörung. Mit beiden Organsystemen besteht eine signifikante Korrelation mit der S1P-Konzentration. Somit kann vermutet werden, dass die Endotheldysfunktion, die möglicherweise durch den S1P-Mangel induziert ist, für die Symptome der Sepsis verantwortlich ist. Dies wäre ein möglicher Erklärungsansatz für die enge Korrelation zwischen der S1P-Konzentration und der Sepsis. Pathophysiologisch lässt sich dies wie folgt erklären: S1P ist ein wichtiger Mediator der Integrität des Endothels durch Bindung an seine fünf G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (S1PR1-5). S1P nimmt durch Aktivierung dieser auch Einfluss auf den Gefäßtonus. Die Aktivierung des S1PR1 verhindert das Auftreten von vaskulären Lecks im Rahmen einer Sepsis (Camerer, et al., 2009). Im Gegensatz hierzu setzen der S1PR2 und der S1PR3 die Integrität des Endothels herab (Sanchez, et al., 2007), (Sammani, et al., 2010). Auf den Gefäßtonus wirken ebenfalls S1PR2 und S1PR3. Durch die Rezeptoraktivierung nimmt die Gefäßkontraktion zu. Die Folge ist eine Blutdrucksteigerung (Olivera, et al., 2010), (Forrest, et al., 2004). Die im Rahmen einer Sepsis auftretenden Symptome Ödeme und hypotensiver Schock lassen sich möglicherweise durch einen Mangel an Liganden am S1PR1 oder durch die Veränderung der Rezeptorexpression erklären. Camerer et al. zeigen im Mausmodell bereits den Zusammenhang zwischen der sinkenden S1P-Konzentration und dem Auftreten von Ödemen (Camerer, et al., 2009). Klinisch wird diese Vermutung in der CySep-Studie durch die Korrelation zwischen sinkenden S1P-Konzentrationen und steigendem Volumenbedarf untermauert. Der Annahme von steigendem Flüssigkeitsbedarf durch Ödembildung infolge kapillärer Lecks folgend. Die Rezeptoren 2 und 3 wirken allerdings antagonistisch zu dem S1PR1. Somit wirkt die Unkenntnis über die Rezeptor-Expression limitierend auf die Ergebnisse, da mit dieser klinischen Studie nicht zwischen veränderter

Rezeptorexpression oder sinkender S1P-Konzentration als ursächlichem Auslöser differenziert werden kann.

Die folgende Darstellung (Abbildung 26) fasst die Ergebnisse übersichtlich zusammen. Ein Absinken der S1P-Konzentration kann durch eine Veränderung der Speicher- sowie Trägerproteine in der Sepsis bedingt sein, damit ist die Bindung am Rezeptor S1PR1 reduziert, was schließlich zu einer endothelialen Barrierestörung führen könnte oder im Gegensatz dazu die pro-disruptiven Signalwege des S1PR2 und S1PR3 überwiegen.

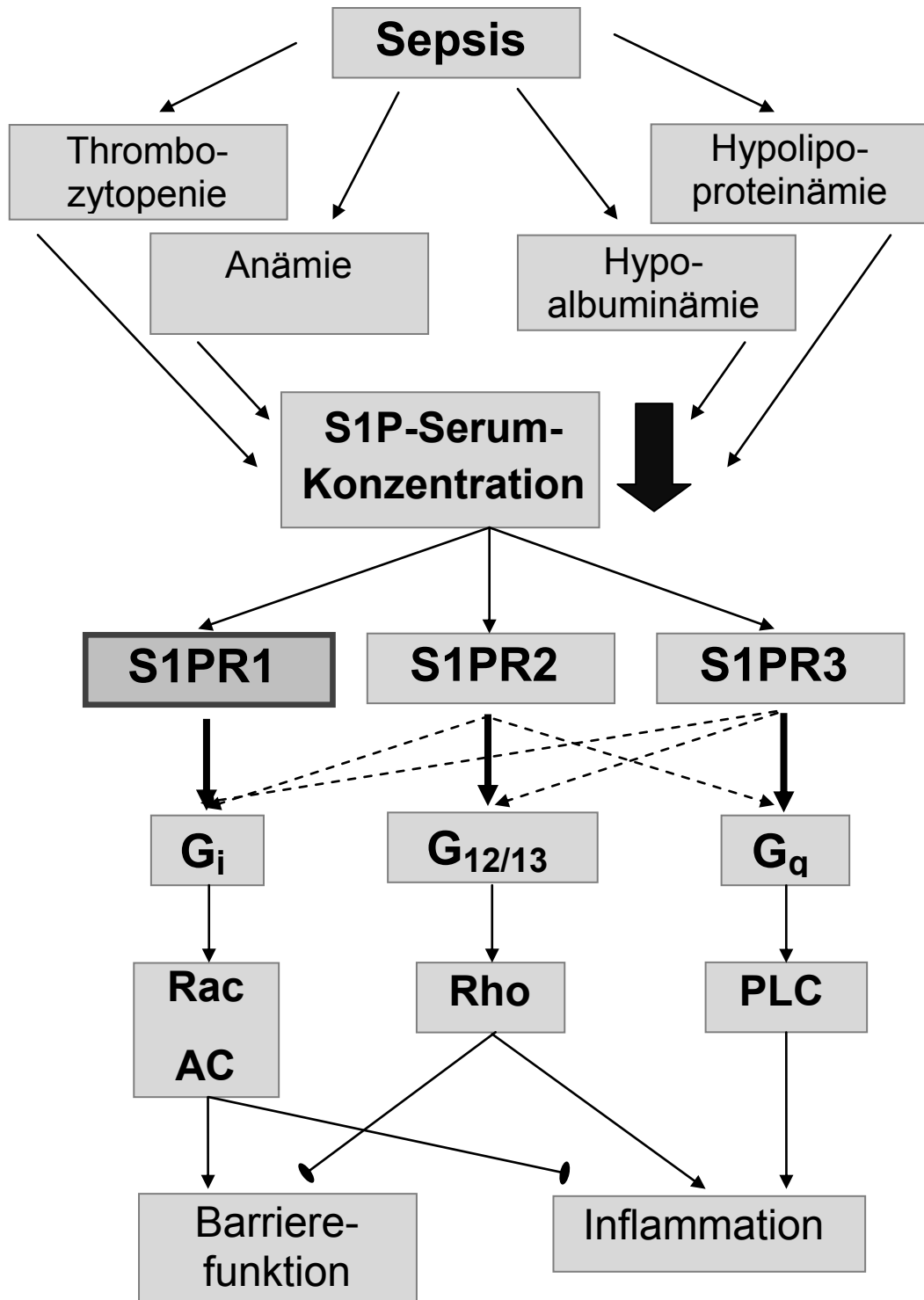


Abbildung 26: Übersichtsskizze bezüglich des Zusammenhangs zwischen S1P und Sepsis

Wie lässt sich die erniedrigte S1P-Serum-Konzentration bei Patienten mit Sepsis erklären?

Es stellt sich somit ferner die Frage warum die S1P-Konzentration im Rahmen einer Sepsis erniedrigt ist. Eine endgültige Klärung dessen ist im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich. Einen Erklärungsansatz bietet die verminderte Konzentration der Speicherorte beziehungsweise der eingeschränkte Transport aufgrund des Verlusts hierzu benötigter Moleküle. Im Folgenden wurden daher die Zusammenhänge von der S1P-Konzentration mit dessen Transport-Proteinen und Speicher-Molekülen beleuchtet.

1) HDL

In der Literatur wird ein Bestandteil der HDL-Moleküle, das Apo M, als Transportprotein von etwa 60% der S1P-Moleküle beschrieben (Kumaraswamy, et al., 2012). Ebenso wie die S1P-Konzentrationen sinken die Konzentrationen des in der Leber produzierten HDLs mit zunehmendem Schweregrad der Erkrankung weiter ab. Van Leeuwen und Kollegen haben ebenfalls sinkende HDL-Werte bei Patienten mit schwerer Sepsis beobachtet (van Leeuwen, et al., 2003). Zwischen der S1P- und HDL-Konzentration besteht eine signifikante, positive Korrelation. Somit zeigt sich auch in der CySep-Studie der in der Literatur beschriebene Zusammenhang von S1P mit seinem Transportprotein HDL.

2) Albumin

Mit dem in der Leber produzierten Albumin besteht eine signifikante, positive Korrelation. Albumin wird ebenso wie HDL als Transportprotein von S1P gehandelt (Murata, et al., 2000).

3) Erythrozyten

Ein weiterer interessanter Aspekt dieser Arbeit ist der Zusammenhang von S1P mit seinen in der Literatur beschriebenen Speicherorten, den Erythrozyten und den Thrombozyten (Pappu, et al., 2007). Die Erythrozytenzahlen sinken ebenso wie die des S1Ps mit steigendem Schweregrad der Erkrankung. In der CySep-Studie sind etwa 1,5-fach niedrigere Erythrozytenzahlen bei den Patienten mit Sepsis im Vergleich mit Probanden gemessen worden. Dies konnte auch in einer anderen Studie gezeigt werden (Kempe, et al., 2007). Erythrozyten stellen einen Speicherort für S1P dar.

4) Thrombozyten

Als weiterer Speicherort werden die Thrombozyten in der Literatur genannt. Hierbei zeigt sich keine signifikante Veränderung der Konzentrationen zwischen den vier Gruppen. Dennoch ist eine positive, hoch signifikante Korrelation zu S1P darstellbar. Somit unterlegen diese Befunde die von Pappu et al. beobachteten experimentellen Erkenntnisse, dass S1P in Erythrozyten und Thrombozyten gespeichert wird, da das Abbauenzym, die S1P-Lyase, diesen fehlt (Pappu, et al., 2007).

Zusammenfassend konnte im Rahmen der Dissertationsarbeit ein möglicher Zusammenhang zwischen der erniedrigten S1P-Konzentration und dem Mangel an Speicher- und Transportproteinen gezeigt werden.

Wäre eine S1P-Substitution ein möglicher Therapieansatz?

Die Erkenntnisse der Wirkungen des S1P oder der Beeinflussung des S1PR1 auf die endotheliale Schranke beruhen auf vielen experimentellen Daten. Zahlreiche Studien belegen einen positiven, verstärkenden Effekt des S1P auf die endotheliale Integrität, die Tabelle 20 gibt einen Überblick einiger wichtiger tierexperimentelle Studien, bei denen in Sepsismodellen entweder der S1P Spiegel oder der S1PR1 durch den S1PR1-Agonisten beeinflusst wurde.

Bislang unbekannt war die Konzentration von S1P in Patienten mit einer Sepsis. Aufgrund des vermeintlichen Zusammenhangs zwischen einem intravasalen Volumenmangel im Rahmen einer Sepsis und der beschriebenen Beeinflussung von S1P auf die endotheliale Integrität ist diese Erkenntnis von enormer Wichtigkeit im Bezug auf mögliche therapeutische Ansätze.

Tabelle 20: Zusammenfassung der aktuellen Sepsismodelle im Tierexperiment bezogen auf S1P/S1PR1.

Referenz	Vorgehensweise	Modell der Schädigung	„Outcome“
(McVerry, et al., 2004)	S1P: 85 µg/kg i.v. (0h post LPS) S1P: 1µM i.v. (1h nach mechanischer Beatmung)	<i>Acute Lung Injury</i> (ALI) (Beatmungsin duziert + LPS)	↓ Extravaskuläres Lungenwasser
(Peng, et al., 2004)	S1P: 1µM i.v. (1h post LPS) FTY720: 0.1 mg/kg, i.p. (1h post LPS)	ALI (LPS)	↓ vaskuläres Leck in Lunge und Nieren ↓ Phagozyteninfiltration
(Sammani, et al., 2010)	S1P: 0.001-0.05 mg/kg i.t. oder i.v. (2h post LPS) SEW-2871(S1PR1-Agonist): 0.1-0.5 mg/kg i.t. oder i.v. (2h post LPS)	ALI (LPS)	↓ vaskuläres Leck (dosis-abhängig) (+) S1PR2/3 knock-out Tiere sind geschützt gegen LPS
(Lundblad & Axelberg, 2013)	FTY720 (S1PR1, 3-5-Agonist): 0.2 mg/kg i.v. (0h post CLI)	<i>Chronic Lung Injury</i> (CLI)	↑ Plasmavolumen ↓ vaskuläre Permeabilität
(Wang, et al., 2014)	FTY720 (S1PR1, 3-5-Agonist): 0.5 mg/kg i.p. (0h post Induktion) FTY720 (S)-P (S1PR1, 3-5-Agonist): 0.5 mg/kg i.p. (0h post Induktion)	ALI (Bleomycin)	↓vaskuläres Leck (FTY720 (S)-P > FTY720) ↓ S1PR1 Expression in Lungen (FTY720) ↑ S1PR1 Expression in Lungen(FTY720 (S)-P)
(Zhang, et al., 2016)	S1P: 1µM	Chirurgisches Trauma	↓ vaskuläres Leck

In den oben genannten tierexperimentellen Studien ist gezeigt worden, dass eine Substitution von S1P oder S1PR1 Agonisten zu einer gesteigerten endothelialen Integrität und damit vermeintlich auch zu einem verbesserten *Outcome* führt. Dies eröffnet weitere spannende Aspekte bezüglich weiterführender Forschung, ob eine Substitution bei Patienten mit einer Sepsis ebenfalls das *Outcome* verbessern kann. Ein sicherlich limitierender Faktor ist hierbei die Applikationsform aufgrund der geringen Halbwertszeit von freiem S1P. In den Mausmodellen konnte jedoch bereits die einmalige Gabe von S1P intravenös beziehungsweise die einmalige Gabe des S1P-Analogons FTY720 intraperitoneal die endotheliale Stabilität in einem induzierten Lungenschaden verbessern und somit die Ödembildung verringern (McVerry, et al., 2004), (Peng, et al., 2004). Ein weiterer Ansatz zur Erhöhung der S1P-Konzentration ist von Zhao und Kollegen untersucht worden. Hierbei wurde die erhöhte Konzentration durch eine Hemmung des Abbauenzym, der S1P-Lyase, erreicht. Die erhöhte S1P-Konzentration führte im Modell zu einer verminderten pulmonalen Entzündungsreaktion (Zhao, et al., 2011). Niessen und Kollegen haben den Einsatz von einem monoklonalen Antikörper untersucht (7H9). Dieser bindet selektiv an den S1PR3. Im Mausmodell für systemische Inflammation wurde eine verminderte Morbidität gezeigt (Niessen, et al., 2008).

Fingolimod (FTY720) ist der aktuell am besten untersuchte S1P-Rezeptor-Agonist. Dieser ist nicht selektiv, die stärkste Wirkung besteht auf S1PR1. Die agonistische Wirkung auf S1PR1 führt paradoxerweise zu einem funktionellen Antagonismus. Dies ist durch eine Internalisierung des Rezeptors nach Aktivierung zu erklären. Diese Studie verdeutlicht die komplexe Rezeptordynamik.

Die genannten Studien zeigen vielversprechende Therapie-Ansätze. Limitierend auf die Aussagekraft wirkt hierbei die Komplexität der Signalwege des S1P-Moleküls. Somit löst die Veränderung der S1P-Konzentration in unterschiedlichen Geweben unterschiedliche Signalwege durch S1P als direktes Signalmolekül aus. Die Konzentrationsveränderung hat weiterhin Einfluss auf die Expression der 5 S1P-Rezeptoren, die wiederum teilweise antagonistisch wirken. Ebenso wäre zu klären inwieweit der unabhängig von der S1P-Konzentration in der Sepsis auftretende Rückgang von Transport- und Speicherprotein Einfluss auf das komplexe Gefüge nimmt.

Ausblick

In der vorliegenden Dissertationsarbeit konnte erstmals an Patienten mit Sepsis und septischem Schock gezeigt werden, dass der S1P Spiegel bei diesen Patienten signifikant abnimmt.

Warum die S1P-Konzentration absinkt kann nur vermutet werden. Es kann abschließend nicht beantwortet werden, ob die S1P-Konzentration sinkt, weil die Konzentration der Transportproteine sinkt oder ob S1P und HDL sowie S1P und Albumin unabhängig voneinander weniger produziert werden beziehungsweise mehr verbraucht werden. Anhand der Ergebnisse ist es auch für die Speicherorte des S1Ps nicht möglich einen potentiellen kausalen Zusammenhang zu beweisen. Weitere experimentelle Versuche wären notwendig, um diesen genauen Mechanismus aufzuklären.

S1P wirkt über die Bindung an G-Protein gekoppelten Rezeptoren auf den Organismus. Auf die in der Sepsis auftretenden Symptome der Hypotonie und dem Verlust der vaskulären Integrität nimmt S1P über Bindung an die S1P Rezeptoren Einfluss. Die Abnahme der S1P-Konzentration während einer Sepsis könnte eine daraus resultierende verminderte Signaltransduktion vermuten lassen. Neben der Konzentration des Signalmoleküls ist aber auch die Expression der Rezeptoren entscheidend. Eine Aussage ob sich gegebenenfalls auch die Rezeptorexpression ändert ist anhand dieser Studie nicht möglich. Für mögliche

Therapieoptionen sind neben der S1P-Konzentration auch die Expression der Rezeptoren von essentieller Bedeutung.

Die CySep-Studie kann mit ihren Ergebnissen einen Zusammenhang zwischen der S1P-Serum-Konzentration und dem Schweregrad einer Sepsis zeigen. Durch eindeutige Ergebnisse bei den linearen Regressions-Analysen, sowie bei den Spearman Rangkorrelationskoeffizienten und bei den ROC-Kurven von S1P im Vergleich zu anderen Entzündungsmarkern wäre ein Einsatz als Sepsis-Marker denkbar. Vorrangig wäre hierfür eine Messung in einem größer angelegten Studienkollektiv notwendig um exakte *Cut-Off*-Werte zu bestimmen und um weitere Störfaktoren zu minimieren.

7 Zusammenfassung

Die Sepsis ist eine lebensbedrohliche Organdysfunktion aufgrund einer fehlregulierten Körperantwort auf eine Infektion (Singer, et al., 2016). In Deutschland erkranken 280.000 Menschen pro Jahr an einer Sepsis mit steigender Inzidenz. Insgesamt sterben 25 % der Sepsispatienten auf Intensivstationen, die bis auf 60% im septischen Schock steigen kann (Fleischmann, et al., 2016). Bislang gibt es kein spezifisches Diagnose-*Tool*, das eine Sepsis sicher bestätigt oder ablehnt. Die kausale Therapie ist bei steigenden Antibiotika-Resistenzen und fehlendem Erregernachweis in 30% der Fälle (Alberti, et al., 2002) noch immer unzureichend.

Sphingosin-1-Phosphat (S1P) bindet als Signallipid an G-Protein gekoppelte Rezeptoren (S1PR1-S1PR5) (Spiegel & Milstien, 2003). Das Molekül beeinflusst die Lymphozyten-Migration sowie die Gefäßpermeabilität und ist damit ein wichtiger pathogenetischer Faktor der Sepsis. Die Dissertation befasst sich daher mit einer möglichen Korrelation der S1P-Serum-Konzentration und der Schweregrad der Sepsis.

In der Studie wurden bei 100 Patienten in den unterschiedlichen Sepsis-Stadien: SIRS, Sepsis, Schwere Sepsis und Septischer Schock die S1P-Serum-Konzentration, Laborparameter sowie klinische Scores bestimmt. Als Vergleichswert diente eine Kontrollgruppe von 20 Probanden.

Die S1P-Serum-Konzentration aller Sepsis-Stadien ist signifikant erniedrigt im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Gruppe C mit schwerer Sepsis lässt durch signifikant erniedrigte Werte außerdem eine Unterscheidung zu den anderen Sepsis-Stadien zu.

Es zeigt sich weiterhin ein Zusammenhang zwischen den Konzentrationen von S1P und dem vorbeschriebenen Transport-Protein HDL (Kumaraswamy, et al., 2012), den Erythrozyten als Speicherort (Pappu, et al., 2007) sowie den etablierten Entzündungsmarkern der Sepsis. In Kaplan-Meier-Kurven konnte eine tendenziell höhere Sterberate bei sinkenden S1P-Konzentrationen gezeigt werden.

Die Untersuchungen der Dissertation konnten zeigen, dass die S1P-Konzentration als neuer Sepsis-Marker im klinischen Alltag eingesetzt werden kann. Er dient hierbei sowohl zur Abschätzung der Schwere der Sepsis als auch dem Outcome der Patienten.

8 Abstract

Sepsis is a life threatening organ dysfunction caused by a dysregulated immune response to an infection (Singer, et al., 2016). In Germany, every year 280.000 patients suffer from a sepsis-with increasing incidence. The mortality during treatment on intensive care unit amounts up to 25%, which increases up to 60% in case of septic shock (Fleischmann, et al., 2016). Thus far, there is a lack of sufficient tools in diagnosis of a sepsis. In addition, causal therapy often remains insufficient, based on increasing incidence of antibiotic resistance and the lack of pathogen detection in 30% of all cases of sepsis.

The signaling peptide Sphingosine-1-Phosphate (S1P) is a ligand of G-protein coupled receptors (S1PR1-S1PR5) (Spiegel & Milstien, 2003). S1P is responsible for lymphocyte migration and vascular permeability and constitutes a pathogenic factor of sepsis. In this doctoral dissertation, serum-concentrations of S1P were investigated regarding their correlation with the severity of sepsis.

In this study, 100 Patients suffering from all stages of disease as SIRS, sepsis, severe sepsis and septic shock were included. Serum concentrations of S1P and conventional laboratory parameters of systemic inflammation and basic clinical parameters were assessed. The results were compared to a control group of 20 healthy study participants.

Patients suffering from sepsis had significantly lower S1P serum concentrations than patients of the control group. In addition, serum S1P levels correlated significantly with the severity of sepsis.

Furthermore, a correlation between S1P-concentrations and its transport protein HDL, conventional serum markers of systemic inflammation and the amount of erythrocytes as storage localization of S1P was shown. Using the Kaplan-Meier-method, lower S1P Serum correlated with higher mortality.

In this doctoral dissertation, S1P was introduced as new potential marker for sepsis. Here S1P serves as indicator for the severity of a sepsis and predictor for patients' outcome.

9 Abkürzungsverzeichnis

AC	Adenylylcyclase
AcN	Acetonitril
ALAT	Alanin-Aminotransferase
ALI	Acute Lung Injury
Apo M	Apolipoprotein M
apTZ	aktivierte partielle Thromboplastinzeit
ARDS	Acute Respiratory Distress Syndrome
ASAT	Aspartat-Aminotransferase
AUC	area-under-the-curve
BE	Base Excess
C17-S1P	D-erythro-sphingosine-1-phosphat
CARS	Compensatory Anti-Inflammatory Response Syndrom
CLI	Chronic Lung Injury
CrP	C-reaktives Protein
EDG	endothelien differentiations genes
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ERK	Extracellular-signal Regulated Kinase
ESI	Elektrospray-Ionisation
EVB	Erythrozytenverteilungsbreite
FU	<i>Follow-up</i>
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
G _i	inhibitorische G-Proteine
GLDH	Glutamatdehydrogenase
GOT	Glutamat-Oxalacetat-Transaminase
G-Protein	GTP-bindendes Protein
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase
G _q	Phospholipase-C-gekoppelte G-Proteine
GTP	Guaninnucleotid-tri-Phosphat
HDL	High Density Lipoproteins
HES	Hydroxyethylstärke
HF	Herzfrequenz
IL-1	Interleukin-1
IL-4	Interleukin-4
IL-6	Interleukin-6
IL-10	Interleukin-10
IL-12	Interleukin-12
INR	International Normalized Ratio

Abkürzungsverzeichnis

IQR	interquartile range (Interquartilsabstand)
LC	Liquid chromatography
LDL	Low Density Lipoprotein
LPS	Lipopolysaccharide
max.	Maximum
MCH	mittleres korpuskuläres Hämoglobin
MCHC	mittlere korpuskuläre Hämoglobin-Konzentration
MCV	mittleres korpuskuläres Volumen
min.	Minimum
Min.	Minute
m/q	Masse-Ladungs-Verhältnis
MAD	mittlerer arterieller Blutdruck
MAP-Kinase	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
n	Anzahl der Merkmalsausprägung
PaCO ₂	arterieller Kohlenstoffdioxidpartialdruck
PaO ₂	arterieller Sauerstoffpartialdruck
PBMC	mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PCT	Procalcitonin
PEEP	positiven endexpiratorischen Druck
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
PLC	Phospholipase C
qcH	quality control high
qcL	quality control low
rcf	relative centrifugal force
Rho	Ras homologue
ROC	receiver-operating characteristic
rpm	revolutions per minute
S1P	Sphingosin-1-Phosphat
S1PR1-5	S1P-Rezeptor 1-5
SAPS II	Simplified-Acute-Physiology-Score II
Sek.	Sekunde
SIRS	Systemic Inflammatory Response Syndrom
SOFA	Sequential-Organ-Failure-Assessment
Spns2	Spinster homolog 2
Std.	Stunde
TLR	Toll-Like-Rezeptoren
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor- α
TGF- β	Transforming-Growth-Factor β
TRAF2	TNF-receptor-associated-factor 2
VEGF	vascular endothelial growth factor
VLDL	Very Low Density Lipoprotein

10 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: : Darstellung der Pathophysiologie der Sepsis.....	- 6 -
Abbildung 2: Diagnostische Kriterien der vier Sepsis-Stadien.....	- 8 -
Abbildung 3: Sphingosin-1-Phosphat (S1P)-Syntheseweg	- 11 -
Abbildung 4: Strukturformel von Sphingosin-1- Phosphat.....	- 12 -
Abbildung 5: Übersicht über die molekularbiologischen Signalwege.....	- 14 -
Abbildung 6: Wirkmechanismen der S1P- Rezeptoren an unterschiedlichen Organen.	- 14 -
Abbildung 7: Graphische Darstellung des Studiendesigns.....	- 21 -
Abbildung 8: Chromatogramm des internen Standard C17-S1P und S1P	- 26 -
Abbildung 9: Einzelchromatogramm von S1P.....	- 27 -
Abbildung 10: Beispiel-Kalibrierungsgerade	- 28 -
Abbildung 11: S1P-Konzentration im Serum.....	- 36 -
Abbildung 12: HDL-Konzentration im Plasma.....	- 37 -
Abbildung 13: Korrelation der S1P -Konzentration mit der HDL-Konzentration	- 38 -
Abbildung 14: Erythrozytenzahl.	- 40 -
Abbildung 15: Korrelation der S1P -Konzentration mit der Erythrozytenzahl.....	- 41 -
Abbildung 16: Korrelation der S1P -Konzentration mit der Thrombozytenzahl.....	- 42 -
Abbildung 17: Korrelation der S1P -Konzentration mit der Albumin-Konzentration	- 43 -
Abbildung 18: Korrelation der S1P -Konzentration mit der Kreatinin-Konzentration	- 45 -
Abbildung 19: SOFA-Score-Werte der drei Schweregrad-Gruppen	- 46 -
Abbildung 20: Lineare Regression von der S1P-Konzentration und dem SOFA-Score....	- 47 -
Abbildung 21: (ROC) von S1P in Bezug auf das Vorliegen eines septischen Schocks.	- 50 -
Abbildung 22: (ROC) der Entzündungsmarker sowie HDL	- 50 -
Abbildung 23: Kaplan-Meier-Kurven zur Darstellung der Überlebenswahrscheinlichkeit..	- 52 -
Abbildung 24: Kaplan-Meier-Kurven zur Darstellung der Überlebenswahrscheinlichkeit..	- 53 -
Abbildung 25: Zusammenhang von Mortalitätsraten mit der Höhe des SOFA-Scores	- 57 -
Abbildung 26: Zusammenhang zwischen S1P und Sepsis	- 63 -

11 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Chemikalienliste.....	- 18 -
Tabelle 2: Materialienliste.....	- 19 -
Tabelle 3: Geräteliste	- 20 -
Tabelle 4: Beispielbestückung einer Mikrotiterplatte	- 24 -
Tabelle 5: Zeitlicher Verlauf des Elutionsmittelgradienten.....	- 25 -
Tabelle 6: Kriterien des S(implified) A(cute) P(hysiology) S(core)- II Teil 1	- 29 -
Tabelle 7: Kriterien des S(implified) A(cute) P(hysiology) S(core)- II Teil 2	- 30 -
Tabelle 8: Kriterien des S(epsis-related) O(rgan) F(ailure) A(ssessment) – Score.....	- 30 -
Tabelle 9: Zusammenfassung der Probengewinnung.....	- 32 -
Tabelle 10: Überblick über die demografischen Daten.....	- 34 -
Tabelle 11: S1P-Konzentrationen.....	- 35 -
Tabelle 12: Messwerte von HDL an Tag 1	- 37 -
Tabelle 13: Messwerte von zellulären Blutbestandteilen an Tag 1.....	- 39 -
Tabelle 14: Messwerte von Albumin an Tag 1.....	- 43 -
Tabelle 15: Messwerte der Mierenfunktionsparameter an Tag 1	- 44 -
Tabelle 16: Messwerte des SOFA-Scores an Tag 1	- 46 -
Tabelle 17: Messwerte der Entzündungsparameter an Tag 1.....	- 48 -
Tabelle 18: Sensitivität, Spezifität des septischen Schocks	- 49 -
Tabelle 19: Mortalitätsraten	- 51 -
Tabelle 20: aktuelle Sepsismodelle.	- 66 -

12 Literaturverzeichnis

- Aikawa, N. et al., 2005. Multicenter prospective study of procalcitonin as an indicator of sepsis. *Journal of Infection and Chemotherapy*, April, pp. 152-159.
- Akira, S., Uematsu, S. & Takeuchi, O., 2006. Pathogen Recognition and Innate Immunity. *Cell*, Februar, pp. 783-801.
- Alberti, C. et al., 2002. Epidemiology of sepsis and infection in ICU patients from an international multicentre cohort study. *Intensive Care Medicine*, Februar, pp. 108-121.
- Allende, M. L. et al., 2011. Sphingosine-1-phosphate Lyase Deficiency Produces a Pro-inflammatory Response While Impairing Neutrophil Trafficking. *The Journal of Biological Chemistry*, März, p. 7348–7358.
- Alvarez, S. et al., 2010. Sphingosine-1-phosphate is a missing cofactor for the E3 ubiquitin ligase TRAF2. *Nature*, Juni, pp. 1084-1088.
- Angus, D. C. et al., 2001. Epidemiology of severe sepsis in the United States: Analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Critical Care Medicine*, Juli, pp. 1303-1310.
- Ayala, A. et al., 1996. Differential induction of apoptosis in lymphoid tissues during sepsis: variation in onset, frequency, and the nature of the mediators. *Blood*, Mai, pp. 4261-4275.
- Baeyens, A., Fang, V., Chen, C. & Schwab, S., 2015. Exit Strategies: S1P Signaling and T Cell Migration. *Trends in Immunology.*, Dezember, pp. 778-787.
- Bakker, J. et al., 1996. Serial blood lactate levels can predict the development of multiple organ failure following septic shock. *The American Journal of Surgery*, Februar, pp. 221-226.
- Bates, D. W., Cook, E. F., Goldman, L. & Lee, T. H., 1990. Predicting Bacteremia in Hospitalized Patients: A Prospectively Validated Model. *Annals of Internal Medicine*, Oktober, pp. 495-500.
- Bazzoni, G. & Dejana, E., 2004. Endothelial cell-to-cell junctions: molecular organization and role in vascular homeostasis. *Physiol Rev*, pp. 869-901.
- Bone, R. C. et al., 1992. Definitions for Sepsis and Organ Failure and Guidelines for the Use of Innovative Therapies in Sepsis. *Chest*, Juni, pp. 1644-1655.
- Boomer, J., Green, J. & Hotchkiss, R., 2014. The changing immune system in sepsis: Is individualized immuno-modulatory therapy the answer? *Virulence*, Januar, pp. 45-56.
- Briel, M. et al., 2010. Higher vs lower positive end-expiratory pressure in patients with acute lung injury and acute respiratory distress syndrome: systematic review and meta-analysis. *The Journal of the American Medical Association*, März, pp. 865-873.
- Brown, K. et al., 2006. Neutrophils in development of multiple organ failure in sepsis. *The Lancet*, Juli, pp. 157-169.

- Brunkhorst, F. M., 2006. Epidemiologie, Ökonomie und Praxis - Ergebnisse der deutschen Prävalenzstudie des Kompetenznetzwerkes Sepsis (SepNet). *Anästhesiologie Intensivmedizin Notfallmedizin Schmerztherapie (AINS)*, Januar, pp. 43-44.
- Brunkhorst, F. M., Wegscheider, K., Forycki, Z. F. & Brunkhorst, R., 2000. Procalcitonin for early diagnosis and differentiation of SIRS, sepsis, severe sepsis, and septic shock. *Intensive Care Medicine*, Februar, pp. 148-152.
- Brunkhorst, F. et al., 2018. S3-Leitlinie Sepsis – Prävention, Diagnose, Therapie und Nachsorge. *AWMF online*, 12.
- Camerer, E. et al., 2009. Sphingosine-1-phosphate in the plasma compartment regulates basal and inflammation-induced vascular leak in mice. *The Journal of Clinical Investigation*, Juli, pp. 1871-1879.
- Castelli, G. P. et al., 2004. Procalcitonin and C-reactive protein during systemic inflammatory response syndrome, sepsis and organ dysfunction. *Critical Care*, Juni, pp. 234-242.
- Chalupka, A. N. & Talmor, D., 2012. The Economics of Sepsis. *Critical Care Clinics*, Januar, pp. 57-76.
- Chaudry, I. H., 1999. Sepsis: Lessons Learned in the Last Century and Future Directions. *Archives of Surgery*, September, pp. 922-929.
- Christoffersen, C. & Nielsen, L. B., 2012. Apolipoprotein M - a new biomarker in sepsis. *Critical Care*, Mai, p. 126.
- Christoffersen, C. et al., 2011. Endothelium-protective sphingosine-1-phosphate provided by HDL-associated apolipoprotein M. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Juni, pp. 9613-9618.
- Chun, J. & Hartung, H.-P., 2010. Mechanism of Action of Oral Fingolimod (FTY720) in Multiple Sclerosis. *Clinical Neuropharmacology*, März-April, pp. 91-101.
- Clements, R. M. F., Singer, H. K. R. & Vincent, P., 2005. RhoA and Rho-kinase dependent and independent signals mediate TGF-beta-induced pulmonary endothelial cytoskeletal reorganization and permeability. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, pp. 294-306.
- Clyne, B. & Olshaker, J., 1999. The C-reactive protein. *The Journal of Emergency Medicine*, November, pp. 1019-1025.
- Corona, M., Peters, S., Narr, B. & Thompson, R., 1990. Infections related to central venous catheters. *Mayo Clinic proceedings*, Juli, pp. 979-986.
- Cuvillier, O. et al., 1996. Suppression of ceramide-mediated programmed cell death by sphingosine-1-phosphate. *Nature*, Juni, pp. 800-803.
- Damas, P. et al., 1992. Cytokine serum level during severe sepsis in human IL-6 as a marker of severity. *Annals of Surgery*, April, pp. 356-362.
- Dellinger, R. P. et al., 2013. Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Severe Sepsis and Septic Shock: 2012. *Critical Care Medicine*, Februar, p. 580-637.

- Denk, S., Perl, M. & Huber-Lang, M., 2012. Damage- and Pathogen-Associated Molecular Patterns and Alarmins: Keys to Sepsis? *European Surgical Research*, Juli, pp. 171-179.
- Dombrovskiy, V. Y., Martin, A. A., Sunderram, J. & Paz, H. L., 2007. Rapid increase in hospitalization and mortality rates for severe sepsis in the United States: A trend analysis from 1993 to 2003. *Critical Care Medicine*, Mai, pp. 1244-1250.
- Engel, C., 2013. *Prävalenz, Morbidität und Mortalität der schweren Sepsis auf deutschen Intensivstationen. Ergebnisse einer bundesweiten Querschnittserhebung des Kompetenznetzes Sepsis*. [Online]
Available at: <http://www.gmds2006.de/Vortraege/148.pdf>
- Engel, C. et al., 2007. Epidemiology of sepsis in Germany: results from a national prospective multicenter study. *Intensive Care Medicine*, April, pp. 606-618.
- Ferreira, F. L. et al., 2001. Serial Evaluation of the SOFA Score to Predict Outcome in Critically Ill Patients. *The Journal of the American Medical Association*, pp. 1754-1758.
- Fleischmann, C. et al., 2016. Hospital incidence and mortality rates- an analysis of hospital episode (DRG) statistics in Germany from 2007 to 2013. *Deutsches Ärzteblatt*, März, pp. 159-166.
- Forrest, M. et al., 2004. Immune Cell Regulation and Cardiovascular Effects of Sphingosine 1-Phosphate Receptor Agonists in Rodents Are Mediated via Distinct Receptor Subtypes. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, Mai, pp. 758-768.
- Gaengel, K. et al., 2012. The Sphingosine-1-Phosphate Receptor S1PR1 Restricts Sprouting Angiogenesis by Regulating the Interplay between VE-Cadherin and VEGFR2. *Developmental Cell*, September, pp. 587-599.
- Geroulanos, S. & Douka, E. T., 2006. Historical perspective of the word "sepsis". *Intensive Care Medicine*, Dezember, p. 2077.
- Girard, T. D. et al., 2008. Efficacy and safety of a paired sedation and ventilator weaning protocol for mechanically ventilated patients in intensive care (Awakening and Breathing Controlled trial): a randomised controlled trial. *The Lancet*, Januar, pp. 126-134.
- Gonzalez-Cabrera, P. J., Brown, S., Studer, S. M. & Rosen, H., 2014. S1P signaling: new therapies and opportunities. *F1000Prime Reports*, Dezember.
- Hanley, J. A. & McNeil, B. J., 1982. The meaning and use of the area under a receiver operating characteristic (ROC) curve. *Radiology*, April, pp. 29-36.
- Harbarth, S. et al., 2001. Diagnostic Value of Procalcitonin, Interleukin-6, and Interleukin-8 in Critically Ill Patients Admitted with Suspected Sepsis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, August, pp. 396-402.
- Herold, G., 2012. *Innere Medizin*. Köln: Herold.
- Hopkins, R. et al., 1999. Neuropsychological Sequelae and Impaired Health Status in Survivors of Severe Acute Respiratory Distress Syndrome. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, Januar, pp. 50-56.

- Hotchkiss, R. S. et al., 2001. Role of Apoptosis in *Pseudomonas aeruginosa* Pneumonia. *Science*, November, p. 1783.
- Hotchkiss, R. S. & Karl, I. E., 2003. The Pathophysiology and Treatment of Sepsis. *New England Journal of Medicine*, Januar, pp. 138-150.
- Ishii, M. et al., 2009. Sphingosine-1-phosphate mobilizes osteoclast precursors and regulates bone homeostasis. *Nature*, März, pp. 524-528.
- J. -L. Vincent, et al., 1996. The SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) score to describe organ dysfunction/failure. *Intensive Care Medicine*, Juli, pp. 707-710.
- Jimenez, M. F. & Marshall, J. C., 2001. Source control in the management of sepsis. *Intensive Care Medicine*, pp. 49-62.
- Jolly, P. S. et al., 2004. Transactivation of Sphingosine-1-Phosphate Receptors by FcεRI Triggering Is Required for Normal Mast Cell Degranulation and Chemotaxis. *The Journal of Experimental Medicine*, April, pp. 959-970.
- Junger, W. G. et al., 1996. Immunosuppression after Endotoxin Shock: The Result of Multiple Anti-inflammatory Factors. *Journal of Trauma-Injury Infection & Critical Care*, Mai, pp. 702-709.
- Kempe, D. S. et al., 2007. Suicidal erythrocyte death in sepsis. *Journal of Molecular Medicine*, März, pp. 273-281.
- Kumar, A. et al., 2006. Duration of hypotension before initiation of effective antimicrobial therapy is the critical determinant of survival in human septic shock. *Critical Care Medicine*, Juni, pp. 1589-1596.
- Kumaraswamy, S. B., Linder, A., Åkesson, P. & Dahlbäck, B., 2012. Decreased plasma concentrations of apolipoprotein M in sepsis and systemic inflammatory response syndromes. *Critical Care*, Dezember.
- Lakhani, S. A. & Bogue, C. W., 2003. Toll-like receptor signaling in sepsis. *Current Opinion in Pediatrics*, Juni, pp. 278-282.
- Llewelyn, M. & Cohen, J., 2001. Diagnosis of infection in sepsis. *Intensive Care Medicine*, Februar, pp. 10-32.
- Löffler, G., Petrides, P. E. & Heinrich, P. C., 2006. *Biochemie und Pathobiochemie*. Heidelberg: Springer.
- Lundblad, C. & Axelberg, H. G. P., 2013. Treatment with the sphingosine-1-phosphate analogue FTY 720 reduces loss of plasma volume during experimental sepsis in the rat. *Acta anaesthesiologica Scandinavica*, pp. 713-718.
- Luzzani, A. et al., 2003. Comparison of procalcitonin and C-reactive protein as markers of sepsis. *Critical Care Medicine*, Juni, pp. 1737-1741.
- Martin, G. S., 2012. Sepsis, severe sepsis an septic shock: changes in incidence, pathogens and outcomes. *Expert Rev Anti Infect Ther.*, Juni, pp. 701-706.

- Martin, G. S., Mannino, D. M., Eaton, S. & Moss, M., 2003. The Epidemiology of Sepsis in the United States from 1979 through 2000. *New England Journal of Medicine*, April, pp. 1546-1554.
- Matloubian, M. et al., 2004. Lymphocyte egress from thymus and peripheral lymphoid organs is dependent on S1P receptor 1. *Nature*, Januar, pp. 355-360.
- McVerry, B. et al., 2004. Sphingosine 1-phosphate reduces vascular leak in murine and canine models of acute lung injury. *American journal of respiratory and critical care medicine*, pp. 987-993.
- Mehendiratta, V. et al., 2007. Computerized tomography (CT)-guided aspiration of abscesses: Outcome of therapy at a tertiary care hospital. *Journal of Infection*, Februar, pp. 122-128.
- Meier-Hellmann, A., 2001. Häodynamische Stabilisierung durch Einsatz häodynamisch aktiver Substanzen bei Sepsis und Multiorgandysfunktions-Syndrom (MODS). *Intensivmedizin und Notfallmedizin*, Januar, pp. 39-52.
- Mendoza, A. et al., 2012. The transporter Spns2 is required for secretion of lymph but not plasma sphingosine-1-phosphate. *Cell Reports*, November, pp. 1104-1110.
- Michaud, J., Im, D.-S. & Hla, T., 2010. Inhibitory Role of Sphingosine 1-Phosphate Receptor 2 in Macrophage Recruitment during Inflammation. *The Journal of Immunology*, Februar, pp. 1475-1483.
- Morgenthaler, N. et al., 2003. Production of procalcitonin (PCT) in non-thyroidal tissue after LPS injection. *Hormone and metabolic research*, Mai, pp. 290-295.
- Murata, N. et al., 2000. Interaction of sphingosine 1-phosphate with plasma components, including lipoproteins, regulates the lipid receptor-mediated actions. *Biochemical Journal*, Dezember, pp. 809-815.
- Niessen, F. et al., 2008. Dendritic cell PAR1-S1P3 signalling couples coagulation and inflammation. *Nature*, April, pp. 654-658.
- Olivera, A. et al., 2010. Sphingosine kinase 1 and sphingosine-1-phosphate receptor 2 are vital to recovery from anaphylactic shock in mice. *The Journal of Clinical Investigation*, Mai, pp. 1429-1440.
- Olivera, A. & Rivera, J., 2011. An emerging role for the lipid mediator sphingosine-1-phosphate in mast cell effector function and allergic disease. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, pp. 123-142.
- Oskeritzian, C. A. et al., 2010. Essential roles of sphingosine-1-phosphate receptor 2 in human mast cell activation, anaphylaxis, and pulmonary edema. *The Journal of Experimental Medicine*, März, pp. 465-474.
- Pappu, R. et al., 2007. Promotion of lymphocyte egress into blood and lymph by distinct sources of sphingosine-1-phosphate. *Science*, April, pp. 295-298.
- Peng, X. et al., 2004. Protective effects of sphingosine 1-phosphate in murine endotoxin-induced inflammatory lung injury. *Am J Respir Crit Care Med*, Juni, pp. 1245-1251.

- Pham, T. H. et al., 2010. Lymphatic endothelial cell sphingosine kinase activity is required for lymphocyte egress and lymphatic patterning. *The Journal of Experimental Medicine*, Januar, pp. 17-27.
- Póvoa, P. et al., 1998. C-reactive protein as an indicator of sepsis. *Intensive Care medicine*, Oktober, pp. 1052-1056.
- Póvoa, P. et al., 2005. C-reactive protein as a marker of infection in critically ill patients. *Clinical Microbiology and Infection*, Februar, pp. 101-108.
- Prakash, P., Krishna, K. & Bhatia, D., 2006. Usefulness of SAPS II Scoring System as an Early Predictor of Outcome in ICU Patients. *Journal, Indian Academy of Clinical Medicine*, Juli-September, pp. 202-205.
- Radue, E.-W. et al., 2012. Impact of fingolimod therapy on magnetic resonance imaging outcomes in patients with multiple sclerosis. *Archives of neurology*, Oktober, pp. 1259-1269.
- Ranieri, M. et al., 2012. Acute respiratory distress syndrome: the Berlin Definition. *The Journal of the American Medical Association*, Juni, pp. 2526-2533.
- Remick, D. G., 2007. Pathophysiology of Sepsis. *The American Journal of Pathology*, Mai, pp. 1435-1444.
- Rivers, E. et al., 2001. Early Goal-Directed Therapy in the Treatment of Severe Sepsis and Septic Shock. *New England Journal of Medicine*, November, pp. 1368-1377.
- Rosen, H. & Goetzl, E. J., 2005. Sphingosine 1-phosphate and its receptors: an autocrine und paracrine network. *Nature Reviews Immunology*, 1 Juli, pp. 560-570.
- Rosen, H. et al., 2013. Sphingosine-1-Phosphate and Its Receptors: Structure, Signaling, and Influence. *The Annual Review of Biochemistry*, März, pp. 637- 662.
- Sammani, S. et al., 2010. Differential Effects of Sphingosine 1-Phosphate Receptors on Airway and Vascular Barrier Function in the Murine Lung. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, Oktober, pp. 394-402.
- Sammani, S. et al., 2010. Differential Effects of Sphingosine 1-Phosphate Receptors on Airway and Vascular Barrier Function in the Murine Lung. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, Oktober, pp. 394-402.
- Sanchez, T. et al., 2003. Phosphorylation and Action of the Immunomodulator FTY720 Inhibits Vascular Endothelial Cell Growth Factor-induced Vascular Permeability. *The Journal of Biological Chemistry*, November, pp. 47281-47290.
- Sanchez, T. et al., 2007. Induction of vascular permeability by the sphingosine-1-phosphate receptor-2 (S1P2R) and its downstream effectors ROCK and PTEN. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, Juni, pp. 1312-1318.
- Schein, M. et al., 1990. Peritoneal Lavage in Abdominal Sepsis A Controlled Clinical Study. *Formerly Archives of Surgery*, September, pp. 1132-1135.
- Scherer, E. Q. et al., 2010. TNF α enhances microvascular tone and reduces blood flow in the cochlea via enhanced S1P signaling. *Stroke*, November, pp. 2618-2624.

Schneider, J. I., 2004. Rapid infectious killers. *Emergency Medicine Clinics of North America*, November, pp. 1099-1115.

Schortgen, F. et al., 2001. Effects of hydroxyethylstarch and gelatin on renal function in severe sepsis: a multicentre randomised study. *The Lancet*, März, pp. 911-916.

Schulte, W., Bernhagen, J. & Bucala, R., 2013. Cytokines in Sepsis: Potent Immunoregulators and Potential Therapeutic Targets- An Updated View. *Hindawi*, Juni.

Sepsis-Gesellschaft, D., 2010. *AWMF online*. [Online]
Available at: http://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/079-001I_S2k_Sepsis_Leitlinientext_01.pdf

Shimizu, T. et al., 2007. Sphingosine 1-Phosphate Receptor 2 Negatively Regulates Neointimal Formation in Mouse Arteries. *Circulation Research*, September, pp. 995-1000.

Singer, M. et al., 2016. The Third International Consensus Definition for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA*, Februar, pp. 801-810.

Spiegel, S. & Milstien, S., 2003. Sphingosine-1-phosphate: an enigmatic signalling lipid. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, Mai, pp. 397-407.

Spiegel, S. & Milstien, S., 2011. The outs and the ins of sphingosine-1-phosphate in immunity. *Nature Reviews Immunology*, Juni, pp. 403-415.

Tarrasóna, G. et al., 2011. The sphingosine-1-phosphate receptor-1 antagonist, W146, causes early and short-lasting peripheral blood lymphopenia in mice. *International Immunopharmacology*, November, pp. 1773-1779.

Thudichum, J. L. W., 1884. *A treatise on the chemical constitution of the brain*. London: Bailliere, Tindall and Cox.

Tillett, W. S. & Thomas Francis, J., 1930. Serological reactions in pneumonia with a non-protein somatic fraction of pneumococcus. *The Journal of Experimental Medicine*, September, pp. 561-571.

van Leeuwen, H. J. et al., 2003. Lipoprotein metabolism in patients with severe sepsis. *Critical Care Medicine*, Mai, pp. 1359-1366.

van Nieuw Amerongen, G. et al., 2008. Activation of RhoA by thrombin in endothelial hyperpermeability: role of Rho kinase and protein tyrosine kinases. *Circ Res*, pp. 335-340.

Venkataraman, K. et al., 2008. Vascular Endothelium As a Contributor of Plasma Sphingosine 1-Phosphate. *Circulation Research*, März, pp. 669-676.

Wallez Y, H. P., 2008. Endothelial adherens and tight junctions in vascular homeostasis, inflammation and angiogenesis. *Biochem Biophys Acta*, pp. 794-809.

Walzer, T. et al., 2007. Natural killer cell trafficking in vivo requires a dedicated sphingosine 1-phosphate receptor. *Nature Immunology*, Oktober, pp. 1337-1344.

Wang, L. et al., 2014. FTY720 (s)-phosphonate preserves sphingosine 1-phosphate receptor 1 expression and exhibits superior barrier protection to FTY720 in acute lung injury. *Critical care medicine*, pp. 189-199.

Wunderink, R. G., 2000. Clinical criteria in the diagnosis of ventilator-associated pneumonia. *Chest*, April, pp. 191-194.

Yatomi, Y. et al., 1997. Sphingosine 1-Phosphate, a Bioactive Sphingolipid Abundantly Stored in Platelets, Is a Normal Constituent of Human Plasma and Serum. *The Journal of Biochemistry*, Januar, pp. 969-973.

Yi, E. & Ulich, T., 1992. Endotoxin, interleukin-1, and tumor necrosis factor cause neutrophil-dependent microvascular leakage in postcapillary venules. *The American journal of pathology*, pp. 659-663.

Zhang, H. et al., 1991. Sphingosine-1-phosphate, a novel lipid, involved in cellular proliferation. *The Journal of Cell Biology*, Juli, pp. 155-167.

Zhang, L. et al., 2016. Sphingosine-1-phosphate Maintains Normal Vascular Permeability by Preserving Endothelial Surface Glycocalyx in Intact Microvessels. *Microcirculation*, Mai, pp. 301-310.

Zhao, Y. et al., 2011. Protection of LPS-induced murine acute lung injury by sphingosine-1-phosphate lyase suppression. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, August, pp. 426-435.

13 Lebenslauf

Lebenslauf wurde aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt.

14 Danksagung

Ich möchte mich hiermit bei Herrn Prof. Dr. med. C. Zöllner bedanken, der mir die Möglichkeit gegeben hat, diese Arbeit unter seiner Leitung durchzuführen. Auch für die mühevollen Arbeit des Korrekturlesens möchte ich mich herzlich bedanken.

Besonderen Dank auch an die gesamte CySep-Arbeitsgruppe für die freundliche Arbeitsatmosphäre, viele wertvolle Anregungen und stete Hilfsbereitschaft, die wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Bei meiner Familie, Christoph und meinen Freunden möchte ich mich ganz besonders herzlich bedanken für die uneingeschränkte, liebevolle und vielseitige Unterstützung während meines Studiums, ohne die diese Arbeit so nicht möglich gewesen wäre.

15 Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne (unzulässige) fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: