

Induktion der Eicosanoide bei Gesunden und Patienten mit Sepsis

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades

Dr. med.

an der Medizinischen Fakultät

der Universität Leipzig

eingereicht von: Ute Ludwig

Geburtsdatum / Geburtsort: 08.03.1986, Wolfen

angefertigt am:

Institut für Laboratoriumsmedizin,

Klinische Chemie und Molekulare Diagnostik,

Universitätsklinikum Leipzig

Betreuer:

Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Thiery

Dr. med. Mathias Brügel

Beschluss über die Verleihung des Doktorgrades vom: 15.12.2015

Inhaltsverzeichnis

I	Bibliographische Beschreibung	2
II	Abkürzungen	4
III	Einleitung	
	1. Epidemiologie und Definition der Sepsis.....	6
	2. Pathophysiologie der Sepsis.....	7
	3. Stellenwert und Limitationen labordiagnostischer Marker bei Sepsis.....	8
	4. Eicosanoide und Sepsis.....	10
	5. In-vitro LPS Vollblutaktivierungs-Modell für die Prüfung der Eicosanoidantwort auf Genexpressions- und Mediatorenebene.....	12
	6. Bestimmung von Eicosanoiden mittels LC-MS/MS.....	16
	7. Zielstellung der Arbeit.....	18
IV	Publikation	19
V	Zusammenfassung der Arbeit	29
VI	Literatur	32
VII	Erklärung über die eigenständige Abfassung der Arbeit	35
VIII	Lebenslauf	36
IX	Spezifizierung des wissenschaftlichen Beitrages zur Publikation	38
X	Danksagung	39

I. Bibliographische Beschreibung

Ute Ludwig

Induktion der Eicosanoide bei Gesunden und Patienten mit Sepsis

Universität Leipzig, Dissertation

39 S., 47 Lit., 7 Abb., 1 Publikation

Referat:

Ziel der vorliegenden Promotionsarbeit war die Untersuchung von Sepsis-assoziierten Veränderungen des Arachidonsäure (AA)-Metabolismus und die Identifikation differentiell regulierter AA-Metabolite mit Prüfung ihres diagnostischen Potentials bei Patienten mit Sepsis unter Anwendung eines in-vitro Lipopolysaccharid (LPS) Vollblutaktivierungs-Modells.

In Zellüberständen von nicht-aktiviertem und LPS-aktiviertem Heparinblut (25 Sepsis-Patienten, 15 Gesunde) wurden AA-Metabolite mittels Flüssigkeitschromatographie-Tandem-Massenspektrometrie analysiert. In einer unabhängigen Kohorte (10 Sepsis-Patienten, 3 Gesunde) wurden nach RNA-Isolation aus Zellmaterial zusätzlich Target-Gene des AA-Metabolismus (Cyclooxygenase (COX)-2 und mikrosomale Prostaglandin-E-Synthase (*mPGES*)-1 mittels quantitativer Reverse Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR) untersucht.

Es konnte eine differentielle Freisetzung von AA, AA-Analoga und der COX-assoziierten Metabolite Prostaglandin (PG) E₂, 11-Hydroxyeicosatetraensäure (HETE) und Thromboxan

(TX) B₂ zwischen Patienten und gesunden Kontrollpersonen gezeigt werden. Sepsis-Patienten wiesen dabei gegenüber Gesunden eine deutlich reduzierte Freisetzung von AA und den COX-assoziierten Metaboliten 11-HETE und PGE₂ auf. Das Ausmaß der reduzierten Mediatorenfreisetzung bei Sepsis-Patienten war mit der Schwere der Erkrankungssymptomatik und dem klinischen Outcome assoziiert. Auf Genexpressionsebene zeigte sich eine reduzierte Induzierbarkeit der *COX-2* mRNA-Expression bei Sepsis-Patienten gegenüber Gesunden, jedoch eine erhaltene Induzierbarkeit auf der Ebene der *mPGES-1*.

II. Abkürzungen

SIRS	Systemic Inflammatory Response Syndrome
PAMP	Pathogen-associated Molecular Pattern
PRR	Pathogen Recognition Receptor
IL-1	Interleukin 1
TNF α	Tumornekrosefaktor α
PCT	Procalcitonin
CRP	C-reaktives Protein
AA	Arachidonsäure
PLA ₂	Phospholipase A ₂
COX	Cyclooxygenase
CYP 450	Cytochrom P 450
LOX	Lipoxygenase
PG	Prostaglandin
TX	Thromboxan
HETE	Hydroxyeicosatetraensäure
LT	Leukotrien
LPS	Lipopolysaccharid
NF κ B	Nuclear Factor κ B
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
LC	Liquid Chromatography (Flüssigkeitschromatographie)

MS	Massenspektrometrie
ESI	Elektrospray-Ionisation
MRM	Multiple Reaction Monitoring
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase Chain Reaction
mRNA	Messenger Ribonucleic Acid
mPGES	mikrosomale Prostaglandin E-Synthase

III. Einleitung

1. Epidemiologie und Definition der Sepsis

Die Sepsis ist weltweit eine der häufigsten Ursachen für Morbidität und Mortalität und betrifft mit zunehmender Inzidenz nahezu alle klinischen Fachdisziplinen. Allein in Deutschland erkranken pro Jahr etwa 150.000 Menschen an einer Sepsis, davon ca. 50 % an einer schweren Sepsis oder einem septischen Schock [1]. Trotz modernster intensivmedizinischer Maßnahmen konnte die Letalität von über 50 % bei schwerer Sepsis kaum reduziert werden, was nicht zuletzt auf der noch immer sehr häufig verzögerten Diagnosestellung und einer damit verbundenen Verzögerung in der Einleitung adäquater Therapiemaßnahmen basiert [2].

Die Sepsis wird anhand der 2001 vom American College of Chest Physicians (ACCP) und der Society of Critical Care Medicine (SCCM) konsentierten Kriterien definiert [3]. Grundlage einer jeden Sepsis ist eine systemische inflammatorische Reaktion (SIRS: Systemic Inflammatory Response Syndrome), die durch ein mikrobiologisch nachgewiesenes oder klinisch vermutetes infektiöses Agens hervorgerufen wird. Als SIRS-Kriterien gelten 1) Körpertemperatur $>38.5\text{ °C}$ oder $<36\text{ °C}$, 2) Herzfrequenz $> 90/\text{min}$, 3) Atemfrequenz $> 20/\text{min}$ oder $\text{PaCO}_2 < 33\text{ mmHg}$, sowie 4) Blutbildveränderungen wie Leukozytose $> 12 \times 10^9/\text{ml}$, Leukopenie $< 4 \times 10^9/\text{ml}$ oder einem Anteil von mehr als 10 % an unreifen neutrophilen Granulozyten im Blutaussstrich. Bei Vorliegen von 2 dieser 4 Kriterien und zugrundeliegender Infektion ist die Diagnose Sepsis zu stellen [4]. Bei zusätzlichen Symptomen des Versagens eines oder mehrerer Organe spricht man von schwerer Sepsis. Die Erfordernis vasokonstriktiv wirksamer Medikamente zur Aufrechterhaltung stabiler Kreislaufverhältnisse definiert den septischen Schock [5].

2. Pathophysiologie der Sepsis

Das Krankheitsbild der Sepsis ist charakterisiert sowohl durch pro-, als auch antiinflammatorische Prozesse, deren jeweilige Dominanz sich im Rahmen verschiedener Erkrankungsverläufe oder -phasen sehr variabel darstellt [6]. In der Auslösung dieser Prozesse spielt das Erkennen von mikrobiellen Bestandteilen, sogenannter „Pathogen associated molecular patterns“ (PAMPs), durch spezifische Rezeptoren, sogenannte „Pathogen recognition receptors“ (PRRs), an der Oberfläche von Immunzellen wie beispielsweise Monozyten und Makrophagen, eine entscheidende Rolle [7]. Die Aktivierung dieser Rezeptoren führt über eine intrazelluläre Signalkaskade zur Induktion des Inflammasoms, dabei handelt es sich um proinflammatorische Gene und deren Genprodukte wie die Zytokine Interleukin (IL) -1, IL-6 und Tumornekrosefaktor (TNF) α [8]. Von ganz entscheidender Bedeutung in der Proinflammation sind weiterhin das Komplement- sowie das Gerinnungssystem. Auf der anderen Seite spielen in der Pathophysiologie antiinflammatorische Prozesse eine entscheidende Rolle [9], so ist eine verminderte Aktivierbarkeit durch mikrobielle Reize und eine gesteigerte Apoptose von Immunzellen, sowie eine Inhibition der Bildung proinflammatorischer Zytokine durch neuroendokrine Netzwerke mit der Folge einer Immunsuppression charakteristisch [10].

Je nach Erregervirulenz und spezifischer Suszeptibilität des Patienten können Entzündungsprozesse einerseits zur Ausheilung der Infektion, andererseits jedoch auch zur Aggravation der Erkrankung mit Organschädigung, führen [11]. Proinflammatorische Prozesse, originäre Bedeutung ist die Pathogenabwehr, werden dabei primär für Organschäden bei schwerer Sepsis verantwortlich gemacht, antiinflammatorische Prozesse, die primär einer überschießenden Entzündungsantwort mit assoziierter Gewebsschädigung entgegenwirken, werden insbesondere für die gesteigerte Suszeptibilität für Sekundärinfektionen verantwortlich gemacht [10]. Eine dysbalancierte Entzündungsreaktion führt zu Fieberentwicklung,

Vasodilatation und Endothelläsion [11], Dysregulation von Gerinnungsprozessen sowie zur Störung der Organfunktionen durch pathologische Mikrozirkulation, mitochondriale Dysfunktion [12], konsekutiven Sauerstoffmangel und Apoptose von Parenchymzellen [13]. Organschädigungen treten dabei insbesondere auf im Bereich des respiratorischen und kardiovaskulären Systems, des zentralen Nervensystems und der Niere [14, 15].

3. Stellenwert und Limitationen labordiagnostischer Marker bei Sepsis

Indikationen für die Durchführung von Labordiagnostik bei Sepsis sind neben einer sicheren und vor allem frühzeitigen Diagnosestellung mit Abgrenzung infektiöser von nicht-infektiösen Erkrankungsursachen insbesondere Verlaufsbeurteilung und Prognoseabschätzung der Erkrankung, ein Therapiemonitoring sowie die Darstellung von Organbeteiligungen. In den letzten Jahren wurde das diagnostische Potential einer Vielzahl von zellulären, vaskulären, hämostaseologischen Faktoren oder auch von Markern der Organdysfunktion bei Sepsis geprüft [16-20]. Aufgrund sehr variabler und zum Teil widersprüchlicher Studiendaten, zum Teil mangelnder Fallzahlen, eingeschränkter Spezifitäten und der nur sehr eingeschränkten Abbildung des Schweregrades der Erkrankung besitzt der überwiegende Teil der geprüften Parameter derzeit keinen klinischen Stellenwert [21, 22]. Einzug in die spezielle Sepsis-Diagnostik konnten vorwiegend Akut-Phase-Proteine wie C-reaktives Protein (CRP) oder Procalcitonin (PCT) und Zytokine wie IL-6 finden. Mehrere klinische Studien deuten darauf hin, dass insbesondere PCT zur Sicherung der klinischen Sepsisdiagnose beitragen kann. So ist die PCT-Konzentration assoziiert mit dem Schweregrad der Sepsis und zeigt bei bakteriellen, insbesondere gramnegativen Infektionen, die bedeutendsten Anstiege. Basierend auf der kurzen Halbwertszeit von ca. 12 Stunden ist eine Verlaufsbeurteilung mit Beurteilung des Therapieerfolges möglich [23]. Neuere Studien deuten darauf hin, dass konsekutive Bestimmungen von PCT ein Deeskalations-Monitoring einer antibiotischen Therapie erlauben [24]. Limitiert wird der diagnostische Wert von PCT jedoch durch die interindividuelle

Variabilität der PCT-Freisetzung, den unspezifischen Anstieg bei Trauma oder kardiogenem Schock, auch ohne Vorliegen einer bakteriellen Infektion, sowie die sehr hohen Testkosten [25].

Für CRP zeigten wissenschaftliche Studien gegenüber PCT einen reduzierten diagnostischen Wert, bedingt durch das verzögerte Ansprechverhalten, die längere Halbwertszeit von ca. 24 Stunden und die geringere Spezifität [26], geringfügig schlechter schnitt CRP weiterhin im Monitoring einer antibiotischen Therapie ab [27].

Das proinflammatorische Zytokin IL-6 ist nach einem infektiösen Reiz zeitlich noch vor PCT nachweisbar und wird daher insbesondere als Frühmarker der Sepsis eingesetzt [26, 28]. Jedoch ist IL-6 nicht infektions- sondern inflammationsspezifisch und starken interindividuellen Schwankungen unterlegen [29]. Zusätzlich erschwert die sehr kurze Halbwertszeit die Befundinterpretation. Auch wurde eine im Vergleich zu PCT weniger gute Korrelation zur Krankheitsschwere gezeigt [30].

Basierend auf der hohen Komplexität der Sepsis-Erkrankung mit Einbeziehung zahlreicher Organsysteme und der verschiedenen diagnostischen Fragestellungen können die genannten Marker in der Einzelbetrachtung die Pathophysiologie und den klinischen Verlauf nach wie vor nur sehr unzureichend abbilden. Für eine frühzeitige und spezifische Diagnosestellung, verbunden mit einer prognoseentscheidenden Therapieeinleitung, werden daher derzeit insbesondere multiparametrische Diagnoseansätze in verschiedenen klinischen Studien geprüft [29].

4. Eicosanoide und Sepsis

Eicosanoide stellen eine Gruppe von biologisch aktiven Lipid-Mediatoren dar, die sich überwiegend aus Arachidonsäure (AA) ableiten [31, 32]. AA selbst wird Phospholipase (PL) A₂ -vermittelt aus in Zellmembranen gebundenen Phospholipiden freigesetzt. Die anschließende Metabolisierung über untergeordnete Enzymsysteme, zu denen Cytochrom P (CYP) 450-Systeme, Cyclooxygenasen (COX) und Lipoxygenasen (LOX) gehören, erlaubt die Bildung eines breiten Spektrums verschiedener Metabolite (Abb. 1) [31, 33, 34].

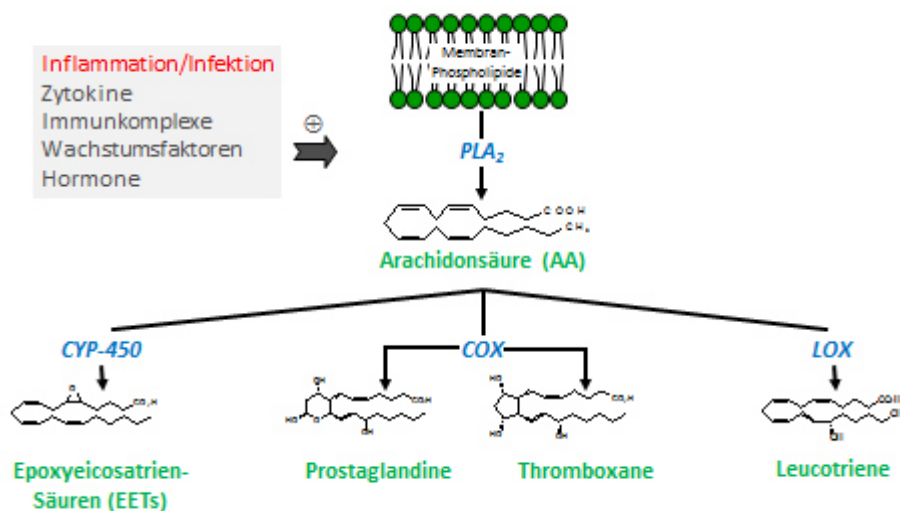


Abb. 1. Arachidonsäure-abhängige Bildung von Eicosanoiden. Metabolite in grün, Enzyme in blau dargestellt. PLA₂: Phospholipase A₂; CYP-450: Cytochrom P 450; COX: Cyclooxygenase; LOX: Lipoxygenase. Modifiziert nach Astudillo, A.M., et al., *Biochim Biophys Acta*, 2012. 1821(2): p. 249-56.

Eicosanoide sind Teil eines sehr komplexen regulatorischen Netzwerks. Bei Entzündungen werden diese von Granulozyten, Makrophagen, Neutrophilen, Thrombozyten oder Mastzellen gebildet, wobei Quantität und Qualität der Eicosanoidantwort von der jeweiligen Zelllinie und deren Aktivierungsgrad abhängen [33]. Die verschiedenen Metabolite haben sehr unterschiedliche und zum Teil auch gegenläufige physiologische und pathophysiologische Bedeutung. Als pro- und antiinflammatorische Faktoren (Prostaglandin (PG) H₂, PGE₂),

chemotaktisch wirksame Faktoren (Leukotrien (LT) B₄), plättchenaggregierende Faktoren und Kontraktoren glatter Muskulatur (Thromboxan (TX) A₂), modifizierende Faktoren der vaskulären Permeabilität (Leukotriene) und potente Vasodilatoren (PGE₂ und PGI₂) sind diese zellulären Mediatoren in der Pathogenese einer Vielzahl inflammatorischer Erkrankungen von Bedeutung [34-37].

Sepsis-assoziierte Veränderungen des AA-Metabolismus und die Möglichkeit der Anwendung von AA-Metaboliten als diagnostische Marker bei Sepsis sind bisher nur sehr unzureichend untersucht, die vorhandene wissenschaftliche Datenlage zur Einordnung von Eicosanoiden bei Sepsis zum Teil sehr widersprüchlich. Zum einen erschweren die vielfältigen, teilweise gegensätzlichen Effekte der verschiedenen AA-Metabolite die wissenschaftliche Einordnung, zum anderen komplizieren die chemische und biologische Komplexität mit hoher struktureller Übereinstimmung verschiedener Metabolite, sehr niedrigen Blutkonzentrationen und sehr kurzen Halbwertszeiten mit schneller Degradation den quantitativen Nachweis und damit die Prüfung als potentielle diagnostische Marker [38]. Basierend auf den zentralen pathophysiologischen Effekten und der übergeordneten Modulationsfunktion in der Entzündungsreaktion lassen sich Eicosanoide jedoch durchaus als bedeutende Faktoren in der Pathogenese und als potentielle Biomarker der Sepsis einordnen (Abb. 2) [31, 39, 40].

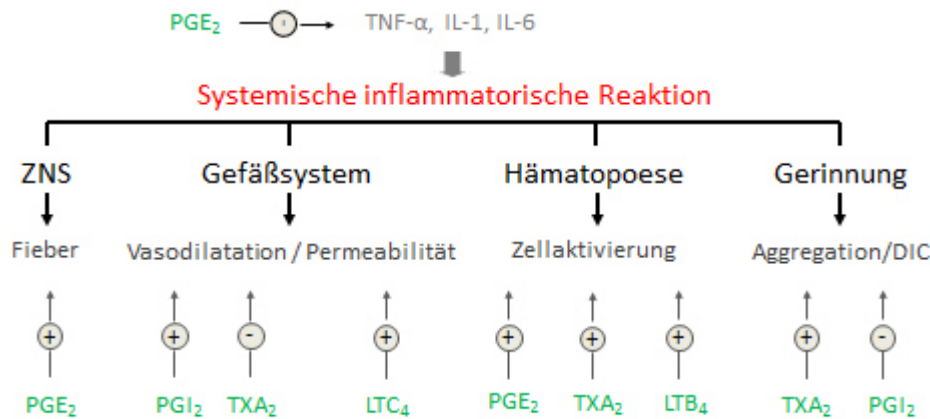


Abb. 2. **Pathophysiologische Bedeutung verschiedener AA-Metabolite bei SIRS/Sepsis.** (DIC: Disseminated intravascular coagulation). +: aktivierender Effekt; -: inhibierender Effekt. Entsprechend der Publikation von Bruegel, M. et al., *LaboratoriumsMedizin*, 2009. 33 (6): p. 333–339.

5. In-vitro LPS Vollblutaktivierungs-Modell für die Prüfung der Eicosanoidantwort auf Genexpressions- und Mediatorebene

Aufgrund der überwiegend pulsatilen Freisetzung, der niedrigen Konzentration und der kurzen Halbwertszeit von Eicosanoiden sind diese in nativem Blut selbst bei septischen Zuständen kaum messbar. Ein Element dieser Promotionsarbeit war daher die Etablierung und Standardisierung eines in-vitro Lipopolysaccharid (LPS) Vollblutaktivierungs-Modells, das die Untersuchung der differentiellen Eicosanoidantwort bei Gesunden und Patienten mit Sepsis erlaubt. Nach entsprechender Vollblutaktivierung wurden AA-Metabolite im Zellkulturüberstand mittels Flüssigchromatographie/Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS) [41] bestimmt, im Zellunterstand wurden Genexpressionsanalysen von Target-Genen des AA-Metabolismus durchgeführt.

In der Literatur ist LPS als potenter Induktor der Eicosanoidantwort durch Aktivierung Nuclear factor (NF) -κB-abhängiger Signalkaskaden beschrieben [8, 42-44] und wurde daher als Aktivator für das Vollblutaktivierungs-Modell eingesetzt. In der Folge wurden

Standardisierungsexperimente zur Auswahl der geeigneten Probenmatrix, zur Optimierung der Inkubationsdauer mit LPS sowie der eingesetzten LPS-Konzentration durchgeführt. Wie in Abbildung 3 dargestellt, konnte die höchste Intensität der Eicosanoidantwort bei Anwendung von Lithium (Li)-Heparin als Antikoagulans gezeigt werden, eine deutlich geringere Intensität bei Anwendung von Citrat, eine fehlende Induzierbarkeit bei Anwendung von Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) als Antikoagulans. Die reduzierte bzw. nicht induzierbare Eicosanoidantwort bei Anwendung von Citrat bzw. EDTA ist auf die Calcium-Abhängigkeit der jeweiligen metabolisierenden Enzyme zurückzuführen [33], als Matrix für das Aktivierungs-Modell wurde daher Li-Heparinblut ausgewählt.

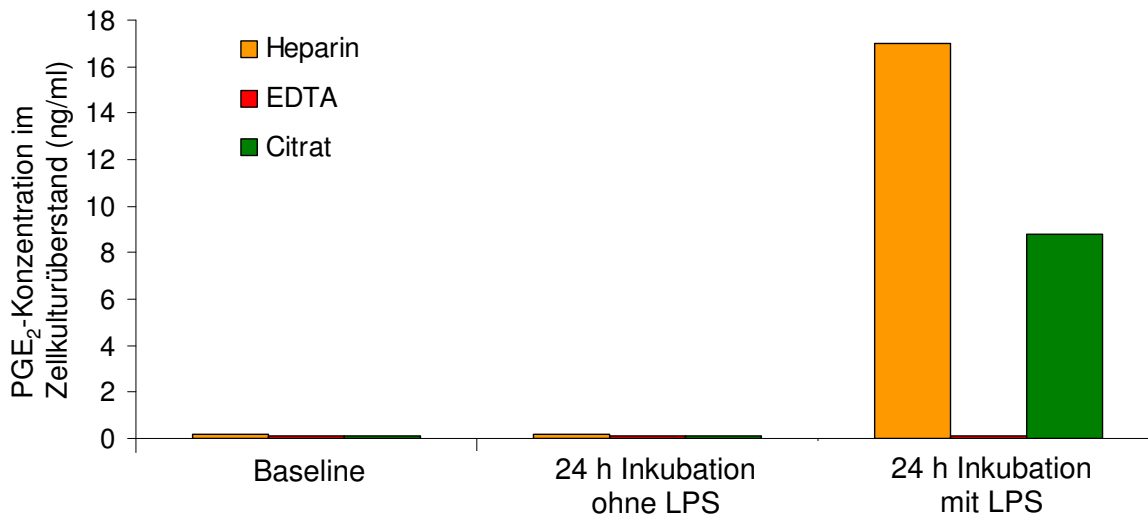


Abb. 3. Antikoagulans-Effekt auf die Freisetzung von PGE₂ in Vollblut. Heparin-, EDTA- und Citrat-Vollblut eines gesunden Blutspenders wurde für 24 h mit/ohne LPS inkubiert. Baseline: Ausgangswert vor Inkubation, Mitte: PGE₂-Konzentration nach Inkubation des Vollblutes für 24 h ohne LPS, Rechts: PGE₂-Konzentration nach Aktivierung des Vollblutes für 24 h mit 0,1 µg/ml LPS. Bei Anwendung von EDTA als Antikoagulans zeigte sich eine fehlende PGE₂-Freisetzung, bei Anwendung von Citrat als Antikoagulans eine deutlich verminderte PGE₂-Freisetzung, im Vergleich zur Anwendung von Heparin als Antikoagulans.

In weiteren Standardisierungsexperimenten wurde die Aktivierung mit verschiedenen LPS-Konzentrationen bei Anwendung verschiedener Inkubationszeiten untersucht (Abb. 4). Es konnte eine Konzentrations- und Zeitabhängigkeit der LPS-vermittelten Eicosanoid-Freisetzung gezeigt werden, mit maximaler Intensität bei Anwendung einer LPS-Konzentration von 10 µg/ml und einer Inkubationszeit von 24 h. Auch bei einer LPS-Konzentration von 1 µg/ml zeigte sich eine deutliche Induktion der Eicosanoidantwort, bei maximaler Viabilität in der Trypan-Blau-Methode (> 95 %). Für die Aktivierungsexperimente nach Standardprotokoll wurde daher in der Folge eine LPS-Konzentration von 1 µg/ml eingesetzt über eine Inkubationszeit von 24 h (Abb. 5).

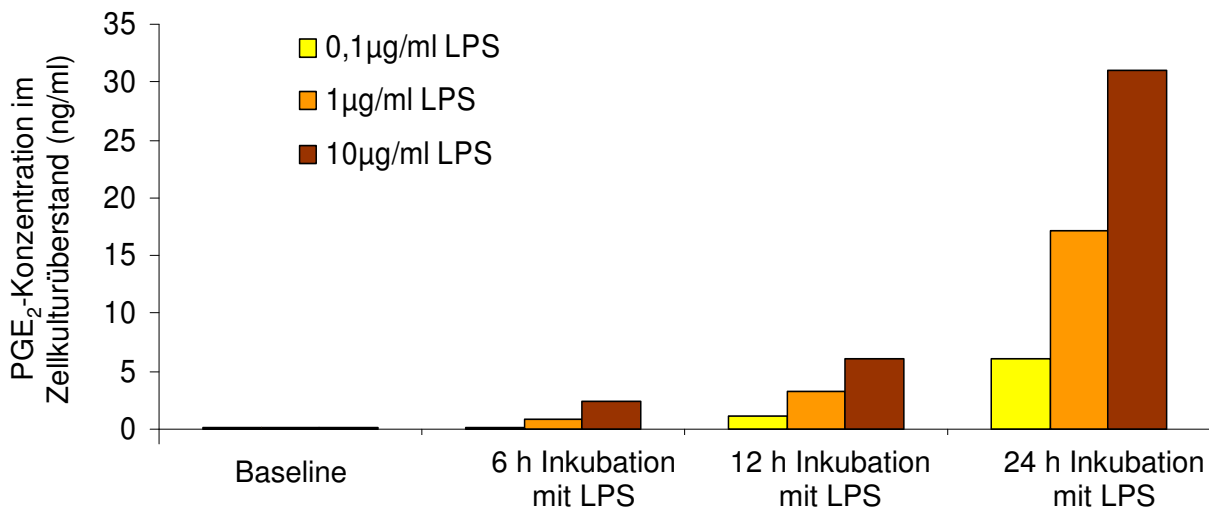


Abb. 4. Abhängigkeit der PGE₂-Freisetzung von LPS-Konzentration und Inkubationszeit. Heparin-Vollblut eines gesunden Blutspenders wurde für 6, 12 bzw. 24 h mit verschiedenen LPS-Konzentrationen (0,1 µg/ml, 1.0 µg/ml und 10 µg/ml) inkubiert. Es zeigte sich eine Konzentrations- und Zeitabhängigkeit mit maximaler PGE₂-Freisetzung bei Anwendung einer LPS-Konzentration von 10 µg/ml und einer Inkubationszeit von 24 h.

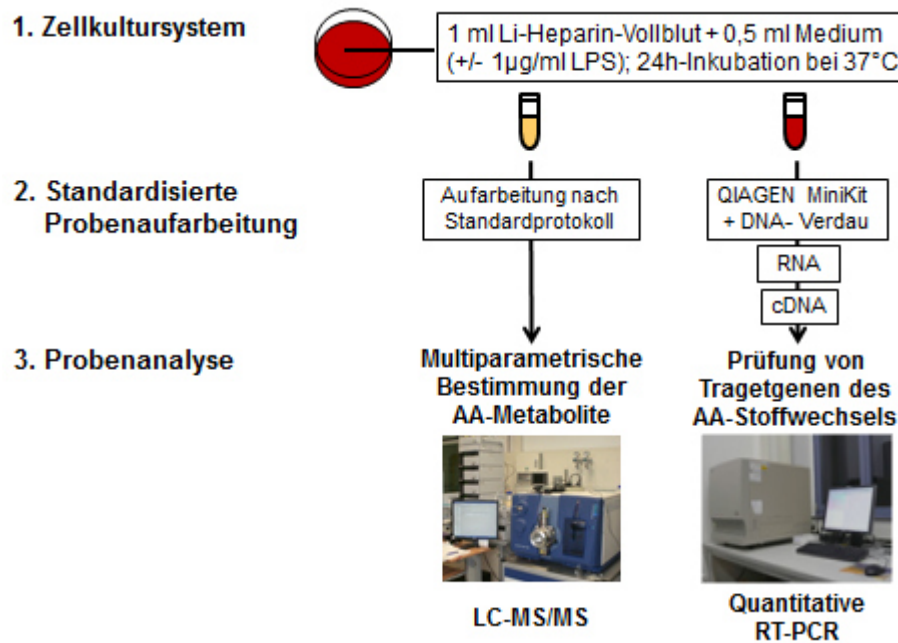


Abb. 5. Standardisiertes in-vitro LPS Vollblutaktivierungs-Modell für die Prüfung der Eicosanoidantwort auf Mediatoren- und Genexpressionsebene. Li-Heparin-Vollblut wurde für 24 h mit/ohne LPS (1 µg/ml) in Zellkulturschalen bei 37°C inkubiert. Nach standardisierter Probenaufarbeitung erfolgte die multiparametrische Bestimmung der AA-Metabolite mittels LC-MS/MS bzw. eine Prüfung der Targetgene des AA-Stoffwechsels mittels quantitativer RT-PCR.

6. Bestimmung von Eicosanoiden mittels LC-MS/MS

Die im Rahmen der vorliegenden Promotionsarbeit für die Detektion von AA-Metaboliten eingesetzte Methode basiert auf der Kopplung von Flüssigchromatographie zur Trennung der Metabolite anhand unterschiedlicher Retentionszeiten bei unterschiedlicher Polarität mit einem Triple-Quadrupol-Massenspektrometer, der eine spezifische Metabolit-Detektion anhand des spezifischen Gewichtes und der molekularen Struktur erlaubt (Abb. 6). Die Metabolite können im Massenspektrometer nur in ionisierter Form nachgewiesen werden, weshalb eine Vorbehandlung mittels Elektrospray-Ionisation (ESI, Ionenquelle) erfolgen muss. Bei der sogenannten Liquid-Chromatographie (LC)-Tandem Massenspektrometrie (MS/MS) wird nach chromatographischer Vortrennung aus einem Ionenstrom zunächst mithilfe eines Quadrupol-Massenfilters das intakte Molekül-Ion eines Zielanalyten selektiert (Mutter-Ion). Diese Mutter-Ionen werden in die sogenannte Kollisionszelle geleitet, in die mit minimalem Fluss Stickstoff einströmt. Die Übertragung von Stoßenergie auf den Zielanalyten bewirkt Bindungsbrüche und Umlagerungen, wobei Fragmente entstehen (Produkt-Ionen oder Tochter-Ionen). Der Produkt-Ionen-Strom gelangt nun in einen zweiten, nachgeschalteten Quadrupol-Massenfilter, der ein definiertes Produkt-Ion selektiert und dem Ionendetektor zuführt. Auf diese Weise ist eine sehr spezifische Detektion möglich, die auf dem individuellen Fragmentationsverhalten einer Substanz bei Nachweis spezifischer Retentionszeiten und spezifischer Massenübergänge beruht. Ein Chromatogramm einer Eicosanoid-Standardlösung ist in Abbildung 7 exemplarisch dargestellt. In unseren Untersuchungen wurden parallel 55 definierte Massenübergänge untersucht (MRM – Multiple Reaction Monitoring), womit eine gleichzeitige Detektion zahlreicher Eicosanoidmetabolite ermöglicht wurde. Die Quantifizierung dieser Metabolite erfolgte über eine externe Kalibrierung anhand des Flächenverhältnisses des Analyten zu einem internen Standard, der mit Deuterium – einem Wasserstoffatom mit zusätzlichem Neutron – markiert ist. .

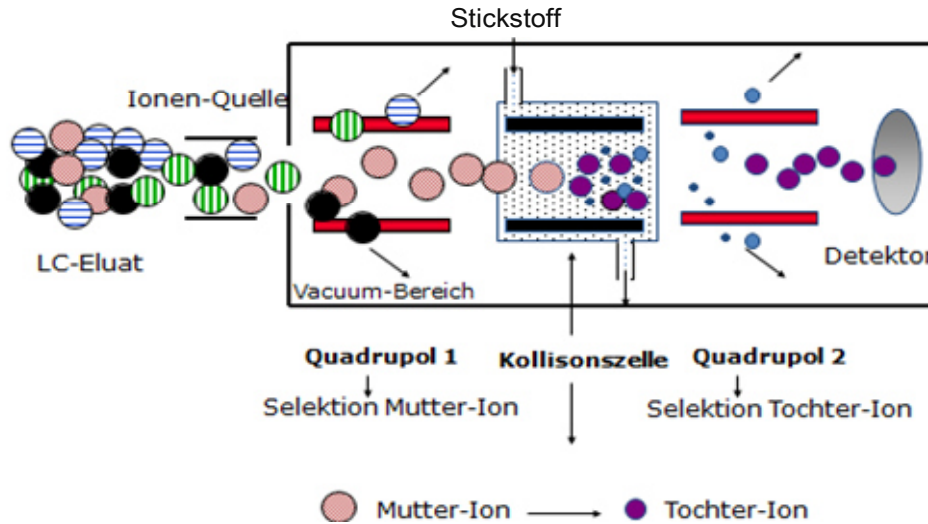


Abb. 6. Prinzip der LC-MS/MS. Nach Flüssigchromatographie und Ionisation erfolgt im ersten Quadrupol-Massenfilter die Selektion eines intakten Molekül-Ions (Mutter-Ion). In der Kollisionszelle werden Fragment-Ionen (Produkt-Ionen oder Tochter-Ionen) gebildet. Diese werden im zweiten Quadrupol selektioniert und mittels eines Ionendetektors analysiert. Modifiziert nach Vogeser, M. et al., Dtsch Arztebl, 2007. 104 (31): p. 2194-2200.

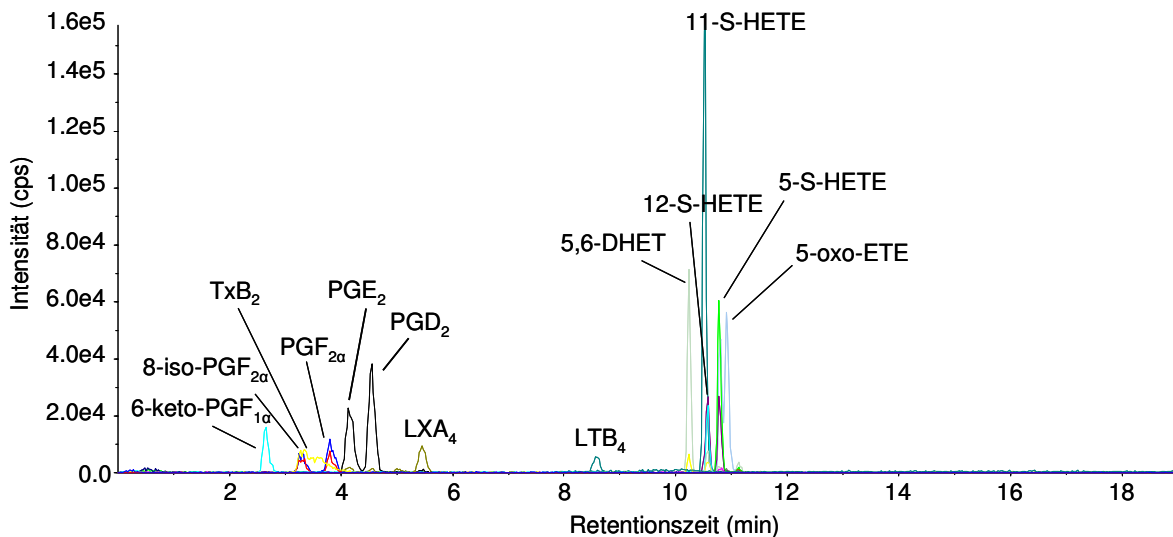


Abb. 7. Beispielhaftes Chromatogramm einer LC-MS/MS-Analyse einer Eicosanoid-Standardlösung. Die Höhe eines Peaks entspricht der Signalintensität eines definierten Massenübergangs, der einem bestimmten Metabolit zugeordnet wird. cps = counts per second (Impulse pro Sekunde). Eine Trennung verschiedener Metabolite ist anhand unterschiedlicher Retentionszeiten in der Flüssigchromatographie möglich.

7. Zielstellung der Arbeit

Ziel dieser Promotionsarbeit war es, Sepsis-assoziierte Veränderungen des AA-Stoffwechsels unter Anwendung des standardisierten LPS Vollblutaktivierungs-Modells zu untersuchen und das diagnostische Potential differentiell regulierter AA-Metabolite bezüglich des Schweregrades der Sepsis und der Prognoseeinordnung zu prüfen. Bei 35 Sepsis-Patienten und 15 gesunden Probanden wurde hierzu an zwei verschiedenen Zeitpunkten eine standardisierte LPS Vollblutaktivierung mit anschließender multiparametrischer Eicosanoid-Bestimmung im Zellkulturüberstand durchgeführt. Zum weiteren Verständnis der regulatorischen Zusammenhänge wurden in einer unabhängigen Kohorte von 10 Sepsis-Patienten und 3 gesunden Probanden im Zellunterstand zusätzlich Target-Gene des AA-Metabolismus untersucht. Die Ergebnisse dieser Promotionsarbeit konnten im Rahmen der beiliegenden Publikation im Journal „Critical Care Medicine“ publiziert werden (Bruegel M, Ludwig, U et al., Sepsis-associated changes of the arachidonic acid metabolism and their diagnostic potential in septic patients. Crit Care Med. 2012;40(5):1478-86).

IV. Publikation

Sepsis-associated changes of the arachidonic acid metabolism and their diagnostic potential in septic patients*

Mathias Bruegel, MD; Ute Ludwig; Alisa Kleinhempel; Sirak Petros, MD; Linda Kortz, PhD; Uta Ceglarek, PhD; Lesca Miriam Holdt, MD, PhD; Joachim Thiery, MD; Georg Martin Fiedler, MD

Objectives: Sepsis-associated changes of the arachidonic acid metabolism and the utility of arachidonic acid metabolites for the diagnosis of sepsis have been poorly investigated so far. Therefore, the primary objective of our study was to screen for differentially regulated arachidonic acid metabolites in septic patients using a lipopolysaccharide whole-blood model and to investigate their diagnostic potential.

Design: Prospective, observational, single-center, clinical study.

Setting: Intensive care unit at University Hospital Leipzig.

Patients: Thirty-five patients (first cohort 25 patients, second cohort 10 patients) meeting the criteria for severe sepsis or septic shock were enrolled. Eighteen healthy volunteers (first cohort 15 subjects, second cohort 3 subjects) were enrolled as controls.

Interventions: None.

Measurements and Main Results: Arachidonic acid and its metabolites were investigated in supernatants of nonactivated (baseline) and lipopolysaccharide-activated heparinized whole blood of healthy subjects ($n = 15$) and septic patients ($n = 25$) by solid phase extraction and subsequent liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Arachidonic acid, arachidonic acid analogues, and the cyclooxygenase-associated metabolites prostaglandin E_2 ,

11-hydroxyeicosatetraenoic acid, and thromboxane B_2 were identified as differentiating metabolites between septic patients and healthy subjects. Some of these compounds, including arachidonic acid, its analogues, and the cyclooxygenase metabolites prostaglandin E_2 and thromboxane B_2 differed at baseline. The inducibility of arachidonic acid and the cyclooxygenase metabolites 11-hydroxyeicosatetraenoic and prostaglandin E_2 were reduced by 80% to 90% in septic patients. The degree of the inducibility was associated with severity of sepsis and clinical outcome. A reduced inducibility of *COX-2* but preserved inducibility of mPG-ES-1 on gene expression level were confirmed in an independent cohort of septic patients ($n = 10$) by quantitative reverse-transcription polymerase chain reaction compared to healthy controls ($n = 3$).

Conclusions: Arachidonic acid metabolism is markedly affected in patients with sepsis. Our data suggest that the analysis of arachidonic acid metabolites in an *in vitro* whole blood activation model may be a promising approach for risk estimation in septic patients that has to be further evaluated in subsequent large-scale clinical studies. (Crit Care Med 2012; 40: 1478–1486)

KEY WORDS: arachidonic acid metabolites; eicosanoids; lipopolysaccharide; sepsis; whole blood

Eicosanoids are lipid-signaling molecules primarily generated from arachidonic acid (AA), which is released by phospholipase A_2 enzymes from membrane phospholipids. The subsequent enzymatic metabolization via cyclooxygenase (COX), cytochrome P450, and lipoxygenase pathways or via nonenzymatic peroxidation mediates the generation of a broad spectrum of eicosanoids

(1). As proinflammatory molecules (prostaglandin [PG] H_2), chemoattractants (leukotriene B_4), platelet (PLT) aggregation factors, and contractors of smooth muscle cells (thromboxane A_2), modifiers of vascular permeability (leukotrienes) and potent vasodilators (PGE $_2$ and PGI $_2$), these cell-derived mediators are involved in the pathogenesis of inflammatory diseases and sepsis (2, 3). Based on these central pathophysiological effects and their

superordinate modulatory function on inflammatory reactions, eicosanoids can be considered as biomarkers for sepsis (4, 5). However, sepsis-associated changes of the AA metabolism and its diagnostic potential have been poorly investigated so far because of the analytical difficulties as well as the chemical and biological complexity of eicosanoids, which are characterized by a very short half-life and a rapid degradation. Recently, different methods based on liquid chromatography combined with tandem mass spectrometry were developed for the analysis of AA metabolites in biological fluids, allowing specific, accurate, and simultaneous analysis of eicosanoid profiles as a whole-systems biology approach.

The aim of the present prospective, observational, single-center, clinical study was to investigate sepsis-associated changes of the AA metabolism and to screen for differentially regulated AA metabolites

***See also p. 1663.**

From the Institute of Laboratory Medicine (MB, UT, AK, LK, UC, MH, JT, GMF), Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics, University Hospital Leipzig, Leipzig; Department of Internal Medicine (SP), Intensive Care Unit, University Hospital Leipzig, Leipzig; Leipzig Interdisciplinary Research Cluster of Genetic Factors (LK, UC, MH, JT), Clinical Phenotypes and Environment, Leipzig, Germany.

Present affiliation for Dr. Bruegel: Institute of Clinical Chemistry, Ludwig-Maximilians-University Munich, Munich, Germany.

Present affiliation for Dr. Fiedler: University Institute of Clinical Chemistry, Inselspital, University Hospital Bern, Bern, Switzerland.

Drs. Bruegel and Ludwig contributed equally to this work.

Supplemental digital content is available for this article. Direct URL citations appear in the printed text and are provided in the HTML and PDF versions of this article on the journal's Web site (<http://journals.lww.com/ccmjournal>).

The authors have not disclosed any potential conflicts of interest.

For information regarding this article, E-mail: Mathias.Bruegel@med.uni-muenchen.de

Copyright © 2012 by the Society of Critical Care Medicine and Lippincott Williams & Wilkins

DOI: 10.1097/CCM.0b013e3182416f05

using a lipopolysaccharide (LPS) *in vitro* whole-blood activation model with subsequent multiparametric liquid chromatography combined with tandem mass spectrometry analysis. Furthermore, we investigated the diagnostic potential of differentially released eicosanoids in sepsis with regard to disease severity and prognosis.

MATERIALS AND METHODS

Study Population. In total, 35 septic patients divided into two study cohorts were enrolled within 12 hrs of admission to the medical intensive care unit (ICU) at the University Hospital Leipzig, Germany. All patients met the criteria for severe sepsis or septic shock according to the International Sepsis Definitions Conference consensus criteria (6). They received early goal-directed therapy consisting of adequate volume administration, appropriate antibiotics, and optimal oxygen delivery. Patients of the first study cohort (n = 25) were used for identification and quantification of differentially released AA metabolites. They were further classified regarding their clinical course of disease for association studies. A favorable clinical course was defined as sepsis survival and transfer to a general ward within a period of 2 wks, whereas an unfavorable clinical course was defined as death within a period of 2 wks or need for prolonged ICU treatment without clinical improvement. Patients of the second study cohort (n = 10) were used for investigation of target genes of the AA metabolism and for analysis of metabolic activity and endotoxin plasma concentrations. Demographic and clinical data including the Simplified Acute Physiology Score II were documented for all patients. Healthy volunteers not using anti-inflammatory drugs or not suffering from infectious diseases within 14 days before whole-blood testing were enrolled as controls (n = 18). Fifteen and three healthy subjects were used as controls for the first and second patient study cohort. Their differential blood counts displayed normal cell counts and blood smears showed no signs of inflammatory activation or infection. The study meets the ethical standards of the Declaration of Helsinki. It has been approved by the Ethics Committee of the Medical Faculty of the University Leipzig, Germany.

Specimen Collection. Whole blood was collected into 7.5-mL lithium heparin tubes (S-Monovette-system; Sarstedt, Nümbrecht, Germany) through indwelling venous catheters in all patients. Blood collections were performed on admission to ICU and on day 3 of therapy. Whole blood from healthy subjects was collected by peripheral venous blood puncture using Sarstedt Safety-Multifly needles (800 mm), with subsequent collection into 7.5 mL lithium heparin tubes (S-Monovette-system; Sarstedt). After blood collection, whole blood samples were

immediately used for activation experiments. Heparin plasma was used for analysis of LPS concentration after centrifugation of whole blood for 5 mins at 4000g. Plasma was kept frozen at -80°C until analysis.

LPS Whole Blood Testing. Fresh heparinized whole blood (1 mL) was transferred into cell culture plates (Tissue Culture Plate 6-well Flat Bottom Cell +; Sarstedt) and mixed with 500 mL RPMI 1640 medium (Biochrom, Berlin, Germany) containing 1% penicillin/streptomycin and spiked with or without LPS from *Escherichia coli* (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) at 1 mg/mL. Whole blood was incubated with or without LPS for 24 hrs at 37°C and 5% CO₂. For preincubation experiments, blood cells were incubated with LPS (300 µg/mL) for 12 hrs ahead of stimulation with LPS (1 mg/mL) for 24 hrs. One sample aliquot containing whole-blood medium mix without LPS was immediately processed without further incubation, serving as baseline. Samples were centrifuged at 4000g for 10 mins, supernatants were transferred into microtubes (1.5 mL polypropylene; Sarstedt) and stored at -80°C until liquid chromatography combined with tandem mass spectrometry or endotoxin analysis. Cellular components were used for RNA isolation and gene expression analysis.

Laboratory Diagnostics. A Sysmex XE-2100 hematology analyzer (Sysmex, Kobe, Japan) was used for automated analysis of differential blood count and procalcitonin was analyzed by the Brahms procalcitonin Kryptor assay (Brahms Diagnostica, Hennigsdorf, Germany). Analysis of endotoxin was performed using the Endosafe-PTS system (Charles River, Wilmington, MA) based on limulus amoebocyte lysate kinetic chromogenic methodology according to the manufacturers' instructions. An endotoxin standard (Charles River) was used for recovery testing in plasma samples. Trypan blue or CellTiter-Blue Cell Viability Assay (Promega, Madison, WI) were used for analysis of cell viability in whole blood before and after activation with LPS according to the manufacturers' instructions.

Sample Preparation and Liquid Chromatography Combined With Tandem Mass Spectrometry Analysis. Solid-phase extraction was used for extraction and concentration of the eicosanoids from liquid samples; 100 mL of supernatants were mixed with 50 mL of the internal standard, consisting of isotope-labeled eicosanoids: TxB₂-d₄, PGF_{2α}-d₄, PGE₂-d₄, leukotriene B₄-d₄, 5-S-hydroxyeicosatetraenoic (HETE) acid-d₈ (100 ng/mL each), and AA-d₈ (1000 ng/mL) (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI). After protein precipitation with 200 mL of a methanol/zinc sulfate heptahydrate (89 g/L; 4/1 v/v) solution and centrifugation at 10,000g for 5 mins, 300 mL of the supernatant were mixed with 100 mL of 10% acetic acid in water and 800 mL water. Solid-phase extraction was performed using Strata-x 33 mm polymeric sorbent 60 mg/3 mL tubes (Phenomenex, Torrance, CA) that were conditioned with 2 mL methanol and 2 mL water and centrifuged

at 170g for 1 min; 1.2 mL of the diluted supernatant were transferred onto the solid-phase extraction cartridge and centrifuged at 270g for 1 min. After washing with 2 mL methanol/water (10/90; v/v), the samples were eluted with 1 mL of pure methanol, followed by vacuum concentration for 2.5 hrs at 35°C (SpeedVac Concentrator; Thermo Scientific, Waltham, MA). Samples were stored at -80°C until analysis. After thawing and reconstitution in 50 mL acetonitrile/water (50/50; v/v) +0.02% formic acid, samples (10 mL) were injected into the liquid chromatography combined with tandem mass spectrometry system. A triple quadrupole mass spectrometer (API 4000 QTrap; AB SCIEX, Foster City, CA) with an electrospray ionization source was used in negative ion mode. Multiple reaction monitoring of 55 mass transitions was performed for eicosanoid analysis. Analytes were quantified via their corresponding deuterated internal standards (7) (Supplemental Table 1 [Supplemental Digital Content 1, <http://links.lww.com/CCM/A396>] shows a list of eicosanoids and isotope-labeled internal standards with specific mass transitions and retention times).

Isolation of RNA and Quantitative Fluorogenic Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction. RNA from cellular components of whole blood was isolated using QIAamp RNA Blood Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions, including additional DNA digestion with RNase-Free DNase (Qiagen). RNA was reverse-transcribed using SuperScript-II enzyme and random hexamer primers (Invitrogen, Carlsbad, CA). Gene expression was determined by quantitative fluorogenic reverse-transcription polymerase chain reaction. Assays for *COX-2* and *mPGES-1* were established using gene-specific primers and probes spanning two exons to avoid amplification of genomic DNA (*COX-2*: 5' primer 5'-CTT CAC GCA TCA GTT TTT CAA G-3'; 3' primer 5'-TCA CCG TAA ATA TGA TTT AAG TCC AC-3'; probe 5'-FAM-ATA AGC GAG GGC CAG CTT TCA CCA ACG-TAMRA-3'; *mPGES-1*: 5' primer 5'-CTG GGA TGA CAG GCA TGA AT-3'; 3' primer 5'-GAC TCA CAT GGT GGC AGC CTT TT-3'; probe 5'-FAM-CAC TGT GCT CAG CCA CCA TCT GGA GTT-TAMRA-3'). Results of gene expression analysis were normalized to mg RNA.

Data Evaluation and Statistical Analysis. MarkerView 1.2 Software (AB Sciex, Foster City, CA) was used for biomarker discovery by principal component analysis. Analyst 1.5 Software (AB Sciex) was used for quantitative analysis of chromatographic peaks. Statistical analyses were performed using the GraphPad Prism 4 statistical software (GraphPad Software, LA Jolla, CA). Normality of distribution was assessed using the Kolmogorov-Smirnov test. Groups of normally distributed samples were analyzed using the *t* test and non-normally distributed samples were analyzed using Mann-Whitney test. A *p* < .05 was considered as statistically significant.

Table 1. Characteristics at study population

	First Cohort					
	Healthy Subjects	Septic Patients			Second Cohort	
		Total	Survival to a General Ward at 2 wks	Prolonged Intensive Care Unit Care or Death at 2 wks	Healthy Subjects	Septic Patients
Subjects (n)	15	25	13	12	3	10
Age (y)	26a (23-32) ^b	63a (50-73) ^b	70a (53-76) ^b	61a (48-67) ^b	36a (29-37) ^b	71a (69-76) ^b
Gender						
Male (n)	7	17	7	10	2	8
Female (n)	8	8	6	2	1	2
Severe Sepsis (n)	—	15	10	5	—	1
Septic Shock (n)	—	10	3	7	—	9
White Blood Cell Count (×10 ⁹ /L)	5.2a (4.2-6.9) ^b	9.4a (5.7-17.2) ^b	12.0a (7.2-17.3) ^b	7.9a (5.2-19.6) ^b	5.7a (5.4-6.0) ^b	17.0a (12.3-21.0) ^b
Platelet count (×10 ⁹ /L)	214a (192-257) ^b	184a (88-284) ^b	245a (175-314) ^b	87a (34-167) ^b	287a (244-319) ^b	186a (104-218) ^b
Procalcitonin (µg/L)	—	14.9a (2.6-27.2) ^b	11.4a (2.0-20.1) ^b	20.1a (2.9-38.7) ^b	—	29.0a (15.0-66.0) ^b
Microbiology (n)	—				—	
Gram-negative bacteria		8				5
Gram-positive bacteria		6				3
Fungi		2				1
Viral		2				—
None		7				1
Site of Infection (n)	—				—	
Pulmonary		11				4
Urogenital		2				2
Abdominal		8				4
Endocarditis		2				—
Orthopedic		1				—
Unknown		1				—
Simplified Acute Physiology Score II Score	—	43a (38-52) ^b	45a (38-50) ^b	42a (32-52) ^b	—	58a (45-64) ^b

Results are presented as absolute numbers or ^amedians or ^blower (25%) and upper (75%) quartiles

RESULTS

Characteristics of Study Population

Characteristics of the study population are shown in Table 1. Fifteen patients of the first study cohort and one patient of the second study cohort met the criteria of severe sepsis, ten patients of the first study cohort and nine patients of the second study cohort had septic shock. The first study cohort was further subdivided into patients with survival to a general ward at 2 wks (n = 13), and into patients with prolonged ICU care (n = 5) or death (n = 7) at 2 wks. The clinical course of disease was not associated with the classification of patients into severe sepsis or septic shock. Patients with septic shock showed increased procalcitonin concentrations (median, 31.7 mg/L) compared to patients with severe sepsis (median, 5.8 mg/L; *p* < .05), whereas white blood cell and PLT counts did not significantly differ between both groups (data not shown). Patients with an unfavorable clinical course showed reduced PLT

counts compared to patients with a favorable clinical course (*p* < .005), whereas procalcitonin and white blood cell counts as well as the Simplified Acute Physiology Score II scores did not significantly differ between both groups. Causative agents of sepsis were Gram-negative bacteria in 13 patients, Gram-positive bacteria in nine patients, fungi in three patients, and viruses in two patients, whereas no agent could be identified in eight patients.

Differential Release of AA Metabolites in Healthy Subjects and Septic Patients

A principal component analysis was performed to identify differentially released AA metabolites after LPS activation of whole blood of 15 healthy controls and 15 septic patients. As shown in Figure 1A, analysis of AA metabolites allowed differentiation between healthy controls and septic patients after LPS whole-blood activation (score plot). Nine mass signals could be detected, which differed between the two groups (Fig. 1B). According to their mass transition

and retention time (RT), these signals could be identified as AA and the COX-associated metabolites PGE₂, 11-HETE, and TXB₂. In addition, AA-analogues could be detected, which are characterized by the mass transition of the AA standard (AA-d8) but different RTs (Table 2). As shown in the loading plot, which indicates the individual contribution of these metabolites to the separation of both groups, PGE₂ had the highest impact on differentiation (Fig. 1B). Differentiating metabolites apart from 11-HETE already could be identified in a principal component analysis performed without LPS activation at baseline. Discrimination, however, was worse compared to principal component analysis after LPS activation (data not shown). A principal component analysis after LPS activation of whole blood of ten other septic patients confirmed differentiating mass signals (data not shown). Results of quantitative analysis of differentiating metabolites between healthy subjects and septic patients with and without (baseline) LPS whole-blood activation are shown in Figure 2. Septic patients

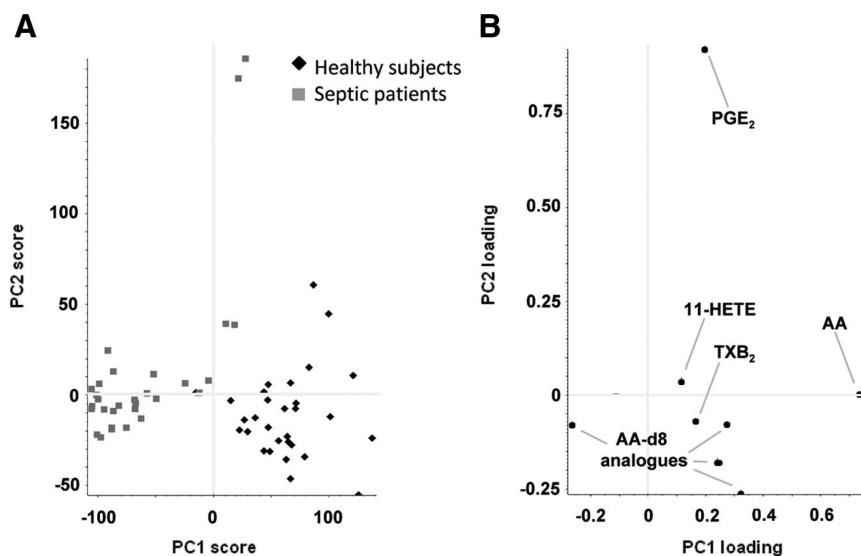


Figure 1. Principal component analysis of arachidonic acid (AA) metabolites in healthy subjects and septic patients. Data from 15 healthy controls and 15 septic patients after lipopolysaccharide whole-blood activation are shown. A, Duplicate values of all measurements are included in the score plot illustrating the differentiation between both groups. B, The loading plot shows identified metabolites and their individual contribution for the differentiation of both groups. The greater the distance of dots from the origin, the stronger their separating impact. HETE, hydroxyeicosatetraenoic; PC, principal component; PG, prostaglandin; TX, thromboxane.

Table 2. Mass transitions and retention times of identified metabolites

Parameter	Mass Transitions	Retention Time (min)
AA	303.2/259.0	12.2
AA-d8 analogue	311.3/267.2	2.9
AA-d8 analogue	311.3/267.2	6.8
AA-d8 analogue	311.3/267.2	9.5
AA-d8 analogue	311.3/267.2	10.3
AA-d8 analogue	311.3/267.2	10.9
11-hydroxyeicosatetraenoic	319.2/167.0	10.6
Prostaglandin E2	351.2/271.0	4.4
Thromboxane B2	369.2/169.0	3.4

AA, arachidonic acid.

Mass transitions and chromatographic retention times of differentially released metabolites are shown. Analogues are characterized by mass transitions of the isotope labeled AA standard (AA-d8: 311.3/267.2; 12.1 mins) but different retention times.

revealed increased concentrations of AA at baseline compared to healthy controls. A three-fold increase of AA after LPS activation could be detected in healthy subjects. No significant increase was found in septic patients, resulting in lower AA concentrations after LPS activation compared to healthy controls (Fig. 2A). The concentrations of AA-d8 analogues significantly differed between healthy subjects and septic patients already at baseline. AA-d8 analogues with RTs of 2.9 mins, 6.8 mins, 9.5 mins, and 10.3 mins showed up to ten-fold lower concentrations in septic patients (Fig. 2B-E). One analog characterized by RT of 10.9 mins could only be detected in septic patients (Fig. 2F). LPS activation induced a

significant increase in the AA-d8 analog characterized by RT of 10.3 mins in septic patients ($p < .01$; Fig. 2E). Healthy subjects showed LPS-induced increase of AA-d8 analogues with RTs of 2.9 mins and 10.3 min ($p < .05$; Fig. 2B, 2E).

Because 11-HETE and PGE₂ are mainly generated in leukocytes (1, 8), concentrations of both metabolites were analyzed as absolute concentrations and normalized to the white blood cell count (Fig. 2G-J). 11-HETE could be detected in healthy subjects and septic patients within the limit of detection at baseline (Fig. 2G, 2H), whereas PGE₂ could only be detected in healthy subjects at baseline (Fig. 2I, 2J). LPS activation resulted in a significant increase in 11-

HETE and PGE₂ both in septic patients and in controls; however, compared to septic patients, healthy subjects showed a two-fold higher increase in 11-HETE and a five-fold higher increase in PGE₂ with and without normalization to white blood cells (Fig. 2G-J).

Because the production of TXA₂ is mainly attributable to PLTs, the concentration of its stable metabolite TXB₂ was analyzed as absolute concentration and normalized to the PLT count (1) (Fig. 2K, 2L). Concentrations of TXB₂ at baseline were approximately eight-fold lower in septic patients compared to healthy controls, regardless of the normalization to PLTs. LPS activation only marginally affected the release of TXB₂ in healthy subjects but induced a significant increase in septic patients when considering absolute concentrations (Fig. 2K).

To exclude a potential effect of differences in cell viability between healthy subjects and septic patients on mediator release, cell viability was determined in whole blood from both groups. Trypan blue method and CellTiter-Blue cell viability assay did not reveal differences in cell viability in whole blood from septic patients compared to healthy controls. Also, no significant differences between cell viability before and after activation of whole blood with LPS for 24 hrs were observed (data not shown). To further exclude potential effects of endogenous LPS in septic patients on mediator release, endotoxin was determined in patients of the second study cohort, characterized by microbiologically described Gram-negative sepsis (n = 5). Endotoxin could not be detected in two out of five patients; the other three patients revealed plasma concentrations between 1.54 and 9.92 EU/mL (data not shown). Because effects of metabolite release were not associated with endotoxin levels in these experiments, endogenous endotoxin as a confounding variable was excluded.

Differential Release of AA Metabolites in Patients With Sepsis in Relation to Disease Severity and Clinical Outcome

To further investigate a potential association between the eicosanoid response and disease severity or clinical outcome, the release of AA metabolites was compared between patients with severe sepsis or septic shock (Fig. 3) and between patients with survival to a general

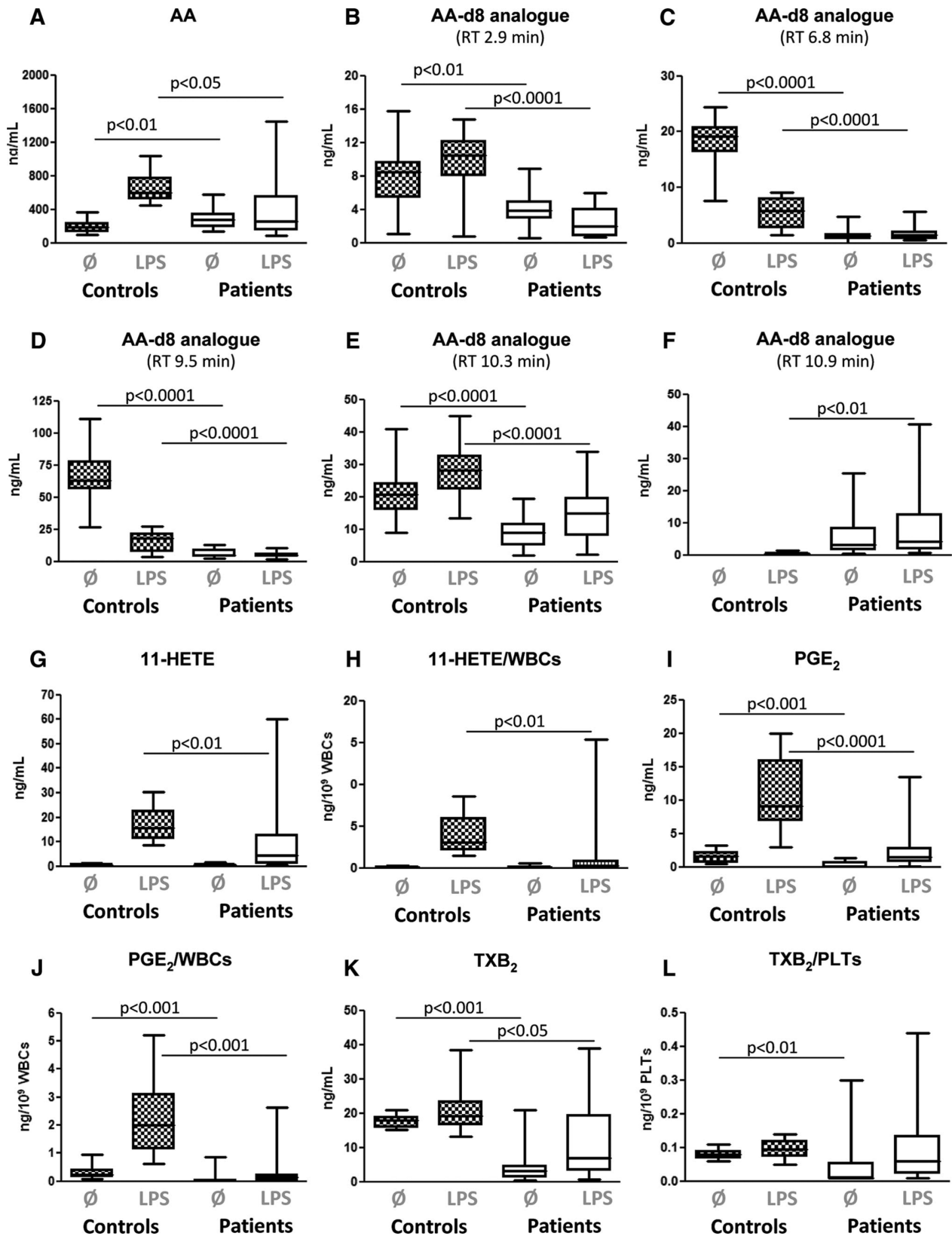


Figure 2. Quantitative analysis of arachidonic acid (AA) metabolites in healthy subjects and septic patients. AA metabolites that were differentially released in lipopolysaccharide (LPS)-activated or nonactivated whole blood of healthy subjects (n = 15, dotted boxes) and septic patients (n = 25, plain boxes) are shown (A, AA; B, AA-d8 analogue retention times [RT] 2.9 min; C, AA-d8 analogue RT 6.8 min; D, AA-d8 analogue RT 9.5 min; E, AA-d8 analogue RT 10.3 min; F, AA-d8 analogue 10.9 min; G, 11-hydroxyeicosatetraenoic [HETE]; H, 11-HETE/white blood cells [WBCs]; I, prostaglandin [PG] E₂; J, PGE₂/WBCs; K, thromboxane [TX] B₂; L, TXB₂/platelets [PLTs]). AA and AA-d8 analogues are presented in absolute concentrations. 11-HETE, PGE₂, or TXB₂ concentrations and normalized to WBC or PLT. RT of AA-d8 analogues are given for identification. The Ø indicates medium control incubation of whole blood without LPS for 24 hrs; LPS indicates incubation of whole blood with LPS (1 mg/mL) for 24 hrs.

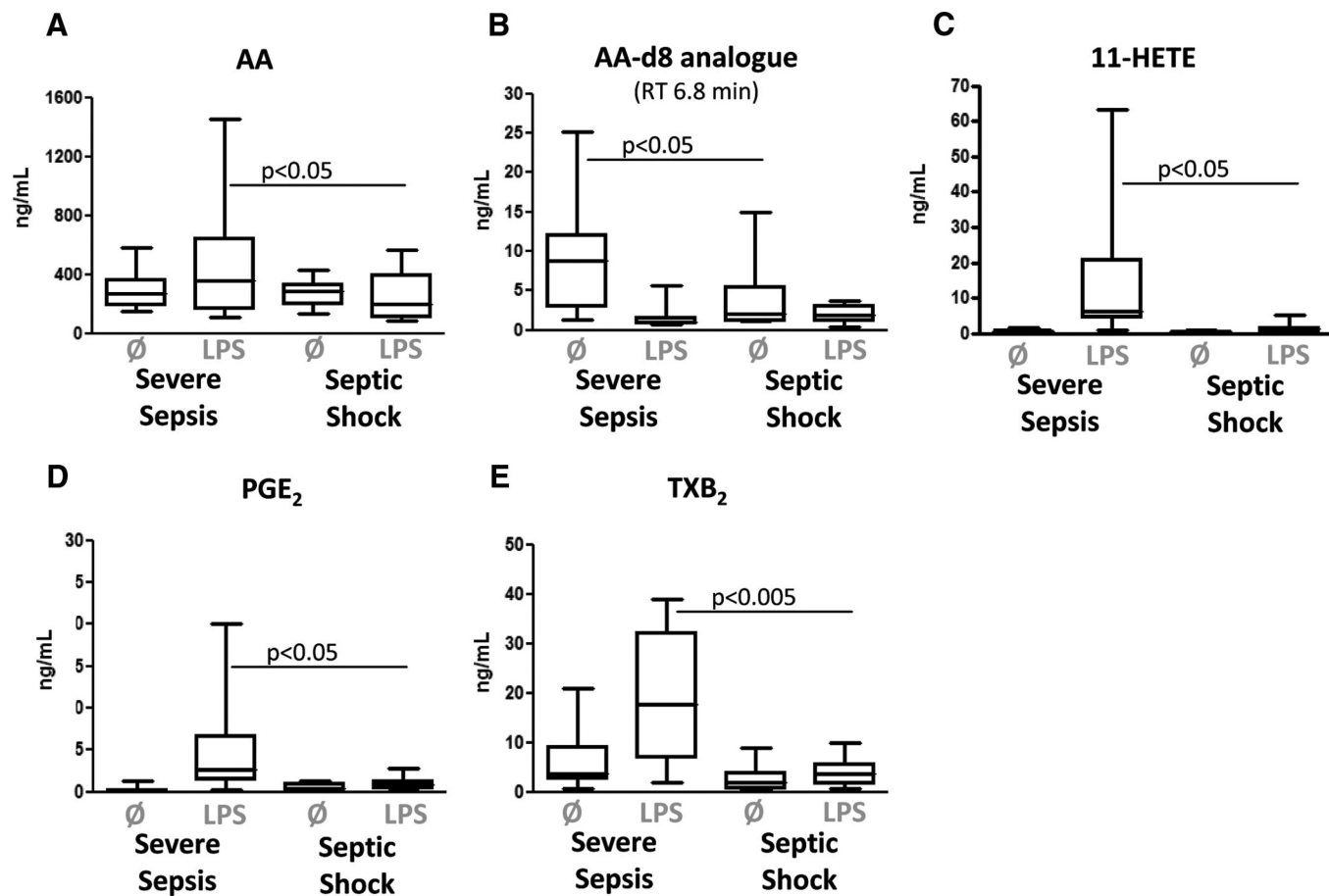


Figure 3. Quantitative analysis of arachidonic acid (AA) metabolites in patients with severe sepsis or septic shock. AA metabolites that were differentially released in lipopolysaccharide (LPS)-activated or nonactivated whole blood of septic patients with severe sepsis (n = 15) or septic shock (n = 10) are shown. (A, AA; B, AA-d8 analogue RT 6.8 min; C, 11-hydroxyeicosatetraenoic [HETE]; D, prostaglandin [PG] E₂; E, thromboxane [TX] B₂). AA and AA metabolites are presented in absolute concentrations. The Ø indicates medium control incubation of whole blood without LPS for 24 hrs; LPS indicates incubation of whole blood with LPS (1 mg/mL) for 24 hrs.

ward at 2 wks or with prolonged ICU care or death at 2 wks (Fig. 4).

Comparable concentrations of AA were found in patients with severe sepsis and septic shock at baseline. LPS activation in patients with severe sepsis resulted in a two-fold increase of AA, whereas no increase was observed in patients with septic shock (Fig. 3A). The concentration of the AA-d8 analog with RT of 6.8 mins was significantly lower in patients with septic shock at baseline ($p < .05$; Fig. 3B). Patients with septic shock further revealed a reduced release of 11-HETE at baseline when considering normalized concentrations (data not shown) and a significantly lower release (~90%) after LPS activation compared to patients with severe sepsis (Fig. 3C). Concentrations of PGE₂ did not significantly differ between the two groups at baseline; however, the LPS-induced release was approximately 80% lower in patients with septic shock (Fig. 3D). TXB₂ concentrations of patients with

severe sepsis or septic shock did not significantly differ without LPS activation. Patients with septic shock showed no significant increase after LPS activation; in contrast, patients with severe sepsis revealed a three-fold increase of TXB₂ concentrations after activation with LPS (Fig. 3E).

Differentially released AA metabolites between patients with survival to a general ward at 2 wks or patients with prolonged ICU care or death at 2 weeks, namely 11-HETE, PGE₂, and TXB₂, are shown in Figure 4. Concentrations of 11-HETE, PGE₂, and TXB₂ did not differ between the two groups at the time of admission (day 0) and on day 3 without LPS activation. Furthermore, no increase or decrease in the release of 11-HETE, PGE₂, and TXB₂ was observed in the course of the disease (data not shown). LPS activation on day of admission induced a higher release of 11-HETE in patients with favorable clinical course; however, the difference between

the two groups was not significant. On day 3, a significantly higher release of 11-HETE (two-fold) could be shown in patients with survival to a general ward compared to patients with prolonged ICU care or death (Fig. 4A). Furthermore, a nonsignificant trend toward higher 11-HETE concentrations after LPS activation could be shown for patients with survival to a general ward in the course of the disease. PGE₂ release on activation with LPS significantly increased on day 3 in these patients (five-fold), whereas no differences in LPS-induced PGE₂ release were observed between the two groups on the day of admission (Fig. 4B). TXB₂ concentrations after LPS activation significantly differed between the two groups on the day of admission ($p < .05$) and no significant differences could be shown on day 3. However, a nonsignificant trend toward higher TXB₂ concentrations was observed in patients with survival to a general ward in the course of the disease (Fig. 4C).

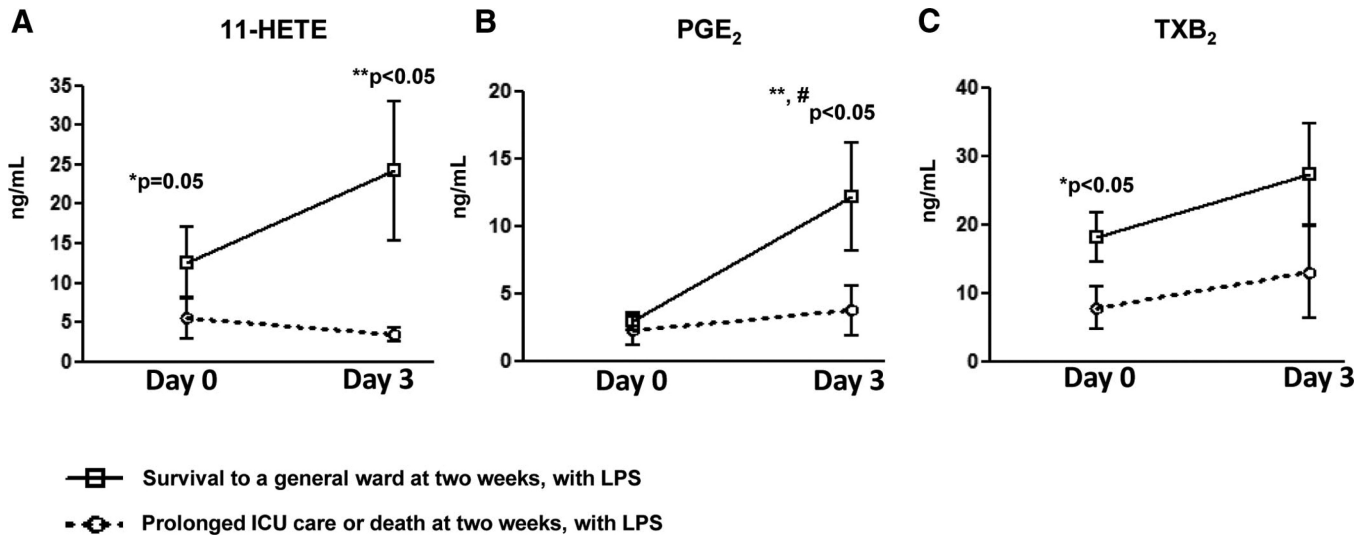


Figure 4. Quantitative analysis of arachidonic acid metabolites in septic patients with favorable or unfavourable course of disease. Arachidonic acid metabolites that were differentially released in lipopolysaccharide (LPS)-activated whole blood of septic patients with survival to a general ward at 2 wks ($n = 13$, continuous line) or prolonged intensive care unit (ICU) care or death at 2 wks ($n = 12$, broken line) are shown (mean \pm SEM). (A, 11-hydroxyeicosatetraenoic [HETE]; B, prostaglandin [PG] E₂; C, thromboxan [TX] B₂). LPS activation was performed on day of admission (day 0) and on day 3 after admission. *Comparison between groups on day 0; **comparison between groups on day 3; #comparison within group, day 0 to day 3.

Differential Regulation of Target Genes of the AA Metabolism in Healthy Subjects and Septic Patients

To further elucidate the sepsis-associated effects on release of COX-dependent metabolites, comparative analyses of *COX-2* and *mPGES-1* as corresponding target genes were performed in a second independent study cohort consisting of ten septic patients and three healthy controls. *COX-2* gene expression of patients and healthy subjects did not significantly differ at baseline without LPS whole-blood activation. LPS activation of whole blood of septic patients resulted in a six-fold lower induction of *COX-2* mRNA expression compared to healthy controls ($p < .001$; Fig. 5A). A reduced LPS-induced release of the corresponding metabolite 11-HETE could be confirmed in septic patients of the second cohort (Fig. 5B). A nonsignificant trend to a higher gene expression of *mPGES-1* could be shown in septic patients without LPS activation. LPS activation induced a comparable increase of *mPGES-1* gene expression in healthy subjects and septic patients (Fig. 5C). In contrast to this finding, a reduced PGE₂ release in septic patients was found, confirming the results observed in the first study cohort (Fig. 5D).

Because endogenous LPS in septic patients might potentially induce a general hyporesponsiveness of LPS-dependent

pathways, whole blood from healthy subjects ($n = 3$) was preincubated with LPS for 12 hrs at a final concentration of 300 pg/mL, corresponding with concentrations observed in septic patients (9). However, preincubation had no effect on mediator release of 11-HETE and gene expression of *COX-2* was still inducible to the same extent, suggesting that sepsis-associated changes of the *COX-2* pathway were not caused by endogenous endotoxin tolerance (data not shown).

DISCUSSION

Our study demonstrates that patients with sepsis were characterized by significant differences in their released AA metabolite concentrations compared to healthy subjects. LPS-activated whole blood showed a significant reduction of AA and the COX-associated AA metabolites 11-HETE, PGE₂, and TXB₂ in septic patients. Gene expression analysis of corresponding target genes confirmed a reduced inducibility of *COX-2* mRNA expression as a rate-limiting step in prostaglandin synthesis but revealed a preserved inducibility of downstream *mPGES-1* in septic patients. The reduced release of AA, 11-HETE, PGE₂, and TXB₂ was associated with increased disease severity or an unfavorable clinical course of disease.

The shown differences in AA metabolite patterns between healthy subjects

and septic patients substantiate a pathophysiological role of these compounds in sepsis. AA is released by phospholipase A₂ from membrane phospholipids, followed by subsequent metabolization via specialized enzymes (1, 10). Our data showing a reduced LPS-induced release of AA in septic patients (Fig. 2) indicate a disturbance of the AA metabolism already in superordinate systems. One of the key regulatory enzymes of the AA metabolism is COX, which catalyzes the conversion of AA to PGH₂, the precursor for a large number of eicosanoids (11). The reduction in the release of COX-dependent metabolites (Fig. 2) and the reduced inducibility of *COX-2* gene expression in septic patients (Fig. 5) speak for a direct affection of the COX pathway in sepsis, presumably at the level of transcription. One could speculate about a COX-2 product-dependent feedback regulation of *COX-2* gene expression (12).

Sepsis is characterized by uncontrolled expression of the inflammatory cascade; however, there is often a shift toward an immunosuppressive state in the course of the disease (13). This might also be reflected by the reduced COX-associated eicosanoid response comparable to the frequently shown reduced release of proinflammatory cytokines after LPS whole-blood activation in septic patients (14). Former studies identified PGE₂, which is formed by COX-2 and the specific PGE synthase, as a central modulator balancing between the proinflam-

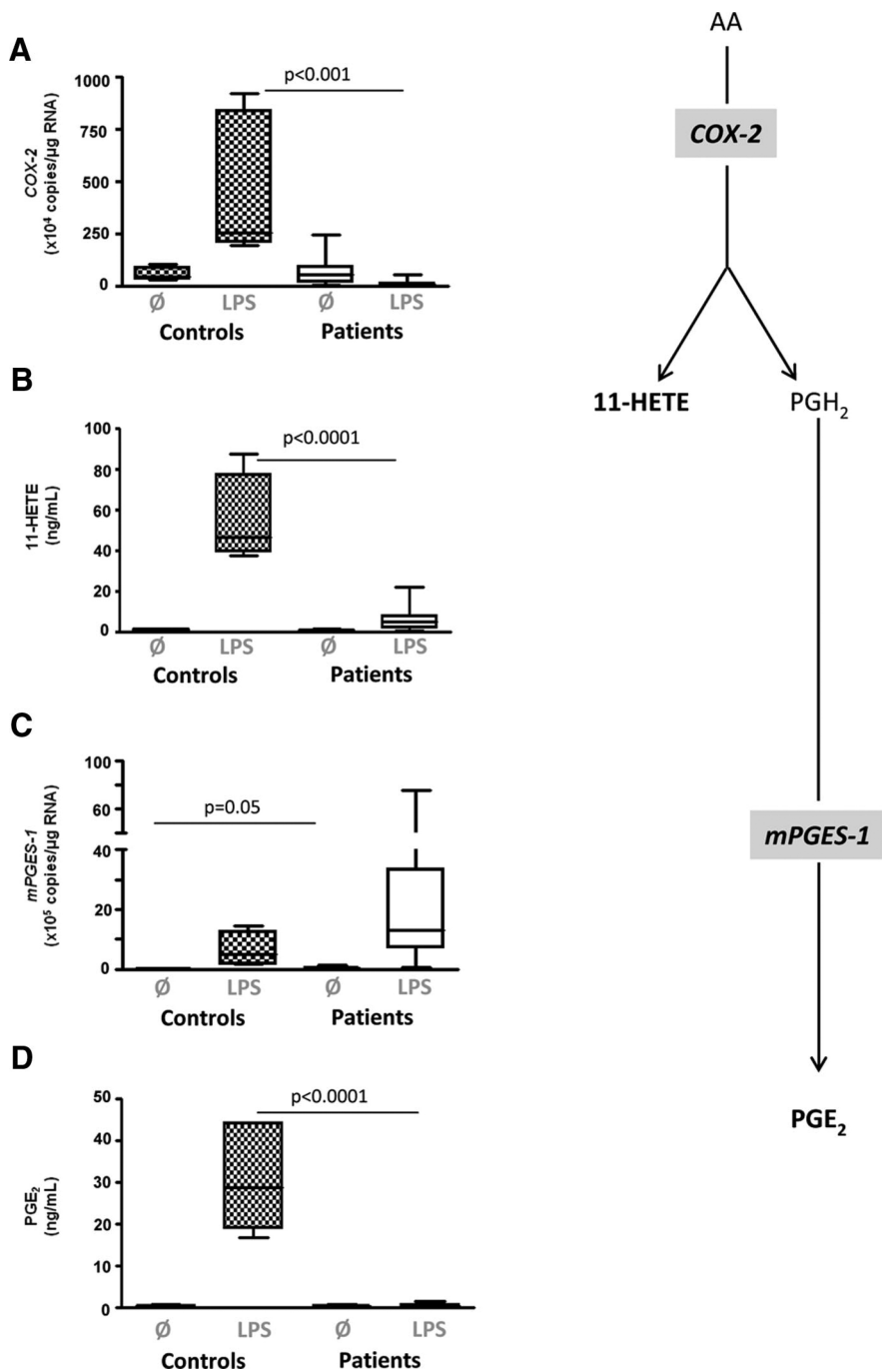


Figure 5. *COX-2* and *mPGES-1* gene expression and corresponding mediator release in healthy subjects and septic patients. Data from ten septic patients (light squares) and three healthy subjects (dark squares) are shown (A, *COX₂* messenger RNA expression; B, 11-hydroxyeicosatetraenoic [*HETE*] release; C, *mPGES-1* messenger RNA expression; D, *PGE₂* release). Whole blood of patients and healthy subjects was incubated with or without lipopolysaccharide (*LPS*). Measurements were determined in duplicates. The investigated pathway is shown on the right, analyzed genes are highlighted in gray, and determined corresponding metabolites are given in bold. The ∅ indicates medium control incubation of whole blood without *LPS* for 24 hrs; *LPS* indicates incubation of whole blood with *LPS* (1 mg/mL) for 24 hrs. *AA*, arachidonic acid; *PG*, prostaglandin.

matory and anti-inflammatory response (15, 16). The shown reduction of basal *PGE₂* levels and of the *LPS*-induced *PGE₂* release in septic patients (Fig. 2) may thus reflect a central pathogenic mechanism in sepsis leading to an imbalance

in the inflammatory response. The preserved inducibility of *mPGES-1* in septic patients (Fig. 5) as the essential component for *PGE₂* production could be interpreted as a compensatory mechanism for maintenance of homeostasis. The failure of

subsequent increase of *PGE₂* release is possibly based on our demonstrated downregulation of *COX-2* in sepsis (Fig. 5), because upregulation of both *COX-2* and *mPGES-1* were described to be necessary for stimulation of *PGE₂* synthesis (17). A suspected positive modulating role of *PGE₂* in sepsis is further supported by our data showing an increase of *PGE₂* release in patients with a favorable clinical course of disease (Fig. 4).

The actual impact of *HETEs* in inflammation is poorly understood; however, because 11-*HETE* was shown to directly reflect *COX* activity on mediator level, the reduced release in whole blood of septic patients (Fig. 2) further confirms a direct affection of *COX* pathway in sepsis (8).

Our study further revealed a significant reduction of *TXB₂* in septic patients compared to healthy controls with and without *LPS* activation (Fig. 2). *TXB₂* is typically determined as the stable non-enzymatically degraded metabolite of *TXA₂*, which is formed mainly by *COX-1* and the specific downstream enzyme *TXA* synthase (1). Earlier studies showed increased plasma levels of *TXB₂* in septic patients (18, 19). This discrepancy might be explained by the determination of *TXB₂* by immunoassays that are often hampered by cross-reactivity with other *AA* metabolites. The overall contribution of *TXA₂* in sepsis is considered to be uniformly negative. However, our data tending to higher levels in patients with a favorable clinical course (Fig. 4) may be supported by a recent publication describing a protective effect of *TXA₂* in sepsis preventing the development of vascular hyporesponsiveness (20).

The shown sepsis-associated changes of *AA* metabolism further implement a diagnostic and therapeutic impact. The differences of the eicosanoid response between patients with survival to a general ward at 2 wks or patients with prolonged ICU care or death at 2 wks and the shown recovery of the eicosanoid response after 3-day therapy in patients with a favorable clinical course (Fig. 4), together with the differences observed between patients with severe sepsis or septic shock (Fig. 3), may indicate a diagnostic potential of subsequent analyses of the eicosanoid response in disease or therapeutic monitoring. Furthermore, one could speculate that a decrease of *AA* metabolism in early stages of infectious disease may indicate an increased risk for sepsis development. Concentrations of distinct cytokines as

alternative markers of early inflammation were shown to predict mortality in septic patients (21). However, because AA metabolites are assumed to be superordinate to cytokines, analysis of AA metabolites may have a higher impact in sepsis diagnostics.

Another important finding of our study was the detection of AA-d8 analogues, which were significantly affected in patients with sepsis (Figs. 1 and 2). Even though we could not specify these compounds, they completely discriminated between healthy subjects and septic patients, indicating promising diagnostic potential.

Treatment of septic patients with COX inhibitors has been discussed as a potential therapeutic approach aiming to reduce the proinflammatory response. However, our data showing reduced inducibility of the COX pathway in sepsis (Figs. 2 and 5) may further explain the missing benefit of an inhibition of the COX or associated enzymes in septic patients as described in recent clinical studies (22–24). On the contrary, the recovery of the eicosanoid response in patients with better prognosis (Fig. 4) may even suggest a potential negative effect of a COX-inhibiting therapy.

The presented sepsis-associated effects on AA metabolism could be discussed as a general hypo-responsiveness to LPS attributable to endotoxin tolerance rather than a direct affection of related eicosanoid pathways (25). There are several points that disprove this hypothesis. First, sepsis-associated changes of AA metabolism could be demonstrated in all studied septic patients, whereas approximately only half of the study population experienced Gram-negative sepsis. Even in patients with Gram-negative sepsis, LPS was not always detectable or plasma concentrations showed high variability. Second, the differential regulation between *COX-2* and *mPGES-1* on gene expression level with preserved LPS-associated induction of *mPGES-1* (Fig. 5) argues against a general LPS hypo-responsiveness. Third, we could demonstrate in a cell culture model that preincubation of whole blood with LPS in concentrations corresponding to those of septic patients did not affect LPS whole-blood testing.

A considerable limitation of the present study is the missing inclusion of patients with early or developing sepsis, allowing a comparison of sensitivity of LPS-induced eicosanoid response in

relation to conventional sepsis markers and of patients with otherwise critical illness, allowing an assessment of specificity of observed findings. Also, the selected time points for blood collection, directly after admission to ICU, potentially reflecting the highest disease activity, and after 3-day therapy, potentially indicating the further course of the disease, do not adequately allow assessment of the dynamic nature of sepsis. Subsequent clinical studies will have to address these limitations.

CONCLUSIONS

Using a systems biology approach, we were able to show that the AA metabolism is markedly affected in patients with sepsis. The identification of differentially released mediators and the association of the intensity of the eicosanoid response with disease severity as well as clinical outcome indicate a promising diagnostic potential. Further clinical studies may address the diagnostic and prognostic potential of eicosanoid analyses after LPS whole-blood activation in septic patients and a potential superiority to existing laboratory markers.

REFERENCES

1. Brock TG, Peters-Golden M: Activation and regulation of cellular eicosanoid biosynthesis. *Sci World J* 2007; 7:1273–1284
2. Tilley SL, Coffman TM, Koller BH: Mixed messages: Modulation of inflammation and immune responses by prostaglandins and thromboxanes. *J Clin Invest* 2001; 108:15–23
3. Bulger EM, Maier RV: Lipid mediators in the pathophysiology of critical illness. *Crit Care Med* 2000; 28:N27–N36
4. Levy BD, Clish CB, Schmidt B, et al: Lipid mediator class switching during acute inflammation: Signals in resolution. *Nat Immunol* 2001; 2:612–619
5. Peplow PV: Actions of cytokines in relation to arachidonic acid metabolism and eicosanoid production. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 1996; 54:303–317
6. Levy MM, Fink MP, Marshall JC, et al: 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Intensive Care Med* 2003; 29:530–538
7. Kortz L, Geyer R, Ludwig U, et al: Simultaneous eicosanoid profiling and identification by liquid chromatography and hybrid triple quadrupole-linear ion trap mass spectrometry for metabolomic studies in human plasma. *J Lab Med* 2009; 3:341–348
8. Norris PC, Reichart D, Dumlao DS, et al: Specificity of eicosanoid production depends

- on the TLR-4-stimulated macrophage phenotype. *J Leukoc Biol* 2011; 90:563–574
9. Opal SM, Scannon PJ, Vincent JL, et al: Relationship between plasma levels of lipopolysaccharide (LPS) and LPS-binding protein in patients with severe sepsis and septic shock. *J Infect Dis* 1999; 180:1584–1589
10. Nevalainen TJ: Serum phospholipases A2 in inflammatory diseases. *Clin Chem* 1993; 39:2453–2459
11. Dubois RN, Abramson SB, Crofford L, et al: Cyclooxygenase in biology and disease. *FASEB J* 1998; 12:1063–1073
12. Ishikawa T, Jain N, Herschman HR: Feedback regulation of Cyclooxygenase-2 transcription *ex vivo* and *in vivo*. *BBRC* 2009; 378:534–538
13. Hotchkiss RS, Karl IE: The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med* 2003; 348:138–150
14. Ertel W, Kremer JP, Kenney J, et al: Downregulation of proinflammatory cytokine release in whole blood from septic patients. *Blood* 1995; 85:1341–1347
15. Harris SG, Padilla J, Koumas L, et al: Prostaglandins as modulators of immunity. *Trends Immunol* 2002; 23:144–150
16. Xu XJ, Reichner JS, Mastrofrancesco B, et al: Prostaglandin E2 suppresses lipopolysaccharide-stimulated IFN-beta production. *J Immunol* 2008; 180:2125–2131
17. Cipollone F, Cicolini G, Bucci M: Cyclooxygenase and prostaglandin synthases in atherosclerosis: recent insights and future perspectives. *Pharmacol Ther* 2008; 118:161–180
18. Suchner U, Katz DP, Furst P, et al: Impact of sepsis, lung injury, and the role of lipid infusion on circulating prostacyclin and thromboxane A(2). *Intensive Care Med* 2002; 28:122–129
19. Reines HD, Halushka PV, Cook JA, et al: Plasma thromboxane concentrations are raised in patients dying with septic shock. *Lancet* 1982; 2:174–175
20. Yamada T, Fujino T, Yuhki K, et al: Thromboxane A2 regulates vascular tone via its inhibitory effect on the expression of inducible nitric oxide synthase. *Circulation* 2003; 108:2381–2386
21. Opal SM, DePalo VA: Anti-inflammatory cytokines. *Chest* 2000; 117:1162–1172
22. Celik I, Akbulut A, Kilic SS, et al: Effects of ibuprofen on the physiology and outcome of rabbit endotoxic shock. *BMC Infect Dis* 2002; 2:26
23. Bernard GR, Wheeler AP, Russell JA, et al: The effects of ibuprofen on the physiology and survival of patients with sepsis. The Ibuprofen in Sepsis Study Group. *N Engl J Med* 1997; 336:912–918
24. Shann F: Antipyretics in severe sepsis. *Lancet* 1995; 345:338
25. Biswas SK, Lopez-Collazo E: Endotoxin tolerance: new mechanisms, molecules and clinical significance. *Trends Immunol* 2009; 30:475–487

V. Zusammenfassung und Interpretation der Arbeit

Wegen der hohen Komplexität der Sepsis-Erkrankung mit Einbeziehung verschiedenster Organsysteme und der verschiedenen diagnostischen Fragestellungen ist der diagnostische Nutzen der derzeit in der klinischen Versorgung eingesetzten Biomarker noch immer sehr limitiert [29].

Basierend auf den zentralen und zum Teil gegenläufigen pathophysiologischen Effekten und der übergeordneten Modulationsfunktion in der Entzündungsreaktion lassen sich Eicosanoide als zentrale Faktoren in der Pathogenese der Sepsis einordnen und stellen potentielle Biomarker für diese Erkrankung dar [31, 39, 40]. Begründet durch die chemische und biologische Komplexität mit hoher struktureller Übereinstimmung verschiedener Metabolite, sehr niedrigen Blutkonzentrationen und sehr kurzen Halbwertszeiten mit schneller Degradation, sind Sepsis-assoziierte Veränderungen des AA-Metabolismus und die Möglichkeit der Anwendung von AA-Metaboliten als diagnostische Marker bei Sepsis bisher nur sehr unzureichend untersucht [38]. Ziel der vorliegenden Promotionsarbeit war daher die Untersuchung von Sepsis-assoziierten Veränderungen des AA-Metabolismus und die Identifikation differentiell regulierter AA-Metabolite mit Prüfung ihres diagnostischen Potentials bei Patienten mit Sepsis unter Anwendung eines standardisierten in-vitro LPS Vollblutaktivierungs-Modells. Zwecks Prüfung regulatorischer Zusammenhänge wurden weiterhin Target-Gene des AA-Metabolismus untersucht.

Bei Vergleich der Eicosanoidantwort zwischen Sepsispatienten (n = 35) und Gesunden (n = 15) konnte eine differentielle Freisetzung von AA, AA-Analoga und der COX-assoziierten Metabolite PGE₂, 11-HETE und TXB₂ gezeigt werden. AA-Analoga sind durch denselben Massenübergang wie der deuterierte Standard der AA gekennzeichnet, weisen jedoch gegenüber diesem differierende Retentionszeiten auf. Sepsis-Patienten wiesen gegenüber Gesunden eine deutlich reduzierte Freisetzung von AA und den COX-assoziierten Metaboliten

11-HETE und PGE₂ auf. Auf Genexpressionsebene zeigte sich eine reduzierte Induzierbarkeit der *COX-2* mRNA-Expression bei Sepsis-Patienten (n = 10) gegenüber Gesunden (n = 3), jedoch eine erhaltene Induzierbarkeit auf der Ebene der *mPGES-1*.

Die reduzierte Freisetzung COX-abhängiger Metabolite und die reduzierte Induzierbarkeit der *COX-2* Genexpression sprechen für eine direkte Beeinflussung des COX-Pathways bei Sepsis. Die in der Pathophysiologie der Sepsis diskutierte Immunparalyse wird durch diese Daten weiter belegt, vergleichbar der in früheren Publikationen beschriebenen reduzierten Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen nach LPS Vollblutaktivierung bei Sepsis-Patienten [45]. Die hohe Komplexität Sepsis-assoziiierter Veränderungen des AA-Metabolismus wird unter anderem durch die im Rahmen dieser Promotionsarbeit beschriebene reduzierte Induzierbarkeit der *COX-2* mRNA-Expression bei jedoch erhaltener Induzierbarkeit der untergeordneten *mPGES-1* abgebildet.

Die im Rahmen dieser Arbeit gezeigten Effekte auf den AA-Metabolismus weisen weiterhin auf einen potentiellen diagnostischen Nutzen hin. So war das Ausmaß der reduzierten Mediatorenfreisetzung bei Sepsis-Patienten mit der Schwere der Erkrankungssymptomatik und dem klinischen Outcome assoziiert. Patienten mit einer Erholung der Eicosanoidantwort in der konsekutiv durchgeführten Vollblutaktivierung zeigten einen positiven klinischen Verlauf. Die identifizierten AA-Analoga konnten in der vorliegenden Arbeit nicht weiter spezifiziert werden, die Trennung zwischen Gesunden und Patienten mit Sepsis verspricht jedoch auch für diese ein diagnostisches Potential.

Über viele Jahre hinweg wurde eine COX-Inhibition als therapeutische Option bei Patienten mit Sepsis diskutiert [46]. Die in der vorliegenden Arbeit gezeigte reduzierte COX-Induzierbarkeit bei Patienten mit Sepsis liefert möglicherweise eine weitere Erklärung für die in vielen klinischen Studien gezeigte fehlende Wirksamkeit einer COX-inhibierenden Therapie [47]. Die gezeigte Erholung der COX-assoziierten Eicosanoidantwort bei Patienten mit

positiver Prognose deutet potentiell eher auf einen Negativeffekt einer COX-inhibierenden Therapie hin.

Unter Anwendung des im Rahmen dieser Promotionsarbeit ausgearbeiteten in-vitro LPS Vollblutaktivierungs-Modells konnte zusammenfassend eine differentielle Eicosanoidantwort bei Patienten mit Sepsis gegenüber Gesunden gezeigt werden. Sepsis-Patienten wiesen dabei gegenüber Gesunden eine deutlich reduzierte Freisetzung COX-assoziiierter Metabolite auf, das Ausmaß der reduzierten Mediatorenfreisetzung war mit der Schwere der Erkrankungssymptomatik und dem klinischen Outcome assoziiert. Die vorliegende Promotionsarbeit liefert die Grundlage für weiterführende klinische Studien, die das diagnostische und prognostische Potential der Bestimmung der Eicosanoidantwort im in-vitro LPS Vollblutaktivierungs-Modell und eine potentielle Überlegenheit gegenüber derzeitig eingesetzten Biomarkern adressieren.

VI. Literatur

1. Brunkhorst, F.M., et al., [Prevention and follow-up care of sepsis. 1st revision of S2k guidelines of the German Sepsis Society (Deutsche Sepsis-Gesellschaft e.V., DSG) and the German Interdisciplinary Association of Intensive Care and Emergency Medicine (Deutsche Interdisziplinäre Vereinigung für Intensiv- und Notfallmedizin, DIVI)]. *Internist (Berl)*, 2010. 51(7): p. 925-32.
2. Kumar, A., et al., A survival benefit of combination antibiotic therapy for serious infections associated with sepsis and septic shock is contingent only on the risk of death: a meta-analytic/meta-regression study. *Critical care medicine*, 2010. 38(8): p. 1651-64.
3. Bone, R.C., et al., Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. 1992. *Chest*, 2009. 136(5 Suppl): p. e28.
4. Bone, R.C., et al., Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest*, 1992. 101(6): p. 1644-55.
5. Vincent, J.L., Clinical sepsis and septic shock--definition, diagnosis and management principles. *Langenbecks Arch Surg*, 2008. 393(6): p. 817-24.
6. Okazaki, Y. and A. Matsukawa, Pathophysiology of sepsis and recent patents on the diagnosis, treatment and prophylaxis for sepsis. *Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov*, 2009. 3(1): p. 26-32.
7. Wiersinga, W.J., et al., Host innate immune responses to sepsis. *Virulence*, 2014. 5(1): p. 36-44.
8. Kuper, C., Beck, F.X. and Neuhofer, W., Toll-like receptor 4 activates NF-kappaB and MAP kinase pathways to regulate expression of proinflammatory COX-2 in renal medullary collecting duct cells. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2012. 302(1): p. F38-46.
9. Shubin, N.J., Monaghan, S.F. and Ayala, A., Anti-inflammatory mechanisms of sepsis. *Contrib Microbiol*, 2011. 17: p. 108-24.
10. Angus, D.C. and van der Poll, T., Severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med*, 2013. 369(9): p. 840-51.
11. Sommers, M.S., The cellular basis of septic shock. *Crit Care Nurs Clin North Am*, 2003. 15(1): p. 13-25.
12. Brealey, D., et al., Association between mitochondrial dysfunction and severity and outcome of septic shock. *Lancet*, 2002. 360(9328): p. 219-23.
13. Coopersmith, C.M., et al., Inhibition of intestinal epithelial apoptosis and survival in a murine model of pneumonia-induced sepsis. *JAMA*, 2002. 287(13): p. 1716-21.
14. Gofton, T.E. and Young, G.B., Sepsis-associated encephalopathy. *Nat Rev Neurol*, 2012. 8(10): p. 557-66.
15. Kockara, A. and Kayatas, M., Renal cell apoptosis and new treatment options in sepsis-induced acute kidney injury. *Ren Fail*, 2013. 35(2): p. 291-4.
16. Oberhoffer, M., et al., Outcome prediction by traditional and new markers of inflammation in patients with sepsis. *Clin Chem Lab Med*, 1999. 37(3): p. 363-8.
17. Mitaka, C., et al., Relationships of circulating nitrite/nitrate levels to severity and multiple organ dysfunction syndrome in systemic inflammatory response syndrome. *Shock*, 2003. 19(4): p. 305-9.

18. Oberhoffer, M., et al., Katalcalcin and calcitonin immunoreactivity in different types of leukocytes indicate intracellular procalcitonin content. *J Crit Care*, 1999. 14(1): p. 29-33.
19. Shubin, N.J., et al., BTLA expression contributes to septic morbidity and mortality by inducing innate inflammatory cell dysfunction. *J Leukoc Biol*, 2012.
20. Backes, Y., et al., Usefulness of suPAR as a biological marker in patients with systemic inflammation or infection: a systematic review. *Intensive Care Med*, 2012.
21. Riedel, S., Procalcitonin and the role of biomarkers in the diagnosis and management of sepsis. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2012. 73(3): p. 221-7.
22. Schuetz, P., Haubitz, S. and Mueller, B., Do sepsis biomarkers in the emergency room allow transition from bundled sepsis care to personalized patient care? *Curr Opin Crit Care*, 2012. 18(4): p. 341-9.
23. Kopterides, P. and Tsangaris, I., Procalcitonin and sepsis: recent data on diagnostic utility prognostic potential and therapeutic implications in critically ill patients. *Minerva Anestesiol*, 2012. 78(7): p. 823-35.
24. Schuetz, P., Albrich, W. and Mueller, B. Procalcitonin for diagnosis of infection and guide to antibiotic decisions: past, present and future. *BMC Med*, 2011. 9: p. 107.
25. Uzzan, B., et al., Procalcitonin as a diagnostic test for sepsis in critically ill adults and after surgery or trauma: a systematic review and meta-analysis. *Crit Care Med*, 2006. 34(7): p. 1996-2003.
26. Miguel-Bayarri, V., et al., Prognostic value of the biomarkers procalcitonin, interleukin-6 and C-reactive protein in severe sepsis. *Med Intensiva*, 2012.
27. Iapichino, G., et al., Daily monitoring of biomarkers of sepsis in complicated long-term ICU-patients: can it support treatment decisions? *Minerva Anestesiol*, 2010. 76(10): p. 814-23.
28. Urbonas, V., Eidukaite, A. and I. Tamuliene, I., The diagnostic value of interleukin-6 and interleukin-8 for early prediction of bacteremia and sepsis in children with febrile neutropenia and cancer. *J Pediatr Hematol Oncol*, 2012. 34(2): p. 122-7.
29. Faix, J.D., Biomarkers of sepsis. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 2013. 50(1): p. 23-36.
30. Oda, S., et al., Sequential measurement of IL-6 blood levels in patients with systemic inflammatory response syndrome (SIRS)/sepsis. *Cytokine*, 2005. 29(4): p. 169-75.
31. Cook, J.A., Eicosanoids. *Crit Care Med*, 2005. 33(12 Suppl): p. S488-91.
32. Calder, P.C., Polyunsaturated fatty acids and inflammatory processes: New twists in an old tale. *Biochimie*, 2009. 91(6): p. 791-5.
33. Astudillo, A.M., et al., Dynamics of arachidonic acid mobilization by inflammatory cells. *Biochim Biophys Acta*, 2012. 1821(2): p. 249-56.
34. Malhotra, S., Deshmukh, S.S. and Dastidar, S.G., COX inhibitors for airway inflammation. *Expert Opin Ther Targets*, 2012. 16(2): p. 195-207.
35. Miles, E.A. and Calder, P.C., Influence of marine n-3 polyunsaturated fatty acids on immune function and a systematic review of their effects on clinical outcomes in rheumatoid arthritis. *Br J Nutr*, 2012. 107 Suppl 2: p. S171-84.
36. Patterson, E., et al., Health implications of high dietary omega-6 polyunsaturated Fatty acids. *J Nutr Metab*, 2012. 2012: p. 539426.
37. Hayakawa, S., et al., Association of plasma omega-3 to omega-6 polyunsaturated fatty acid ratio with complexity of coronary artery lesion. *Intern Med*, 2012. 51(9): p. 1009-14.
38. Bulger, E.M. and Maier, R.V., Lipid mediators in the pathophysiology of critical illness. *Crit Care Med*, 2000. 28(4 Suppl): p. N27-36.
39. Ott, J., Hiesgen, C. and Mayer, K., Lipids in critical care medicine. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 2011. 85(5): p. 267-73.

40. Heller, A., et al., Lipid mediators in inflammatory disorders. *Drugs*, 1998. 55(4): p. 487-96.
41. Kortz, L., et al., Fast liquid chromatography-quadrupole linear ion trap-mass spectrometry analysis of polyunsaturated fatty acids and eicosanoids in human plasma. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2013. 927: p. 209-13.
42. Bosshart, H. and Heinzelmann, M., Targeting bacterial endotoxin: two sides of a coin. *Ann N Y Acad Sci*, 2007. 1096: p. 1-17.
43. Jiang, Q., et al., Lipopolysaccharide induces physical proximity between CD14 and toll-like receptor 4 (TLR4) prior to nuclear translocation of NF-kappa B. *J Immunol*, 2000. 165(7): p. 3541-4.
44. Marchant, A., et al., Lipopolysaccharide induces up-regulation of CD14 molecule on monocytes in human whole blood. *Eur J Immunol*, 1992. 22(6): p. 1663-5.
45. Lang, J.D. and Matute-Bello, G., Lymphocytes, apoptosis and sepsis: making the jump from mice to humans. *Critical care*, 2009. 13(1): p. 109.
46. Bernard, G.R., et al., Prostacyclin and thromboxane A2 formation is increased in human sepsis syndrome. Effects of cyclooxygenase inhibition. *Am Rev Respir Dis*, 1991. 144(5): p. 1095-101.
47. Haupt, M.T., et al., Effect of ibuprofen in patients with severe sepsis: a randomized, double-blind, multicenter study. The Ibuprofen Study Group. *Crit Care Med*, 1991. 19(11): p. 1339-47.

VII. Erklärung über die eigenständige Abfassung der Arbeit

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren.

.....

Datum

.....

Unterschrift

Publikationen

“Sepsis-associated changes of the arachidonic acid metabolism and their diagnostic potential in septic patients”

(Bruegel et.al., Crit Care Med 2012; 40: 1478-1436)

“Simultaneous eicosanoid profiling and identification by liquid chromatography and hybrid triple quadrupole-linear ion trap mass spectrometry for metabolomic studies in human plasma”

(Kortz et.al., J Lab Med 2009; 33(6): 341-348)

Posterpräsentationen

“Differential Eicosanoid Response in Healthy Blood Donors after Whole Blood Activation with LPS”

(Ludwig et.al., 8th Leipzig Research Festival for Life Sciences 2009, Leipzig sowie 6. Jahrestagung der DGKL 2009, Leipzig)

“Differential Eicosanoid Response in Healthy Controls and Sepsis Patients after LPS Whole Blood Activation”

(Ludwig et.al., 7. Jahrestagung der DGKL 2010, Mannheim)

“Differential Eicosanoid Response in Healthy Blood Donors and Patients with Sepsis after LPS Whole Blood Activation”

(Ludwig et.al., 8th World Congress on Trauma, Shock, Inflammation and Sepsis – TSIS 2010, München)

.....

Datum

.....

Unterschrift

**IX. Spezifizierung des wissenschaftlichen Beitrages von Frau Ute Ludwig zur
Publikation bei geteilter Erstautorenschaft**

“Sepsis-associated changes of the arachidonic acid metabolism and their diagnostic potential in septic patients” (Bruegel et.al., Crit Care Med 2012; 40: 1478-1436)

Die oben genannte Publikation resultiert aus den in der Promotionsarbeit von Frau Ludwig erhobenen Daten. Frau Ludwig war im Rahmen der Arbeit wesentlich beteiligt an Projektkonzeption, Patientenrekrutierung und Probengewinnung. Die Etablierungsexperimente für die Standardisierung des Aktivierungs-Modells, die Vollblutaktivierung bei Sepsis-Patienten und Gesunden sowie die Probenvorbereitung für die Durchführung der Analytik und die Auswertung der gewonnenen Daten wurden durch Frau Ludwig selbständig unter entsprechender Anleitung durchgeführt. In die Publikationserstellung war Frau Ludwig aktiv eingebunden.

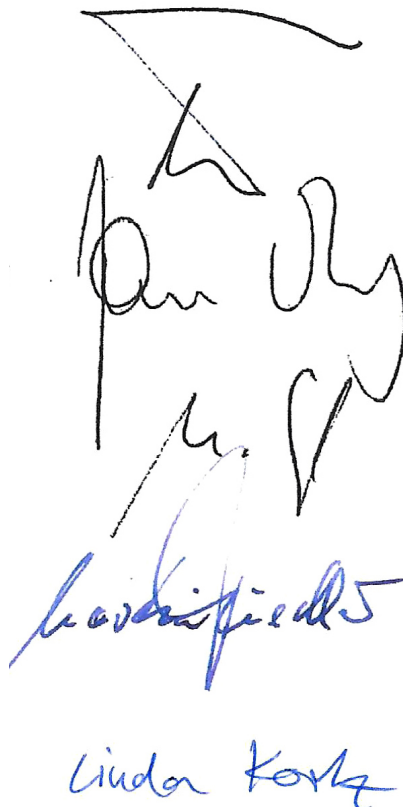
Dr. med. Mathias Brügel
Korrespondierender Autor

Prof. Dr. med. Joachim Thiery
Co-Autor

PD Dr. rer. nat. Uta Ceglarek
Co-Autorin

Prof. Dr. med. Martin Fiedler
Co-Autor

M. sc. Linda Kortz
Co-Autorin



The image shows four handwritten signatures stacked vertically. The top signature is in black ink and appears to be 'M. Brügel'. The second signature is also in black ink and appears to be 'J. Thiery'. The third signature is in blue ink and appears to be 'U. Ceglarek'. The bottom signature is in blue ink and appears to be 'L. Kortz'.

X. Danksagung

An erster Stelle danke ich Herrn Prof. Dr. med. Joachim Thiery für die Überlassung des Promotionsthemas und seine Unterstützung, das mir von ihm entgegengebrachte Vertrauen und die mir zugestandene Freiheit bei der Bearbeitung meiner Doktorarbeit.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei Herrn Dr. med. Mathias Brügel für die hervorragende Betreuung meiner Arbeit, seine jederzeit verfügbare großzügige Hilfe bei der Konzeption, der Durchführung und dem Schreiben von Publikation und Promotion sowie für die überaus freundschaftliche Art der Zusammenarbeit. Sein Beitrag war unverzichtbar für das Gelingen dieser Doktorarbeit.

Ebenso bedanke ich mich bei Frau PD Dr. rer. nat. Uta Ceglarek und Herrn Prof. Dr. med. Martin Fiedler für die zahlreichen hilfreichen Ratschläge und voranbringende, konstruktive Kritik. Mein Dank geht auch an Frau Linda Kortz für ihre außerordentliche Hilfsbereitschaft und Unterstützung bei der massenspektrometrischen Messung meiner Proben und der Auswertung der Ergebnisse. Ein besonderer Dank geht auch an Frau Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Lesca Miriam Holdt für ihre Unterstützung in der molekularbiologischen Analytik. Des Weiteren bedanke ich mich bei Herrn PD Dr. med. habil. Sirak Petros, der mir die Patientenrekrutierung auf seiner Intensivstation ermöglichte.

Ein herzliches Dankeschön gilt allen Kolleginnen und Kollegen im Forschungslabor, sowie allen anderen Doktoranden, durch deren Anwesenheit sich der Laboralltag deutlich abwechslungsreicher und unterhaltsamer gestaltete.

Zum Abschluss möchte ich meinen Eltern, Martina und Thomas Ludwig sowie meiner Schwester Doris Simon danken, die immer ein offenes Ohr für mich hatten und oft für den nötigen Motivationsschub sorgten. Ebenso wären mir ohne die finanzielle Unterstützung durch meine Familie weder Medizinstudium noch Promotion möglich gewesen.