

**Korrelative Veränderungen in der Assoziation
von Sphingosin 1-Phosphat mit den unterschiedlichen
Transportproteinen im Plasma von septischen Patienten**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von: **Konstantin Benjamin März, M.Sc.**
geboren am 03.03.1993 in Stuttgart

Gutachter:

1. Prof. Dr. rer. nat. Markus Gräler, Friedrich-Schiller-Universität Jena
2. Prof. Dr. med. Regine Heller, Friedrich-Schiller-Universität Jena
3. PD Dr. Dr. med. Tobias Schulze, Universität Greifswald

Tag der öffentlichen Verteidigung: 20. Juli 2021

Inhaltsverzeichnis

Seite

Abkürzungsverzeichnis

Zusammenfassung

1. Einleitung	1
1.1 Sepsis im Überblick	1
1.1.1 Definition und Klassifikation	2
1.1.2 Krankheitserreger, Symptome und Diagnose	4
1.1.3 Pathologie der Sepsis	6
1.2 Sphingosin 1-Phosphat (S1P) im Überblick	7
1.2.1 Definition, Charakteristik und Funktion	7
1.2.2 Sphingosin 1-Phosphat Metabolismus	9
1.2.3 Signaltransduktion S1P	10
1.3 Transportproteine im Überblick	12
1.3.1 Bildung, Charakteristik und Funktion von Lipoproteinen	12
1.3.2 Bildung, Charakteristik und Funktion von Serum Albumin	15
1.4 Zur Wechselwirkung von Transportproteinen, S1P und Sepsis	16
2. Wissenschaftliche Fragestellung	18
3. Material und Methoden	19
3.1 Studienpopulation	19
3.2 Material	21
3.3 Lipoprotein-Präzipitation	24
3.3.1 Definition und Methodik	24
3.3.2 Durchführung	24
3.4 Lipid-Extraktion und Quantifizierung von S1P	26
3.4.1 Definition und Methodik	26
3.4.2 Durchführung	30
3.5 Verwendete statistische Analyseverfahren	32

	Seite
4. Ergebnisse	33
4.1 Demographische Daten	34
4.2 Konzentrationsmessung und Verteilung von Transportprotein-S1P	35
4.3 Vergleich zwischen Transportprotein und Transportprotein-S1P	41
4.4 Regression und Korrelation	45
4.5 Konzentrationsmessung bezogen auf die 28-Tage-Mortalität	48
4.6 Ergebnisse im Überblick	50
5. Diskussion	51
5.1 Methode	52
5.2 Demographische Daten	52
5.3 S1P-Verteilung an den Transportproteinen	52
5.4 SA-S1P	54
5.5 HDL-S1P	57
5.6 LDL- und VLDL-S1P	59
5.7 Auswirkungen eines S1P-Abfalls an seinen Transportproteinen	60
6. Schlussfolgerungen	62
Literaturverzeichnis	63
Anhang	
- Verzeichnis der Abbildungen	
- Verzeichnis der Tabellen	
- Ehrenwörtliche Erklärung	
- Danksagung	

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ANOVA	Analysis of variance
APCI	Atmospheric Pressure Chemical Ionisation
Apo	Apoprotein
Ca ²⁺	Calcium
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
CI	chemische Ionisation
CoV	Coronavirus
Cer	Ceramid
CRP	C-Reaktives-Protein
DAMP	Damage associated Pattern
dl	Deziliter
DES	Dihydroceramid Δ 4-Desaturase
DIC	Disseminierte intravasale Gerinnung
DNA	DesoxyriboNucleid Acid
EI	Elektronenstoßionisation
EDG-1	Endothel Differentiation Gen-1
EGF	Endothel Growth Factor
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ESI	Electronenspray Ionisation
FI	Feldionisation
FAB	Fast Atom Bombardment
FD	Felddesorption
FT-ICR	Fourier-Transform-Ionencyclotronresonanz
GCS	Glasgow Coma Scale
GPCR	G-Protein gekoppelte Rezeptoren
GTP	Guanosintriphosphat
HA	Human Albumin
HDL	High Density Lipoprotein
HPLC	Hochdruck-Flüssigkeits Chromatographie

IDL	Intermediate Density Lipoprotein
IκB	Inhibitor of Kappa B
IKK	IκB Kinase-Komplex
IL	Interleukin
ITS	Intensivstation
JNK	C-Jun N-terminal Kinases
kDA	Kilo Dalton
LC/MS/MS	Liquid-Chromatographie Massenspektrometrie/ Massenspektrometrie
LDL	Low Density Lipoprotein
LIT	Lineare Quadrupol-Ionenfalle
LPP	Lipidphosphat Phosphatasen
LPS	Lipopolysaccharide
MALDI	Matrix-unterstützte LaserDesorption/Ionisation
MAP	Mitogen-Activated Protein
MCP	Monocyte chemotactic protein
Mg	Milligramm
MgCL ₂	Magnesiumchlorid
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
MRM	mehrfache Reaktionsüberwachung
mRNA	Messenger Ribonucleid acid
MS	Massenspektrometer
Ms	Massefilter
m/z	Masse-zu-Ladungs-Verhältnis
n/a	nicht anwendbar
Na ₃ [P(W ₃ O ₁₀) ₄]	Sodium phosphotungstate tribasic hydrate
NaCL	Potassium Chlorid
NF-κB	Nuclear Factor κ-light-chain-enhancer of Activated B cells
ns	nicht signifikant
PAMP	Pathogen associated Pattern
PCT	Procalcitonin
QIT	Quadrupol-Ionenfalle
qSOFA	Quick Sequential Organ Failure Assessment

RCT	Reverser Cholesterintransport
RhoA	Ras homolog gene family, member A
RF	Radio-Frequenz Quadrupol
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
S1P	Sphingosin-1-Phosphat
S1PR1-5	Sphingosin-1-Phosphat Rezeptor 1-5
SA	Serum Albumin
SIRS	Systemic inflammatory Response-Syndrom
SEM	Sekundärelektronenvervielfacher
SM	Sphingomyelin
SOFA	Sequential Organ Failure Assessment
Sph	Sphingosine
SphK1-2	Sphingosinkinase 1-2
Tab.	Tabelle
TNF α	Tumor-Nekrose Faktor α
TOF	Time-of-Flight
VLDL	Very Low Density Lipoprotein
VSMC	Very smooth muscle cells
WHO	World Health Organization
z.B.	zum Beispiel
μm	Mikrometer
μL	Mikroliter

Zusammenfassung

Das Forschungsinteresse an der Thematik „Sepsis“ beruht auf der Tatsache, dass Sepsis sowohl national als auch international eine der häufigsten Todesursachen ist. Sphingolipide und Proteine des Sphingolipid-Stoffwechsels spielen eine zentrale Rolle bei pathophysiologischen Prozessen im Verlauf einer Sepsis. Sphingosin 1-Phosphat (S1P) ist im Plasma von Menschen hauptsächlich mit dem Lipoprotein hoher Dichte (HDL) und Serum Albumin (SA) assoziiert. Im Rahmen dieser Arbeit wurde mittels einer massenspektrometrischen Analyse von Plasmaproben septischer Patienten untersucht, inwieweit es bei Sepsis zu einem Abfall bzw. einer prozentualen Umverteilung von S1P an seinen spezifischen Transportproteinen HDL und SA kommt und welche Erkenntnisse daraus für die Schwere und Letalität der Erkrankung resultieren.

Als zentrales Ergebnis ist festzuhalten, dass es während einer Sepsis signifikante Unterschiede sowohl in der Konzentration als auch in der prozentualen Verteilung von S1P an seinen Transportproteinen gibt. Im Verlauf einer Sepsis bis hin zum septischen Schock, der durch einen hohen SOFA-Score charakterisiert wird, kommt es zu einem Abfall der Gesamt-S1P-Konzentration im Plasma von Patienten ($205,5\mu\text{g/L} \rightarrow 96,4\mu\text{g/L}$), der mit der Schwere einer Sepsis signifikant stark korreliert ($\rho -0,71$, $p < 0,0001$). Darüber hinaus ist im Verlauf einer Sepsis ein Konzentrationsabfall von S1P an seinen spezifischen Transportproteinen festzustellen. Es kommt bereits bei chirurgischen Patienten zu einem 60-70%igen Konzentrationsabfall von SA-S1P. Allerdings ergibt sich eine prozentuale Umverteilung innerhalb des Gesamt-Plasma S1P von SA-S1P zugunsten hauptsächlich des HDL-S1P und in geringerem Maße zu VLDL-S1P, wobei die Gesamt-Plasma S1P Konzentration ($199,4\mu\text{g/L}$) relativ konstant bleibt. Im Verlauf einer Sepsis bis hin zum septischen Schock wird der Konzentrationsabfall des Gesamt-Plasma S1P signifikant durch den Abfall des HDL-S1P ($93,7\mu\text{g/L} \rightarrow 51,3\mu\text{g/L}$) und in geringerem Maße des LDL-S1P ($31,0\mu\text{g/L} \rightarrow 16,5\mu\text{g/L}$) bestimmt. Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen vermuten, dass der Abfall des HDL-S1P und HDL als prognostischer Parameter bezüglich der Schwere und der Mortalität einer Sepsis interpretiert werden kann. Die gewonnenen Erkenntnisse eröffnen damit neue Ansatzpunkte für weitere Studien und Therapieansätze in diesem Forschungsgebiet.

Einen Teil der Ergebnisse, die im Rahmen dieser empirischen Studie gewonnen wurden, hat der Verfasser (als Co-Autor) im Intensive Care Journal publiziert (Winkler et al., 2019).

RESEARCH

Open Access



Loss of sphingosine 1-phosphate (S1P) in septic shock is predominantly caused by decreased levels of high-density lipoproteins (HDL)

Martin Sebastian Winkler^{1,6}, Konstantin B. März², Axel Nierhaus³, Günter Daum⁴, Edzard Schwedhelm⁵, Stefan Kluge³ and Markus H. Gräler^{2*}

Abstract

Background: Sphingosine 1-phosphate (S1P) is a signaling lipid essential in regulating processes involved in sepsis pathophysiology, including endothelial permeability and vascular tone. Serum S1P is progressively reduced in sepsis patients with increasing severity. S1P function depends on binding to its carriers: serum albumin (SA) and high-density lipoproteins (HDL). The aim of this single-center prospective observational study was to determine the contribution of SA- and HDL-associated S1P (SA-S1P and HDL-S1P) to sepsis-induced S1P depletion in plasma with regard to identify future strategies to supplement vasoprotective S1P.

Methods: Sequential precipitation of lipoproteins was performed with plasma samples obtained from 100 ICU patients: surgical trauma ($n = 20$), sepsis ($n = 63$), and septic shock ($n = 17$) together with healthy controls ($n = 7$). Resultant fractions with HDL and SA were analyzed by liquid chromatography coupled to triple-quadrupole mass spectrometry (LC-MS/MS) for their S1P content.

Results: Plasma S1P levels significantly decreased with sepsis severity and showed a strong negative correlation with increased organ failure, quantified by the Sequential Organ Failure Assessment (SOFA) score ($r = -0.59$, $P < 0.001$). In controls, total plasma S1P levels were $208 \mu\text{g/L}$ ($187\text{--}216 \mu\text{g/L}$). In trauma patients, we observed an early loss of SA-S1P (-70%) with a concurrent increase of HDL-S1P ($+20\%$), resulting in unaltered total plasma S1P with $210 \mu\text{g/L}$ ($143\text{--}257 \mu\text{g/L}$). The decrease of plasma S1P levels with increasing SOFA score in sepsis patients with $180.2 \mu\text{g/L}$ ($123.3\text{--}253.0 \mu\text{g/L}$) and in septic shock patients with $99.5 \mu\text{g/L}$ ($80.2\text{--}127.2 \mu\text{g/L}$) was mainly dependent on equivalent reductions of HDL and not SA as carrier protein. Thus, HDL-S1P contributed most to total plasma S1P in patients and progressively dropped with increasing SOFA score.

Conclusions: Reduced plasma S1P was associated with sepsis-induced organ failure. A constant plasma S1P level during the acute phase after surgery was maintained with increased HDL-S1P and decreased SA-S1P, suggesting the redistribution of plasma S1P from SA to HDL. The decrease of plasma S1P levels in patients with increasing sepsis severity was mainly caused by decreasing HDL and HDL-S1P. Therefore, strategies to reconstitute HDL-S1P rather than SA-S1P should be considered for sepsis patients.

Keywords: Volume resuscitation, Serum albumin, Sepsis, Sequential Organ Failure Assessment, Endothelial cell barrier

* Correspondence: Markus.Graeler@med.uni-jena.de

²Department of Anesthesiology and Intensive Care Medicine, Center for Sepsis Control and Care (ESCC) and the Center for Molecular Biomedicine (CMB), Jena University Hospital, Hans-Knöll-Str. 2, 07745 Jena, Germany
Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s) 2019. **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

1. Einleitung

1.1 Sepsis im Überblick

Das Thema Sepsis ist regelmäßig Gegenstand von wissenschaftlichen Diskussionen (Singer et al. 2016, Fleischmann et al. 2016, Yusef et al. 2017). Nicht zuletzt vor dem Hintergrund der Corona-Krise rückt das Phänomen Sepsis aktuell wieder verstärkt in den Blick der Öffentlichkeit und der medizinischen Forschung. Erste Analysen der COVID-19 Pandemie machen deutlich, dass die Letalität der Betroffenen maßgeblich davon abhängt, inwieweit durch den CoV-19 Erreger eine Sepsis hervorgerufen wird (Zhou et al. 2020).

Unter Sepsis – umgangssprachlich auch als Blutvergiftung bezeichnet – wird allgemein die schwerste Verlaufsform von akuten Infektionen verstanden, die in Anbetracht ihrer Häufigkeit und ihrer Behandlungskosten alle Gesundheitssysteme vor zentrale Herausforderungen stellt. Interpretiert man eine durch die COVID-19 Pandemie induzierte Lungenentzündung allgemein als einen inflammatorischen Prozess, der sich auch auf andere Organe auswirken kann, ergibt sich zwangsläufig die Gefahr einer Sepsis, die grundsätzlich durch jegliche Infektion im Körper ausgelöst werden kann. Nach einer aktuellen chinesischen Forschungsstudie entwickelten 59% der Patienten mit einem schweren COVID-19-Verlauf, die in einer Klinik in Wuhan (China) behandelt wurden, eine Sepsis und 20% einen septischen Schock. Bei den Todesfällen lag in 100% der Fälle eine Sepsis bzw. in 70% der Fälle ein septischer Schock vor (Zhou et al. 2020).

Das Forschungsinteresse an der Thematik Sepsis beruht nicht zuletzt auf der Tatsache, dass Sepsis - unabhängig von der aktuellen COVID-19 Pandemie - an dritter Stelle der Todesursachen in Deutschland steht (Deutsche Sepsis-Hilfe e.V. 2017). Wissenschaftliche Untersuchungen zeigen, dass Sepsis auch weltweit die Ursache zahlreicher Todesfälle ist (Fleischmann et al. 2016). Vor diesem Hintergrund stellt sich grundsätzlich die Frage, welche Ursachen und Einflussfaktoren eine Sepsis auslösen und auf welche Weise dadurch Störungen des menschlichen Immunsystems hervorgerufen werden können. Auf dieser Grundlage können geeignete Therapien entwickelt werden.

1.1.1 Definition und Klassifikation

Im Rahmen der wissenschaftlichen Analyse des Phänomens Sepsis gab es mehrere Ansätze, den Begriff „Sepsis“ wissenschaftlich exakt zu definieren. Im Jahr 1991 wurden die Begriffe SIRS (systemisches inflammatorisches Response-Syndrom), Sepsis, schwere Sepsis und septischer Schock etabliert (Bone et al. 1992). Aufgrund der geringen Spezifität der SIRS-Kriterien erfolgte 2001 eine Reevaluation der Sepsis-Klassifikationsmerkmale. Unter Beibehaltung der obengenannten begrifflichen Dreiteilung einer Sepsis wurde eine Änderung der SIRS-Kriterien vorgenommen (Levy et al. 2003).

Die mangelnde Präzision sowie eine weiterhin geringe Spezifität in der Definition und Diagnostik der Sepsis führten zu national unterschiedlichen Wahrnehmungen der Inzidenz und Mortalität der Sepsis, die einen internationalen Vergleich der Sepsisfälle beeinträchtigten (Singer et al. 2016). Ebenso wurden sowohl die Identifizierung von Sepsis-Patienten als auch die unverzügliche Einleitung einer patientengerechten Sepsis-Therapie erschwert. So ist bereits eine zeitlich geringfügige Verzögerung des Therapiebeginns (von z.B. einer Stunde) unmittelbar mit einer erhöhten Sepsis-mortalität (Bloos et al. 2017) assoziiert.

Die wissenschaftliche Weiterentwicklung auf den Gebieten der Organfunktion und -morphologie, Zellbiologie, Biochemie, Immunologie und Zirkulation führten im Jahr 2016 zu einer Neu-Definition des Sepsis-Begriffs. Sepsis wird danach definiert als eine „life-threatening organ dysfunction caused by a dysregulated host response to infection“ (Singer et al. 2016). Ein septischer Schock wird definiert als ein „subset of sepsis in which particularly profound circulatory, cellular, and metabolic abnormalities are associated with a greater risk of mortality than with sepsis alone“ (Singer et al. 2016). Patienten mit septischem Schock lassen sich klinisch dadurch identifizieren, dass ein Vasopressor erforderlich ist, um bei fehlender Hypovolämie einen mittleren arteriellen Druck von 65 mm Hg oder mehr und einen Serumlaktatspiegel von mehr als 2 mmol/L (>18 mg/dL) aufrechtzuerhalten (Singer et al. 2016). Die Krankenhausmortalität eines septischen Schocks liegt bei ca. 50% (SepNet Critical Care Trials 2016).

Im Zentrum der Neu-Definition des Sepsis-Begriffs steht der SOFA-Score (Sequential Organ Failure Assessment), der das Ausmaß der Organfunktionsstörung mit einem Score zwischen 1-4 bewertet (Tab. 1). Die Organdysfunktion wird durch eine Erhöhung des SOFA-Scores um 2 Punkte beschrieben, was gleichzeitig zu einer Erhöhung der Mortalität um 10% führt (Singer et al. 2016).

Tab. 1: SOFA-Score

Organ	Parameter	SOFA-Punkte			
		1	2	3	4
Lunge	PaO ₂ /FiO ₂ mmHg	<400	<300	<200 mit Beatmung	<100 mit Beatmung
Niere	Kreatinin oder mg/dl Ausfuhrmenge ml/Tag	1,2-1,9	2,0-3,4	3,5-4,9 <500	>5,0 <200
Leber	Bilirubin mg/dl	1,2-1,9	2,0-5,9	6,0-11,9	>12,0
Herz/ Kreislauf	Blutdruck und mmHg Katecholamine	MAP> 70	Katechol. niedrig	Katechol. niedrig	Katechol. hoch
Blut/ Gerinnung	Thrombozyten 1000/mm ³	<150	<100	<50	<20
Zentrales Nervensystem	Glasgow Coma Scale	14-13	12-10	9-6	<6

Neben dem neuen SOFA-Score wurde ein Quick-SOFA-Score (qSOFA-Score) entwickelt, der lediglich drei Kriterien des SOFA-Scores – nämlich die Atemfrequenz, den mentalen Zustand und den systolischen Blutdruck – berücksichtigt (Tab. 2). Dieser vereinfachte Score ist hauptsächlich außerhalb der Intensivmedizin relevant. Bei Sepsis-Patienten, die bei zwei der genannten qSOFA-Kriterien einen positiven Score erreichen, ist die Sterblichkeitsrate deutlich erhöht (Singer et al. 2016).

Tab. 2: Quick SOFA-Score

Parameter	Kriterien
Atemfrequenz	> 22/ min
Mentaler Status	GCS <13
Systemischer Blutdruck	≤ 100 mmHg

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass mit Hilfe des SOFA- und des qSOFA-Scores spezifische Vorhersagen über die Mortalität bei einer vermuteten Infektion getroffen werden können. Basierend auf diesen Definitionskriterien kann die Behandlung einer Sepsis schnell und effizient eingeleitet werden.

1.1.2 Krankheitserreger, Symptome und Diagnose

Eine Sepsis kann grundsätzlich durch jede Infektion ausgelöst werden, wobei verschiedene Krankheitserreger (z.B. Bakterien, Viren oder Pilze) unterschieden werden (Abb. 1).

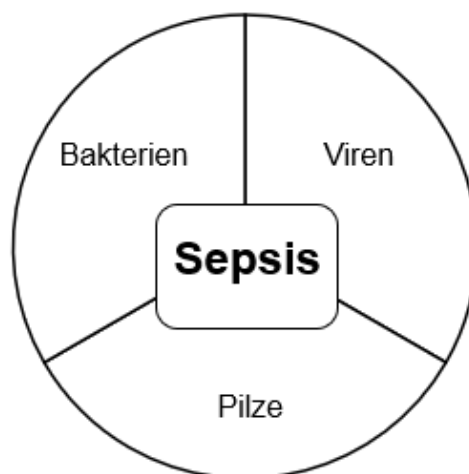


Abb. 1: Ursachen einer Sepsis im Überblick

Nach herrschender Meinung gelten Bakterien als Haupterreger einer Sepsis (Dolin et al. 2019). Zahlreiche Studien zeigen, dass ein Großteil der analysierten Kulturen positiv ist. Das Spektrum der Werte reicht von 41% (Thomas-Ruddel et al. 2018), 45,4% (Engel et al. 2007), 48,8% (Bloos et al. 2014) , 58% (Phua et al. 2013) und 60,2% (Vincent et al. 2006) bis hin zu 70% (Vincent et al. 2009). Dies bedeutet allerdings im Umkehrschluss auch, dass ein nicht unbeträchtlicher Teil der untersuchten Sepsisfälle auf anderen Ursachen beruht. Daraus resultiert die Hypothese, dass eine Sepsis auch maßgeblich durch Viren oder Parasiten ausgelöst werden könnte (Phua et al. 2013). Im Rahmen einer wissenschaftlichen Studie konnten bei 36% der betrachteten Patienten mit Pneumonie - der Hauptursache einer Sepsis - Viren nachgewiesen werden (Choi et al. 2012). Daraus folgt, dass Viren – gerade auch mit Blick auf die aktuelle Covid-19 Pandemie – als relevante Sepsis-Erreger eine bedeutende Rolle spielen (Zhou et al. 2020). Mehrere groß angelegt multizentrische Studien zeigen, dass die Lunge (ca.53,5%) der Hauptinfektionsort einer Sepsis ist. Mit Abstand folgen abdominelle (23,1%) und urogenitale Infekte (ca. 10,7%). Es ist jedoch auch möglich, dass mehrere Organsysteme zur gleichen Zeit betroffen sind (Tabah et al. 2012, Vincent et al. 2006, Phua et al. 2013, Vincent et al. 2009, Engel et al. 2007, Bloos et al. 2014, SepNet Critical Care Trials 2016, Thomas-Ruddel et al. 2018). Allerdings ist darauf hinzuweisen, dass die Ergebnisse dieser Studien teilweise noch auf der „alten“ Definition des Sepsis-Begriffs beruhen. Die untersuchten Infektionen waren je nach Studie zu 46,7% (Engel et al. 2007), zu 54,5% (Bloos et al. 2014) bzw. zu 57,2% (SepNet Critical Care Trials 2016) nosokomialen Ursprungs. Die analysierten positiven Blutkulturen wiesen in ca. 8% (Thomas-Ruddel et al. 2018), ca. 10,4% (Phua et al. 2013), ca. 10,6% (Bloos et al. 2014), ca. 12% (Tabah et al. 2012) bzw. in 29% (Vincent et al. 2006) der Fälle mehrere Erreger auf. In positiven Blutkulturen waren die am häufigsten vorkommenden Erreger Gram-negative bzw. Gram-positive Keime und Pilze. Gram-positive Keime kamen in ca. 50,8% der positiven Blutkulturen vor, wobei vor allem Staphylokokken und Streptokokken detektiert wurden. Gram-negative Keime konnten in ca. 57,3% der positiven Blutkulturen nachgewiesen werden. Hierbei handelte es sich vor allem um *Escherichia coli*, *Klebsiellen* und *Pseudomonaden* Spezies. Pilze konnten zu ca.15,6% detektiert werden, wobei *Candida albicans* die größte Rolle spielten (Tabah et al. 2012, Vincent et al. 2006, Phua et al. 2013, Vincent et al. 2009, Engel et al. 2007, Bloos et al. 2014).

1.1.3 Pathologie der Sepsis

Die Erforschung der molekularen Grundlagen von Sepsis „has revealed a far more nuanced and complex interplay between the infectious agent and host that together produce the heterogeneous manifestations of sepsis“ (Gyawali et al. 2019). Durch die Bindung sogenannter pathogen-assoziiertes molekularer Muster (PAMPs) von Pathogenen und schadens-assoziiertes molekularer Muster (DAMPs) an spezifische Rezeptoren von Zellen (Makrophagen und Monozyten) des angeborenen Immunsystems werden proinflammatorische Zytokine freigesetzt, wie Tumornekrosefaktor α (TNF α), Interleukin 1 (IL-1) und Interleukin 6 (IL-6) (Gyawali et al. 2019). Darüber hinaus kommt es zur Bildung und Aggregation von sog. Inflammasomen, die zur Ausschüttung von weiteren Zytokinen wie Interleukin 1 β (IL-1 β) und Interleukin 18 (IL-18) sowie Caspasen führen. Proinflammatorische Zytokine verursachen die Aktivierung und Proliferation von Leukozyten, die Aktivierung des Komplementsystems, die Hochregulation endothelialer Adhäsionsmoleküle und der Chemokin-Expression, die Produktion von Gewebefaktoren und die Induktion hepatischer Akutphasenreaktanten (Abb. 2). Bei einer Sepsis kommt es zu einer Überreaktion der Immunantwort „resulting in collateral damage and death of host cells and tissues“ (Gyawali et al. 2019).

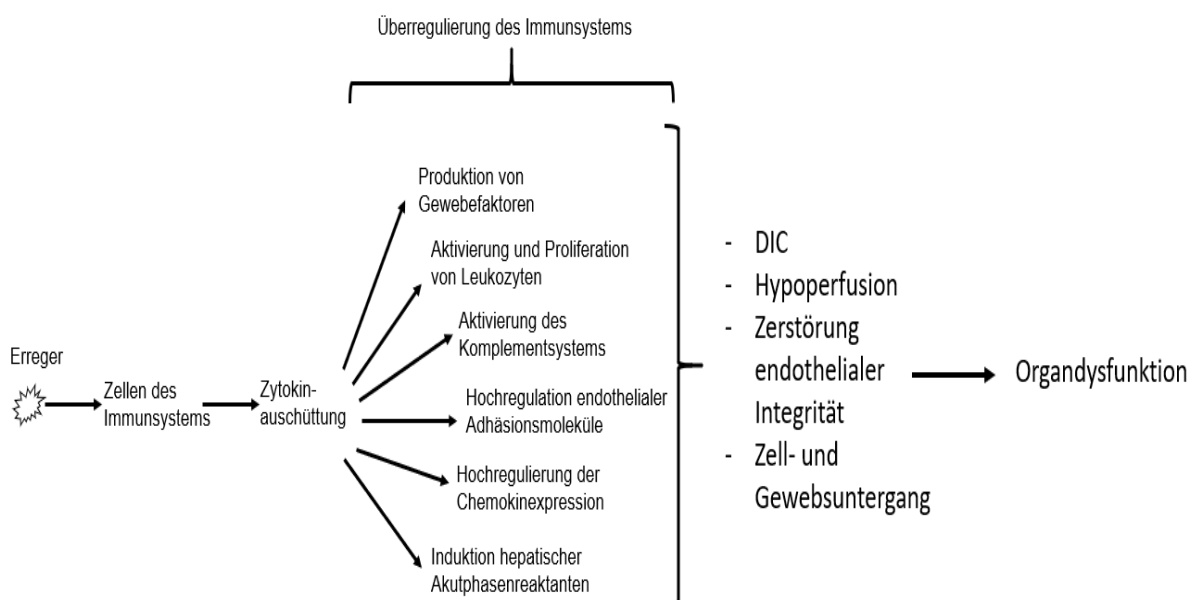


Abb. 2: Pathophysiologie einer Sepsis im Überblick

Dadurch resultiert unter anderem eine Veränderung der Hämostase mit der Entwicklung einer disseminierten intravasalen Gerinnung (DIC). „The etiology of the dysregulation of coagulation in sepsis is multifactorial” (Gyawali et al. 2019). Aufgrund einer verminderten Sauerstoffversorgung des Gewebes durch Hypoperfusion kommt es zum Untergang von Zellen und Geweben. Ebenfalls wird die endotheliale Integrität zerstört. All diese Pathologien führen zu dem Ergebnis einer Organdysfunktion, welche definitionsgemäß das Bild einer Sepsis charakterisiert (Gyawali et al. 2019).

1.2 Sphingosin 1- Phosphat (S1P) im Überblick

1.2.1 Definition, Charakteristik und Funktion

Wegen seiner rätselhaften Natur wurde Sphingosin ursprünglich nach dem griechischen Fabelwesen, der Sphinx, benannt (Thudichum 1884). Im Jahr 1986 wurde publiziert, dass Sphingosin in vitro ein Inhibitor der Protein Kinase C ist, die unter anderem einen positiven Effekt auf das Zellwachstum hat (Hannun et al. 1986). Deswegen wurde angenommen, dass Sphingosin einen zytotoxischen Effekt auf Zellen hat. Gleichzeitig konnte bei Versuchen mit Fibroblasten gezeigt werden, dass Sphingosin bei niedrigen Konzentrationen die DNA-Synthese stimuliert und synergistisch mit bekannten Wachstumsfaktoren wirkt (Zhang et al. 1990).

Vor diesem Hintergrund stellte sich die Frage, worauf dieser positive Effekt von Sphingosin auf die Zellen beruht. Es konnte gezeigt werden, dass die Zugabe von Sphingosin zu glatten Muskelzellen zu einer Freisetzung der intrazellulären Ca^{2+} Speicher führt. Jedoch wurde im Verlauf der Versuchsreihe entdeckt, dass nicht Sphingosin allein diesen Effekt auf die Calcium-Speicher hervorruft. Auf dieser Grundlage wurde erstmals die Hypothese gestellt, dass die phosphorylierte Form von Sphingosin diesen positiven Effekt vermitteln könnte (Ghosh et al. 1990). Weitere Studien belegen, dass das phosphorylierte Produkt von Sphingosin (Sphingosin-1-Phosphat) von Zellen produziert wird. Es kann Fibroblasten stimulieren und vermittelt die Calcium-Freisetzung in diesen Zellen (Zhang et al. 1991).



Abb. 3: Chemische Struktur von S1P

Mit der Entdeckung von S1P konnten die positiven Effekte von Sphingosin sowohl auf die Zelle als auch auf die Calcium-Freisetzung erklärt werden. In molekularer Form lässt sich S1P als $C_{18}H_{38}NO_5P$ charakterisieren (Abb. 3). Es hat ein Molekulargewicht von 379.5 g/mol.

Yatomi et al. konnten 1997 erstmals zeigen, dass S1P im Blut jedes Menschen vorkommt. Die S1P-Konzentration lag damals im Plasma und Serum bei ca. 191 ± 79 pmol/ml und 484 ± 82 pmol/ml (Yatomi et al. 1997). Weitere Studien gaben die S1P-Konzentration im Plasma und Serum mit 100 – 310 nM im Plasma und 372 – 680 nM je nach Bevölkerung an (Ksiazek et al. 2015, Hammad et al. 2010).

Die S1P-Konzentration im Plasma ist niedriger als die Konzentration im Serum aufgrund der S1P Freisetzung von Erythrozyten während der Gerinnung (Yatomi et al. 1997). Im Gewebe ist die S1P Konzentration (mit ca. 0.5 - 75 μ M) wesentlich niedriger (Venkataraman et al. 2008). Hämatopoetische- sowie Endothelzellen gelten als die Hauptsynthese- wie auch Hauptspeicherorte von S1P (Venkataraman et al. 2008). Der größte Teil des S1P wird in den Erythrozyten gespeichert und kann von diesen in das Blut, z.B. während der Gerinnung, abgegeben werden (Yatomi et al. 1995, Hanel et al. 2007). Der meiste Teil des extrazellulär im Plasma befindlichen S1P liegt gebunden an HDL und Albumin vor, der restliche Teil ist mit LDL und VLDL assoziiert (Murata et al. 2000).

1.2.2 Sphingosin 1-Phosphat Metabolismus

Nach der Entdeckung von Sphingosin 1-Phosphat Anfang der 90er Jahre haben zahlreiche wissenschaftliche Studien die Funktionen von S1P analysiert. S1P reguliert das Zellwachstum sowie das Zellüberleben (Zhang et al. 1991, Olivera und Spiegel 1993, Olivera et al. 1999) und unterdrückt den Ceramid-vermittelten Zelltod (Cuvillier et al. 1996). Ebenso beeinflusst S1P die endotheliale Integrität sowie die Angiogenese. S1P führt zur Proliferation von Endothelzellen sowie zu einer Stabilisierung des Zytoskeletts und der Adhärenz Junctions in Endothelzellen. Darüber hinaus unterstützt S1P eine vermehrte Bildung neuer Blutgefäße und erhält die vaskuläre Integrität (Lee et al. 1999, Garcia et al. 2001, Obinata und Hla 2019). Des Weiteren spielt S1P eine wichtige Rolle bei der Zirkulation von Lymphozyten. S1P führt über den S1PR1 zur Ausschüttung der Lymphozyten aus den Lymphknoten in das Blut (Schwab und Cyster 2007, Pappu et al. 2007).

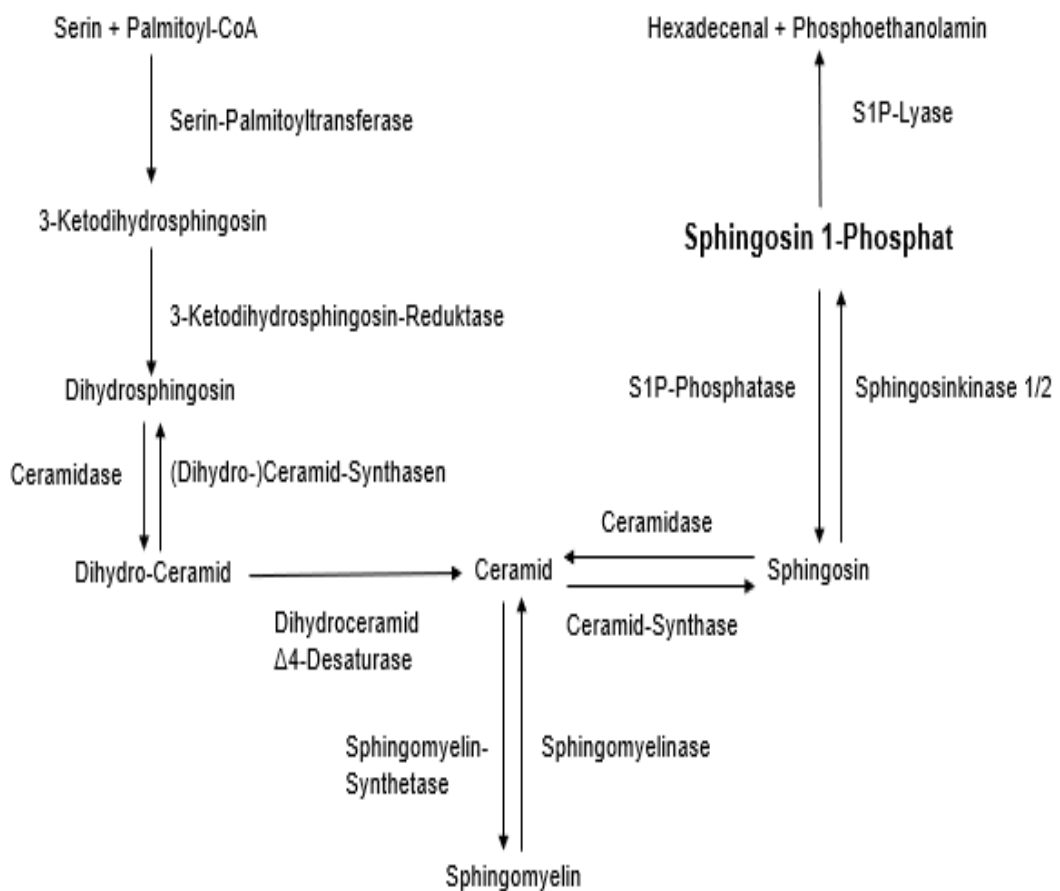


Abb. 4: De-Novo Synthese und Degradierung von Sphingosin 1-Phosphat

S1P kann grundsätzlich von allen Zellen des Körpers gebildet werden. Die De-Novo-Synthese der Sphingolipide (Abb. 4) beginnt im Endoplasmatischen Retikulum (ER). Durch die Serin-Palmitoyltransferase bildet sich aus Serin und Palmitoyl-Coa das 3-Ketodihydrosphingosin (Gault et al. 2010).

Durch die 3-Ketodihydrosphingosin-Reduktase bildet sich Dihydrosphingosin durch die Reduzierung einer Ketogruppe zu einer Hydroxylgruppe. Durch die Acetylierung von Dihydrosphingosin durch mehrere (Dihydro)Ceramid-Synthasen entwickelt sich Dihydroceramid. Die Dihydroceramid Δ 4-Desaturase (DES) ist für die Umwandlung des Dihydrosphingosin-Grundgerüsts innerhalb von Ceramid in ein Sphingosin-Grundgerüst verantwortlich und bildet somit Ceramid (Gault et al. 2010).

Nach der Deacylierung von Ceramid zu Sphingosin erfolgt die Umwandlung von Sphingosin in Sphingosin-1-Phosphat durch eine von zwei Sphingosinkinasen, die im Zytosol lokalisiert oder peripher mit spezifischen Membrankompartimenten assoziiert sind. Diese beiden Schritte sind reversibel. Im letzten Schritt des Sphingolipidabbaus wird Sphingosin-1-Phosphat durch das Enzym Sphingosin-1-Phosphat-Lyase im Endoplasmatischen Retikulum unter Bildung von Hexadecenal und Phosphoethanolamin irreversibel abgebaut (Gault et al. 2010).

1.2.3 Signaltransduktion S1P

Erste Analysen von S1P ergaben, dass eine Erhöhung der intrazellulären S1P Konzentration eine positive Rolle in der Regulierung des Zellwachstums und der intrazellulären Calciumfreisetzung einnimmt (Ghosh et al. 1990, Olivera und Spiegel 1993, Zhang et al. 1991). Daraus resultiert die Schlussfolgerung, dass S1P in der Zelle gebildet wird und dort als Second Messenger fungiert (Spiegel und Milstien 1995). Im Jahr 1998 wurde jedoch nachgewiesen, dass sich S1P mit einer hohen Spezifität und Sensitivität an einem G-Protein gekoppelten Rezeptor als Ligand bindet (Lee et al. 1998). Dieser Rezeptor wurde damals Endothelial-Differentiation Gene-1 Rezeptor (EDG-1) genannt und ist heute als S1P-Rezeptor Typ 1 bekannt (Lee et al. 1998). Im Rahmen der weiteren wissenschaftlichen Forschung konnte bei bereits bekannten Rezeptoren aufgezeigt werden, dass S1P ein Ligand dieser Rezeptoren war.

Aus dieser Erkenntnis resultierte die Entdeckung von S1PR2, S1PR3 (Ancellin und Hla 1999), S1PR4 (Graler et al. 1998) und S1PR5 (Im et al. 2000).

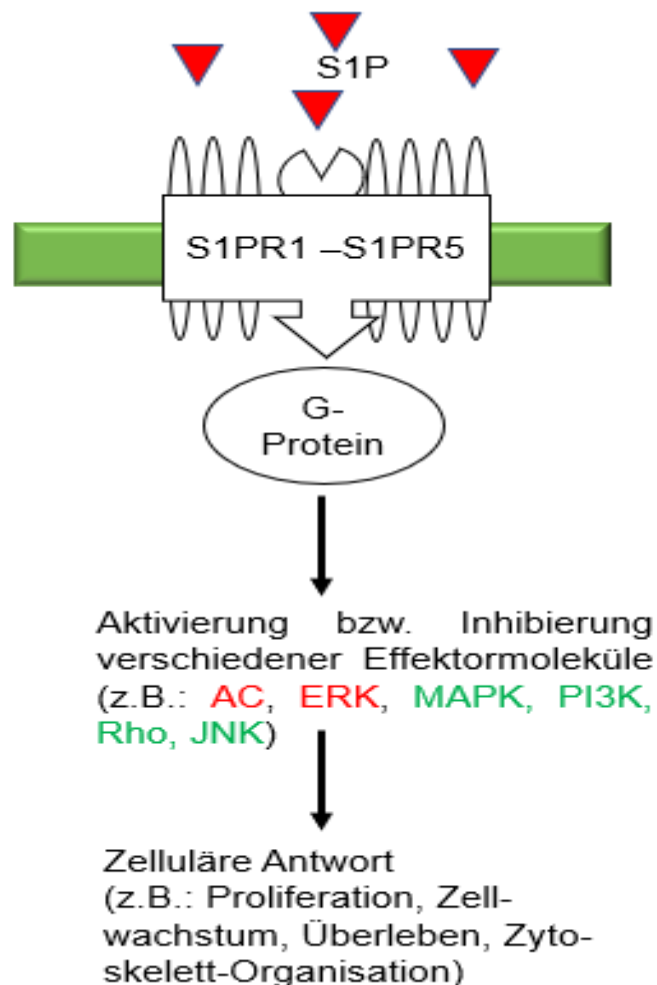


Abb. 5: Übersicht über die Signaltransduktion von S1P

Mit Ausnahme des S1P4-Rezeptors binden alle anderen Rezeptoren dieser Familie mit hoher Affinität an S1P. Die einzelnen Rezeptoren sind Guanosintriphosphat (GTP)-bindende Protein (G-Protein) - gekoppelte Rezeptoren (GPCR). Sie besitzen jeweils sieben Transmembrandomänen. Durch die Aktivierung mittels S1P kommt es zu einer heterotrimeren GTP-Bindung und -Hydrolyse an G-Proteinen, welche nachfolgende Enzyme stimulieren bzw. hemmen (Abb. 5). Durch die Stimulation der Rezeptoren werden intrazelluläre Signalwege/Moleküle wie cAMP, Ca²⁺, IP₃, MAP-Kinase, p38-Kinase, Rho, ERK, AC und JNK-Signalweg reguliert (Sanchez und Hla 2004).

1.3 Transportproteine im Überblick

Lipoproteine und Albumin spielen eine wichtige Rolle im S1P-Metabolismus. Der größte Teil des gesamten S1P im Körper liegt extrazellulär im Plasma vor (Yatomi et al. 1997). Der wesentliche Teil ist dabei an HDL und Albumin gebunden, während der restliche Teil mit LDL und VLDL assoziiert wird (Murata et al. 2000).

1.3.1 Bildung, Charakteristik und Funktion von Lipoproteinen

Lipoproteine sind Partikel, die den Transport von wasserunlöslichen Substanzen wie Cholesterin und Triglyceriden im Blut ermöglichen. Lipoproteine bestehen aus einem hydrophoben Kern, der Cholesterin und Triglyceride enthält, und einer hydrophilen Hülle, die sich aus freiem Cholesterin, Phospholipiden und Apolipoproteinen zusammensetzt (Abb. 6). Diese hydrophile Hülle bestimmt sowohl die Form als auch die Funktion eines jeden einzelnen Lipoproteins. Es lassen sich die vier Hauptlipoproteine Chylomikron, Very Low Density Lipoprotein (VLDL), Low Density Lipoprotein (LDL), High Density Lipoprotein (HDL) unterscheiden (Feingold und Grunfeld 2000).

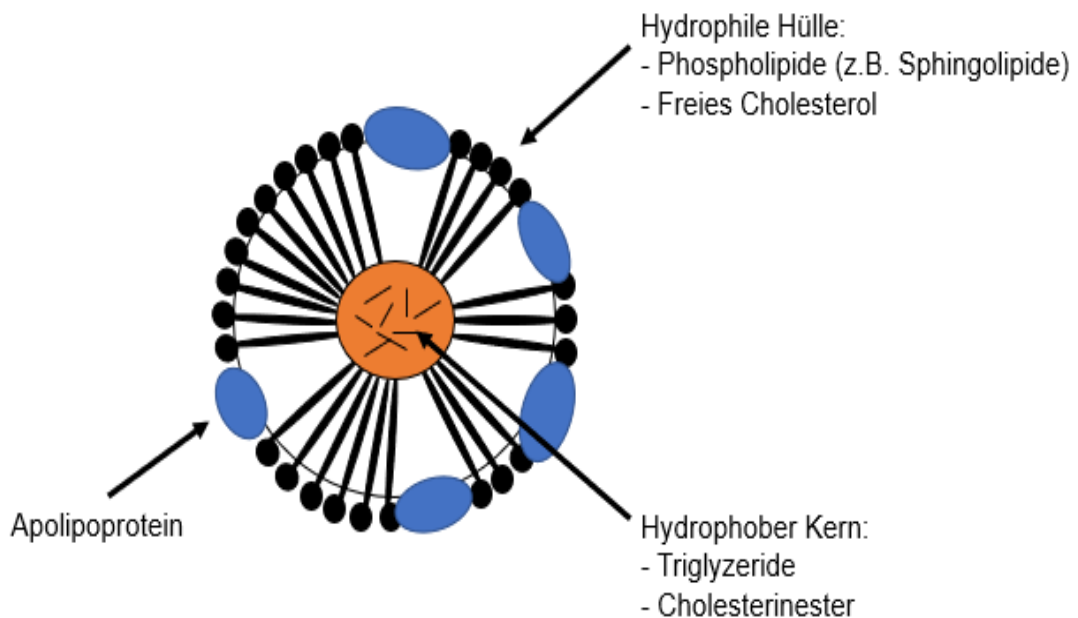


Abb.6: Grundstruktur eines Lipoproteins

Die Lipoproteine unterscheiden sich in ihrer Dichte, Größe und Zusammensetzung (Tab.3). Aufgrund ihrer speziellen Eigenschaften ist es möglich, die Lipoproteine zu trennen (Burstein et al. 1970).

Tab. 3: Übersicht über die Charakteristika der wichtigsten Lipoproteine
(in Anlehnung an Feingold und Grunfeld 2000)

Lipoprotein	Dichte (g/ml)	Größe (nm)	Hauptlipide	Haupt-Apoproteine
Chylomikron	<0,930	75-1200	Triglycerides	Apo B-48, Apo C, Apo E, Apo A-I, A-II, A-IV
VLDL	0,930-1,006	30-80	Triglycerides	Apo B-100, Apo E, Apo C
LDL	1,019-1,063	18-25	Cholesterol	Apo B-100
HDL	1,063-1,210	5-12	Cholesterol, Phospholipids	Apo A-I, Apo A-II, Apo C, Apo E

- **Chylomikron**

Chylomikrone sind zwischen 75-1200 nm groß und bilden somit die größte Fraktion der Lipoproteine. Sie besitzen eine Dichte von < 0,930 g/ml. Die Bildung der Chylomikrone erfolgt in den Enterozyten des Darms. Sie werden über den Ductus thoracicus mittels der Lymphe der Blutbahn zugeführt. Chylomikron besitzt eine hydrophile Hülle, die aus unterschiedlichen Apolipoproteinen wie A-I, A-II, A-IV, A-V, B-48, C-II, C-III, und E, Phospholipiden und freiem Cholesterol besteht. Das Hauptstruktur-Apolipoprotein ist Apo-B48. Der hydrophobe Kern besteht hauptsächlich aus Triglyzeriden. Die Hauptfunktion der Chylomikrons ist der Transport von Triglyzeriden und Cholesterol zu peripheren Geweben und der Leber (Mansbach und Siddiqi 2010, Feingold und Grunfeld 2000).

- **VLDL**

VLDL ist ca. 30-80 nm groß und wird in der Leber synthetisiert. Es besitzt eine Dichte von 0,930-1,006 g/ml. Das Hauptstruktur-Protein bildet das Apolipoprotein B (ApoB). Es besitzt eine hydrophile Hülle, die hauptsächlich aus Phospholipiden und nicht-verestertem Cholesterin besteht sowie aus einem hydrophoben Zentrum mit den zentralen Bestandteilen Triglyceriden und kleinen Mengen an Cholesterin-Estern. Die Hauptfunktion des VLDL liegt darin, hepatisch gebildete Triglyceride zu sekretieren und zu den peripheren Geweben (z.B. Muskeln) zu transportieren, um diese mit Energie zu versorgen (Tiwari und Siddiqi 2012, Gibbons 1990, Yang et al. 1986, Gruffat et al. 1996).

- **LDL**

LDL-Partikel sind 18-25 nm groß und besitzen eine Dichte von 1,019-1,063 g/ml. Durch die Bildung Intermediate Density Lipoproteine (IDL) aus VLDLs und der weiteren Hydrolyse der Triglyceride entstehen LDL-Partikel. Sie enthalten das meiste Cholesterin aller Lipoproteine. Das Hauptstruktur-Apolipoprotein ist apoB100. LDL trägt den größten Teil des Cholesterins, das sich im Blutkreislauf befindet. Seine Hauptfunktion besteht darin, Cholesterin zu den Zellen zu transportieren (Feingold und Grunfeld 2000).

- **HDL**

Humanplasma-HDLs sind eine sehr heterogene Lipoproteinfamilie. Sie besteht aus mehreren Unterklassen, die sich in Dichte, Größe, Form sowie der Lipid- und Proteinzusammensetzung unterscheiden (Tailleux und Fruchart 1996). Die Synthese beginnt in Leber oder Darm. Die HDL Moleküle können aus einer Vielzahl von verschiedenen Lipoproteinen, Enzymen, Akut-Phase-Proteine, Komplementfaktoren, Phospholipiden, Sphingolipiden, neutralen Lipiden sowie Minor Lipiden bestehen, wobei die Zusammensetzung des jeweiligen HDL Moleküls Einfluss auf dessen Funktion hat. Die Hauptstruktur-Apolipoproteine des HDLs sind Apolipoprotein A-I (apoA-I) und apoA-II.

Jedes HDL besitzt entweder ApoA-I (LpA-I) oder ApoA-I und ApoA-II (LpA-I:A-II) (Kontush et al. 2015, Lewis und Rader 2005, Zhou et al. 2015). Dichte Gradienten-Ultrazentrifugation konnte zwischen zwei Subklassen HDL2 (a, b) mit einer Dichte von 1,063–1,125 g/mL und HDL3 (a, b, c) mit einer Dichte von (1,125–1,21 g/mL unterscheiden. HDL2-Partikel haben eine größere Größe als HDL3-Partikel (Kontush et al. 2015). Mittels Isotachophorese konnten drei Subfraktionen des HDL (fHDL, iHDL, sHDL), mit jeweils unterschiedlicher Zusammensetzung, unterschieden werden. fHDL zeigt im Vergleich zu iHDL und sHDL einen erhöhten Gehalt von apoA-I, ApoA-II und Phospholipiden. sHDL hingegen besitzt die größte Menge an apoA-IV, apoD, apoE und apoJ (Bottcher et al. 2000).

Die Hauptfunktion von HDL besteht darin, überschüssiges Cholesterin zu binden und zur Leber zu transportieren, damit es anschließend durch die Galle ausgeschieden werden kann. Diesen Prozess nennt man reversen Cholesterintransport (RCT) (Zhou et al. 2015). Des Weiteren hat HDL anti-thrombotische Eigenschaften und nimmt an Prozessen der interzellulären Kommunikation teil. Gleichermäßen schützt HDL Endothelzellen vor Apoptose und fördert ihr Wachstum sowie ihre Migration. Außerdem bildet HDL einen Schutz für LDL vor der Oxidation (Mineo et al. 2006).

1.3.2 Bildung, Charakteristik und Funktion von Serum Albumin

Das Protein Albumin kommt am häufigsten im Plasma von Menschen vor. Es macht ca. 50-60% des Gesamt-Proteingehalts aus. Albumin wird in der Leber produziert (Peters 1995, Caraceni et al. 2013). Es besteht aus einer einzigen Polypeptidkette und enthält 585 Aminosäurereste (Meloun et al. 1975). Es hat ein Gesamtgewicht von ca. 69.000 Dalton. Seine Aminosäuresequenz enthält insgesamt 17 Disulfidbrücken. Albumin ist herzförmig geformt und setzt sich aus drei nahezu homologen Domänen zusammen (Abb. 7). Jede Domäne besteht aus zwei Subdomänen (A, B) (He und Carter 1992, Sugio et al. 1999). Bisher kann zwischen drei verschiedenen Unterformen des Albumins, bezogen auf das ermittelte molekulare Gewicht nach Größenfraktionierung, unterschieden werden (~90–95 kDa, ~69–73 kDa, ~50 kDa). Jede Unterform unterscheidet sich in ihren post-translationalen Modifikationen (Rhode et al. 2019).

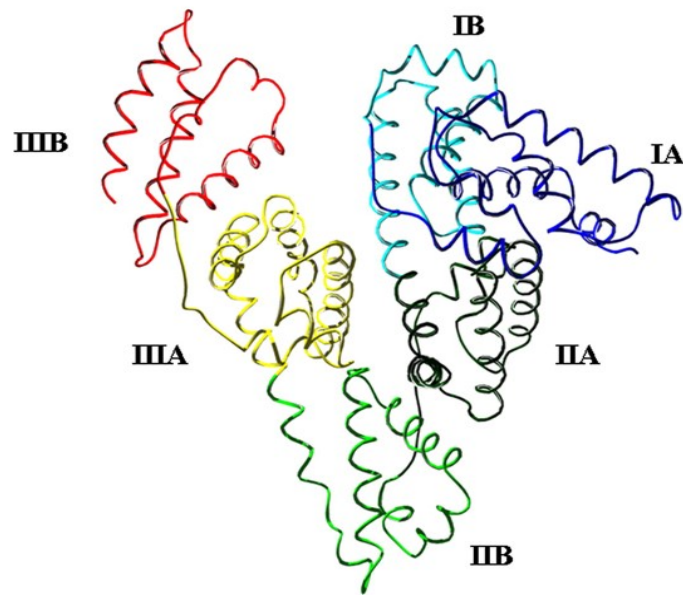


Abb. 7: 3D Struktur von Albumin (Fanali et al. 2012)

Serum Albumin (SA) ist in erster Linie für die Aufrechterhaltung des onkotischen Drucks und der mikrovaskulären Integrität zuständig. Darüber hinaus ist es essenziell für den Transport verschiedenster Metaboliten, wie z.B. S1P, Fettsäuren, Bilirubin, Ca^{2+} oder auch Medikamenten (z.B. Benzodiazepine). Es hat antioxidative und anti-thrombotische Wirkungen und spielt eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung des menschlichen Säure-Base Haushaltes (Boldt 2010, Winkler et al. 2019, Caraceni et al. 2013, Doweiko und Nompleggi 1991a).

1.4 Zur Wechselwirkung von Transportproteinen, S1P und Sepsis

S1P ist im Plasma und Serum gesunder Menschen hauptsächlich mit HDL, Albumin sowie LDL und VLDL assoziiert (Murata et al. 2000, Mishima et al. 2018). Das meiste S1P wird an HDL gebunden. Danach folgt in absteigender Reihenfolge SA, LDL und VLDL (Murata et al. 2000, Hammad et al. 2010). ApoM ist das spezifische Bindeprotein von S1P an HDL, S1P kann auch an Apo-4 binden (Christoffersen et al. 2011, Obinata et al. 2019).

Die Bindungsaffinität von S1P hängt mit der Zusammensetzung der einzelnen Lipoproteine (ApoM-Gehalt, ApoA-I/II-Gehalt, ApoB-Gehalt, Cholesteringehalt) zusammen (Kontush et al. 2007, Davidson et al. 2009, Zhang et al. 2005, Bottcher et al. 2000). Bezüglich der Bindung von S1P zu SA, LDL und VLDL gibt es in der aktuellen Literatur bisher keine Ergebnisse. Im Allgemeinen tragen die Transportproteine dazu bei, die Halbwertszeit von S1P im Plasma zu verlängern (Adamson et al. 2014). S1P, welches an HDL gebunden ist, spielt bei der Vermittlung sowohl der protektiven Eigenschaften von HDL auf die vaskuläre Integrität als auch der anti-atherosklerotischen Eigenschaften des HDLs eine essentielle Rolle (Okajima 2002, Galvani et al. 2015). Zusätzlich wurde nachgewiesen, dass eine wichtige Funktion von Albumin – und zwar die Aufrechterhaltung der vaskulären Integrität - auf eine andere Funktion von Albumin – nämlich den Transport von S1P - zurückgeführt werden kann (Adamson et al. 2014). Die Funktion des LDL-S1P und VLDL-S1P konnte bisher nicht beschrieben werden.

Während einer Sepsis können Veränderungen in Konzentration und Struktur von S1P und seinen Transportproteinen aufgezeigt werden. Verschiedenste Studien zeigen, dass S1P, HDL, LDL und SA im Serum oder Plasma von septischen Patienten abfallen. Ein Abfall dieser Analyten korreliert unter anderem mit einer schlechten Prognose bezüglich einer Sepsis und einer erhöhten Sepsisanfälligkeit (Winkler et al. 2015, Coldewey et al. 2016, Frej et al. 2016, Murch et al. 2007, Chien et al. 2005, Kendall et al. 2019, Yin et al. 2018, Shor et al. 2007, Chien et al. 2015, Bottcher et al. 2000). Die Plasma VLDL-Konzentration und die VLDL-Größe zeigen eine inverse U-geformte Korrelation mit Entzündungsparametern wie CRP und IL-6 (Jiang et al. 2016). S1P hat gemäß tierexperimenteller Studien bei Sepsis einen protektiven Effekt auf verschiedenste Organsysteme wie Lunge, Niere und Herz-Kreislauf und spielt eine wichtige Rolle in der Lymphozytenmigration (Gazit et al. 2016, Camerer et al. 2009, Oskeritzian et al. 2010, Sanna et al. 2006, Jacobson und Garcia 2007, Peng et al. 2004, Wang et al. 2015, Pappu et al. 2007). VLDL, LDL und HDL besitzen die Funktion, Lipopolysaccharide (LPS) zu binden bzw. zu neutralisieren und dadurch die Immunantwort zu dämpfen. Somit besitzen sie eine antiinflammatorische Wirkung (Levels et al. 2001). Während einer Sepsis kommt es allerdings zu einer veränderten Zusammensetzung von HDL. Es kommt unter anderem zu einem Verlust von ApoM, dem spezifischen Bindeprotein für S1P (Tanaka et al. 2020, van Leeuwen et al. 2003).

Diese sogenannte „akut Phase HDL“ hat unter bestimmten Umständen proinflammatorische Eigenschaften und kann eine Inflammation über verschiedenste Wege (erniedrigter RCT, vermehrte vaskuläre Entzündung, erhöhte LDL-Oxidierung) triggern (Gatta et al. 2012).

2. Wissenschaftliche Fragestellung

Die dargestellten Grundlagen und Wechselwirkungen zwischen Transportproteinen und S1P bei einer Sepsis bilden den Ausgangspunkt für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte empirische Studie (Abb. 8).

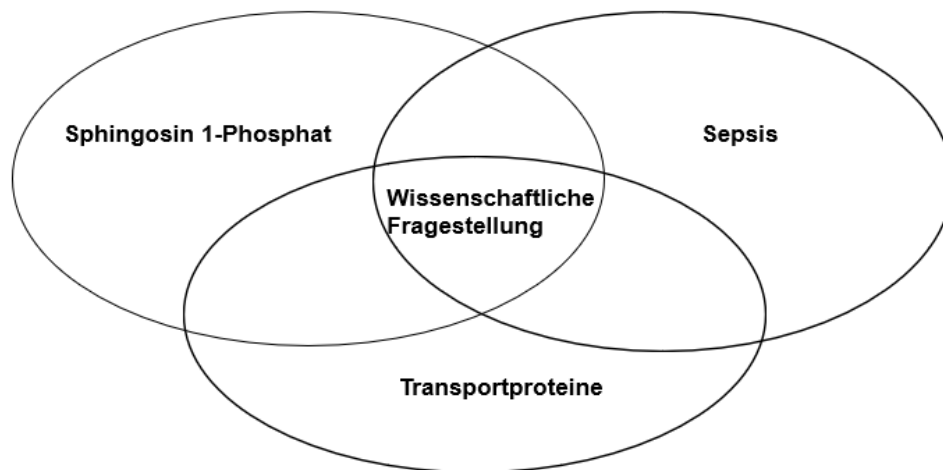


Abb. 8: Wissenschaftliche Fragestellung im Überblick

Anhand einer massenspektrometrischen Analyse von Plasmaproben von septischen Patienten wird der wissenschaftlichen Fragestellung nachgegangen, welchen Einfluss eine systemische Infektion auf die Assoziation von S1P mit spezifischen Transportproteinen hat.

3. Material und Methoden

3.1 Studienpopulation

Im Rahmen einer prospektiven Beobachtungsstudie wurden im Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf im Zeitraum von März bis Dezember 2014 die vorliegenden empirischen Daten erhoben (Winkler et al. 2015). Dabei wurden 100 Patienten berücksichtigt, die mit Sepsis bzw. nach einem chirurgischen Eingriff auf den Intensivstationen (ITS) des Universitätsklinikums aufgenommen wurden. Alle Patienten hatten ihre Einwilligung erteilt, an der Studie teilzunehmen. Die Studie umfasst gleichermaßen Patienten, bei denen eine Infektion oder ein klinisches Syndrom diagnostiziert wurde, das nach den damaligen Sepsis-Kriterien pathognomonisch für eine Infektion war (Winkler et al. 2015). Die einzelnen Untersuchungsparameter wurden im von der lokalen Forschungsethikkommission (Ärztchamber Hamburg: Referenz PV4550) genehmigten Studienprotokoll vorab definiert (Winkler et al. 2019).

Im Rahmen der Studie wurden die Plasmaproben der Patienten erstens im Hinblick auf die Gesamt-Plasma S1P-Konzentration sowie zweitens hinsichtlich der S1P-Konzentration in den einzelnen Proteinfractionen für die wichtigsten S1P-Träger HDL, SA sowie LDL und VLDL analysiert. Um die Vergleichbarkeit der Daten zu gewährleisten, wurden sämtliche Blutproben (Kontrollen und Patienten) auf die gleiche Weise verarbeitet. EDTA-Plasma wurde zentrifugiert, sofort eingefroren und bis zur S1P- und Lipoproteinmessung bei - 80 °C gelagert (Winkler et al. 2019).

Klinische Bewertungen und SOFA-Scores wurden bei der Aufnahme gemäß den Richtlinien berechnet (Winkler et al. 2017). Innerhalb der ersten 24 Stunden nach der Aufnahme wurden Plasma- und Serumproben entnommen, um S1P und sein spezifisches Trägerprotein HDL, SA und LDL zu messen. Das Institut für Klinische Chemie und Labormedizin des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf (Hamburg, Deutschland) maß die Konzentration von HDL, SA und LDL zusammen mit allen anderen Markern: Hämoglobin, Hämatokrit, Thrombozyten, Kreatinin, Leukozyten, Laktat, Interleukin-6 (IL-6), Procalcitonin (PCT) und C-reaktives Protein (CRP).

Unter Anwendung der aktuellen seit 2016 geltenden Sepsis-3-Leitlinien wurden alle 100 Patienten neu kategorisiert (Winkler et al. 2017). Auf der Grundlage eines individuellen SOFA-Scores wurden die folgenden drei Kategorien von Patientengruppen definiert:

- Patienten, die sich nach einem chirurgischen Eingriff auf der Intensivstation befanden, wurden in der Kategorie **"Chirurgie"** erfasst.
- Patienten, die mit Verdacht auf oder mit der Diagnose einer Infektion auf die Intensivstation eingewiesen worden waren, wurden der Kategorie **„Sepsis“** zugeordnet.
- Patienten mit Hypotonie, die eine Vasopressortherapie erfordert, um den mittleren Blutdruck von 65 mmHg aufrechtzuerhalten plus eine Serumlaktatkonzentration von mehr als 2 mmol/L trotz adäquater Flüssigkeitstherapie, wurden unter der Kategorie **„septischer Schock“** subsumiert.

Nach der Diagnose einer Sepsis oder nach einem chirurgischen Eingriff wurden die betroffenen Personen unmittelbar separiert. Bei der Aufnahme auf die Intensivstation wurden Blutproben entnommen. Ausschlusskriterien für die Studie waren Alter < 18 Jahre, Schwangerschaft oder ein moribunder Status der Erkrankung. Patienten mit humanem Albumin (HA), das zur Flüssigkeitsreanimation eingesetzt wurde, wurden ebenfalls ausgeschlossen (Winkler et al. 2019).

Diese Patientenkohorte bildete den Gegenstand einer Follow-up-Analyse, in der 95 der ursprünglichen 100 Patienten eingeschlossen wurden (Winkler et al. 2015, Winkler et al. 2017). 5 Patienten, die sich zu Beginn der Studie zur Verfügung gestellt hatten, mussten für die folgende massenspektrometrische Analyse ausgeschlossen werden. In 4 Fällen (Sepsisgruppe: C15, C16, A-15 septischer Schock Gruppe: C-14) war kein Material (Plasma) mehr in ausreichendem Maß vorhanden. Eine Probe (A-33) konnte aufgrund der Verwendung der neuen Sepsis-3 Definition keiner der drei Gruppen mehr zugeordnet werden (Abb. 9).

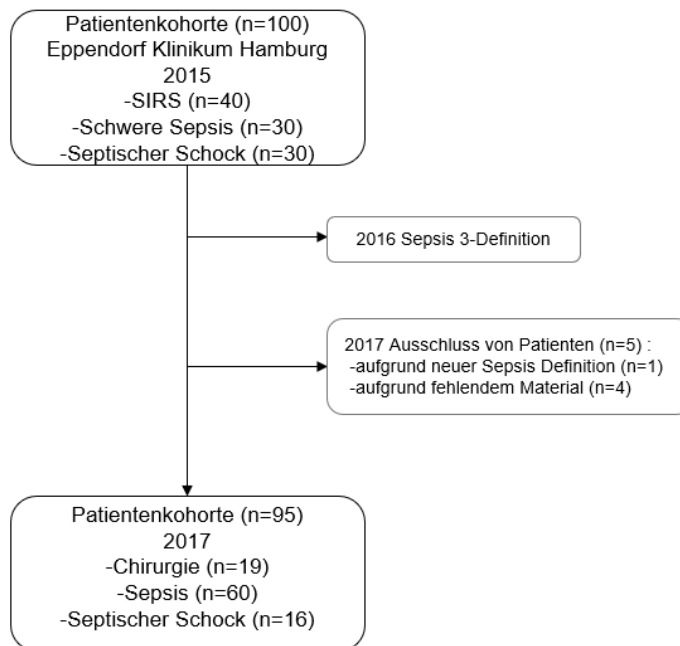


Abb. 9: Die Studienpopulationen 2015 und 2017 im Überblick

Bezogen auf die Grundgesamtheit der Follow-up-Analyse von 95 Personen lagen

- in 73 Fällen LDL-Cholesterolverte,
- in 77 Fällen HDL-Cholesterolverte und
- in 93 Fällen SA-Werte

vor.

3.2 Material

Das bei der Datenanalyse verwendete Material, die Verbrauchsmaterialien, die eingesetzten Chemikalien und die zur Auswertung benutzten Software-Programme werden in den Tab. 4 - 7 zusammenfassend dargestellt.

Tab. 4: Grundlagenmaterial im Überblick

1100 series Chromatograph	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
Binäre Pumpe 1100 series HPLC System	Hewlett Packard/Agilent, Waldbronn, Deutschland
Gefrierschrank (-20 °C) FS 18032	Quelle, Fürth, Deutschland
Gefrierschrank (-80 °C) KM-DU53YE	Panasonic Corporation, Kadoma, Japan
Kühlschrank (4 °C) FKS 5000	Liebherr Group, Bulle, Schweiz
HitachiEliteLaChromcolumnoven	VWR, Darmstadt, Deutschland
LC/MS/MS System 2000 QTra	AB Sciex, Darmstadt, Deutschland
PerfectSpin Mini Zentrifuge	NeoLab, Heidelberg, Deutschland
QTrap triple-quadrupole Massenspektrometer	Sciex, Redwood City, USA
RVC 2-25 CD plus Vakuum-Rotator	Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode am Harz, Deutschland
Spectra System AS3500 Autosampler	ThermoSeparationProducts, Waltham, USA
Volumenpipetten	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Vortex G560 E	VWR, Darmstadt, Deutschland
Vortex VX2500	VWR, Darmstadt, Deutschland
Zentrifuge Heraeus Biofuge 15 R	Heraeus Group, Hanau, Deutschland
Zentrifuge Heraeus Megafuge 16	Heraeus Group, Hanau, Deutschland
Zentrifuge Heraeus Varifuge 3.0R	Heraeus Group, Hanau, Deutschland
Zentrifuge Hermle Z 233 MK-2	Hermle AG, Gosheim, Baden-Württemberg, Deutschland

Tab. 5: Verbrauchsmaterial im Überblick

60 mm MultoHigh-C18 Umkehrphasen-Säule mit 3 µm Partikelgröße	CS-Chromatographie Service, Langerwehe, Deutschland
Cellstar-Gefäß, 15 ml	Greiner Bio One GmbH, Frickenhausen, Österreich

Cellstar-Gefäß, 50 ml	Greiner Bio One GmbH, Frickenhausen, Österreich
Filterspitzen, 10 µL (101392)	Sarstedt, Nürnberg, Deutschland
Filterspitzen, 20 µL (628821)	Sarstedt, Nürnberg, Deutschland
Filterspitzen, 200 µL (658217)	Sarstedt, Nürnberg, Deutschland
Filterspitzen, 1000 µL (101396)	Sarstedt, Nürnberg, Deutschland
Glas Pasteur Pipetten	NeoLab, Heidelberg, Deutschland
Pipettenfüller PI-Pump	VWR, Darmstadt, Deutschland
Pipetten, 5 mL (101391)	Sarstedt, Nürnberg, Deutschland
Pipetten, 10 mL (101390)	Sarstedt, Nürnberg, Deutschland
Pipetten, 25 mL (101389)	Sarstedt, Nürnberg, Deutschland
Pyrex® Glaszentrifugengefäß	VWR International, Darmstadt, Deutschland
Reaktionsgefäß 1.5 mL (101419)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Reaktionsgefäß 2.0 mL (101430)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

Tab. 6: Verwendete Chemikalien im Überblick

Chloroform (CHCl ₃)	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
Salzsäure (HCl)	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol, 96%, 5 L (1201085)	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
Methanol	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
MgCl ₂ - Magnesiumchlorid	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
Na ₃ [P(W ₃ O ₁₀) ₄] - Sodium phosphotungstate tribasic hydrate	Fluka, Seelze, Deutschland

Tab. 7: Verwendete Software-Programme im Überblick

Analyst 1.4	Applied Biosystems, Darmstadt, Germany
GraphPad Prism 9	GraphPad Software, La Jolla, USA
Microsoft Office Excel 2010	Microsoft corporation, Washington, USA
IBM SPSS Statistics Subscription (2020)	IBM, Armonk, New York, USA

3.3 Lipoprotein-Präzipitation

3.3.1 Definition und Methodik

Das grundlegende Prinzip der Proteinpräzipitation ist die sog. Ausfällung. Diese Methode wird benutzt, um z.B. spezifische Proteine nachzuweisen bzw. sie aus einer Lösung zu separieren. Die Interaktionen zwischen den spezifischen Proteinen mit verschiedensten Komponenten, wie z.B. Rezeptoren, Antigenen, Säuren, $MgCl_2$, führen zu dem gewünschten Ergebnis einer Ausfällung. Die im Rahmen dieser Untersuchung genutzte Methode zur Lipoproteinfällung wurde erstmals im Jahr 1970 von Burstein et al. beschrieben. Der Vorteil der Methode besteht darin, dass große Mengen an Lipoproteinen mit nur einer einzigen präparativen Ultrazentrifugation hergestellt werden können. Dabei wird nicht nur VLDL von LDL separiert, sondern auch HDL isoliert (Burstein et al. 1970). Im Ergebnisteil werden die einzelnen Fraktionen als HDL, SA, LDL, und VLDL (VLDL/Chylomikron) beschrieben.

3.3.2 Durchführung

Die Durchführung der Lipoprotein-Präzipitation erfolgte nach einem etablierten Protokoll. Die Lipoproteine werden nacheinander über eine steigende $Na_3P(W_3O_{10})_4$ -Konzentration präzipitiert (Abb. 10).

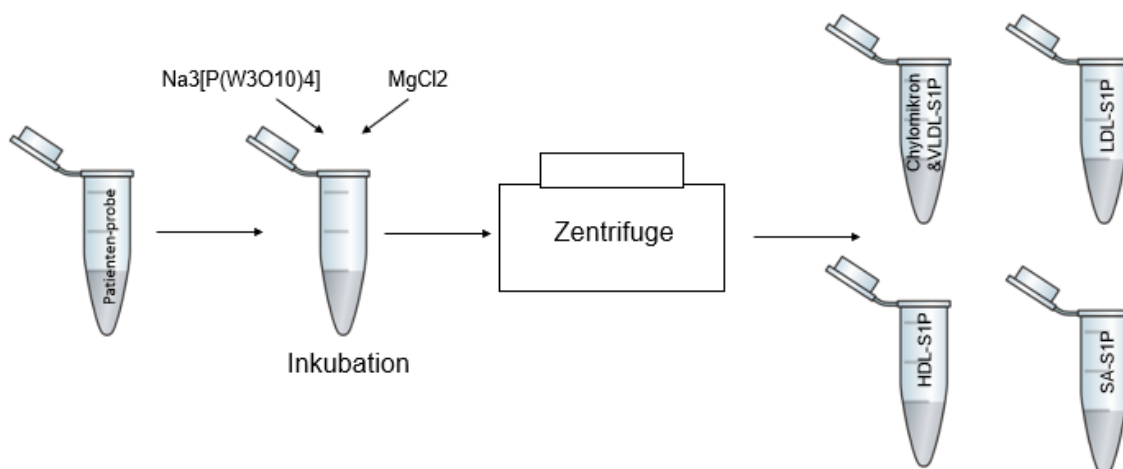


Abb. 10: Lipoprotein-Fällung im Überblick

Die spezifischen Lösungen zur Ausfällung der einzelnen Lipoproteine bestehen aus:

- $\text{Na}_3[\text{P}(\text{W}_3\text{O}_{10})_4]$ - Natrium phosphotungstate tribasic hydrate

1% = 100 mg in 10ml ddH₂O

4% = 400 mg in 10ml ddH₂O

40% = 4 g in 10ml ddH₂O

und

- MgCl_2 - Magnesiumchlorid

2M = 4,066 g in 10ml ddH₂O

Für die Chylomikron- und Very Low-Density-Lipoprotein (VLDL)-Präzipitation wurden 25 μL von einer 1%igen $\text{Na}_3\text{P}(\text{W}_3\text{O}_{10})_4$ -Lösung und 25 μL einer 2 M MgCl_2 -Lösung zu 500 μL Plasma hinzugefügt. Nach kurzem Mischen und 15-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur (RT) wurden die Proben 10 Minuten lang bei RT bei 6000 rcf zentrifugiert. Die Überstände wurden zur weiteren Präzipitation in neue Röhrchen überführt.

Für die Präzipitation von Low-Density-Lipoprotein (LDL)-Präzipitation wurden 25 μL einer 4%igen $\text{Na}_3\text{P}(\text{W}_3\text{O}_{10})_4$ -Lösung zum ersten Überstand hinzugefügt. Nach 15-minütiger Inkubation bei RT wurden die Proben 10 Minuten lang bei RT bei 6000 rcf zentrifugiert und die Überstände erneut zur weiteren Präzipitation in neue Röhrchen überführt.

Für die HDL-Präzipitation wurden dem zweiten Überstand 25 μL einer 40%igen $\text{Na}_3\text{P}(\text{W}_3\text{O}_{10})_4$ -Lösung und 25 μL einer 2 M MgCl_2 -Lösung hinzugefügt. Nach einer 2-stündigen Inkubation bei RT wurden die Proben bei RT für 30 min bei 20.000 rcf zentrifugiert. Der Überstand war die lipoproteinfreie SA-haltige Fraktion. Die nicht unmittelbar weiterverwendeten Fraktionen wurden bei - 20 °C gelagert.

3.4 Lipid-Extraktion und Quantifizierung von S1P

3.4.1 Definition und Methodik

Das Grundprinzip der Massenspektrometrie ist die Ionisation, Trennung und Detektion von Ionen in der Gasphase. Mit Hilfe dieser Methode lassen sich aus anorganischen oder organischen Substanzen in geeigneter Weise Ionen erzeugen. Diese Ionen werden nach ihrem Masse-zu-Ladungs-Verhältnis (m/Z) getrennt und mit einem Registriersystem nach ihrem spezifischen Masse-zu-Ladungs-Verhältnis qualitativ und quantitativ erfasst. Die Ionisation der Substanz kann thermisch, durch elektrische Felder oder durch Beschuss der Probe mit energiereichen Elektronen, Ionen (Atome, Cluster, Moleküle) oder Photonen erfolgen. Die Massenspektrometrie lässt sich mit verschiedenen vorgeschalteten Trennverfahren wie der Gas- oder der Flüssigkeits-Chromatographie koppeln.

- **Flüssigkeits-Chromatographie**

Mit Hilfe der Flüssigkeits-Chromatographie können Komponenten eines Stoffgemisches getrennt, identifiziert und gereinigt werden und somit für die qualitative und quantitative Analyse vorbereitet werden. Die Chromatographie basiert auf dem Prinzip, dass Moleküle in einer Mischung auf die Oberfläche einer stationären Phase (stabile Phase) aufgetragen werden und sich mit Hilfe einer mobilen Phase voneinander trennen.

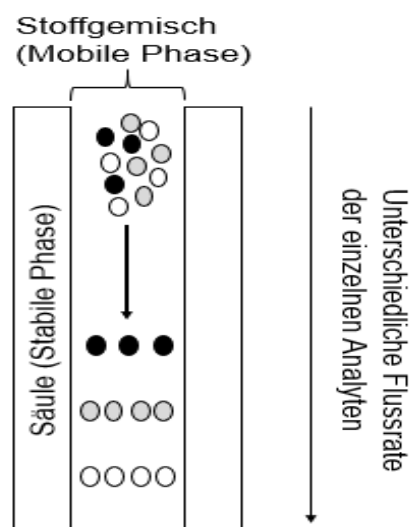


Abb. 11: Übersicht der Flüssigkeits-Chromatographie (Tratkowski 2008)

Im Falle der HPLC (Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie) ist die stationäre Phase eine Säule und die mobile Phase ein flüssiges Molekülgemisch (Abb. 11). Diese Technik ist vor allem für die Trennung und Identifizierung von Aminosäuren, Kohlenhydraten, Lipiden, Nukleinsäuren, Proteinen, Steroiden und anderen biologisch aktiven Molekülen geeignet. Bei der HPLC passiert die mobile Phase die Säulen unter 10-400 bar Druck und mit einer hohen (0,1-5 cm/sec) Flussrate. Durch unterschiedliche Wechselwirkungen (Hydrophobe, Dipol-Dipol und Ionische) zwischen der stabilen und mobilen Phase bekommen die zu trennenden Analyten unterschiedliche Flussraten, die eine Trennung der einzelnen Komponenten ermöglichen (Coskun 2016).

- **Triple quadrupole mass spectrometry (LC/MS/MS) + Tandem MS**

Der grundlegende Aufbau eines Massenspektrometers setzt sich aus einer Ionenquelle, einem Massenanalysator und einem Detektor zusammen (Abb.12). Diese einzelnen Komponenten werden unter Hochvakuumbedingungen betrieben.

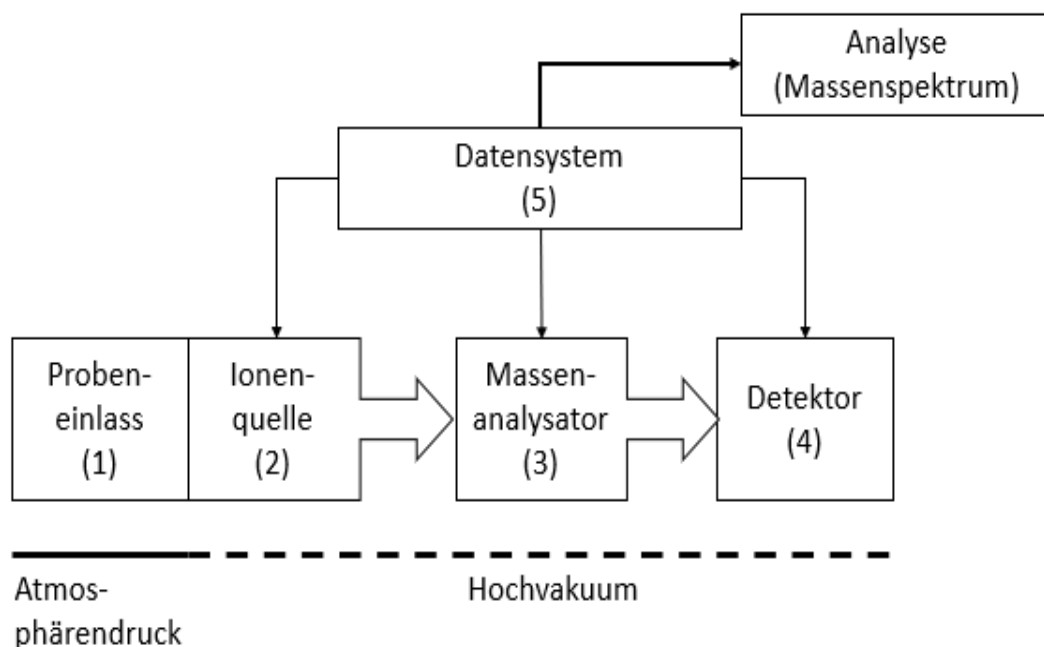


Abb. 12: Generelle schematische Darstellung eines Massenspektrometers (Gross 2011)

Im Folgenden wird speziell der Aufbau und die Funktionsweise eines LC/MS Triple Quadrupol high Tandem Massenspektrometers mit ESI beschrieben. Die Ionisierungsmethode richtet sich nach der Molekülmasse sowie der Polarität einer Probe. Es gibt eine Vielzahl von Ionisierungsmethoden, die sich im Hinblick auf Atmosphärendruck oder Vakuum unterscheiden (Gross 2011). Grundsätzliche Möglichkeiten zur Ionisierung sind z.B. Elektronenstoßionisation (EI), Fast Atom Bombardment (FAB), chemische Ionisation (CI), Feldionisation (FI), Felddesorption (FD), Matrix-unterstützte LaserDesorption/Ionisation (MALDI), Atmospheric Pressure Chemical Ionisation (APCI), Photoionisation sowie Elektronensprayionisation (ESI).

Zur Ionisierung der Proben wurde im Rahmen dieser Arbeit eine ESI durchgeführt. Diese gehört zur Gruppe der Ionisationsmethoden unter Atmosphärendruck. „ESI ist ein sanftes Ionisationsverfahren, mit dem Ionen aus der flüssigen in die Gasphase überführt werden.“ (Gross 2011). Hierbei wird die zu analysierende Flüssigkeit durch eine Metallkapillare gepumpt (1) und in ein starkes elektrisches Feld gesprüht, das zwischen der Kapillare und einer zylindrischen Gegenelektrode angelegt worden ist.

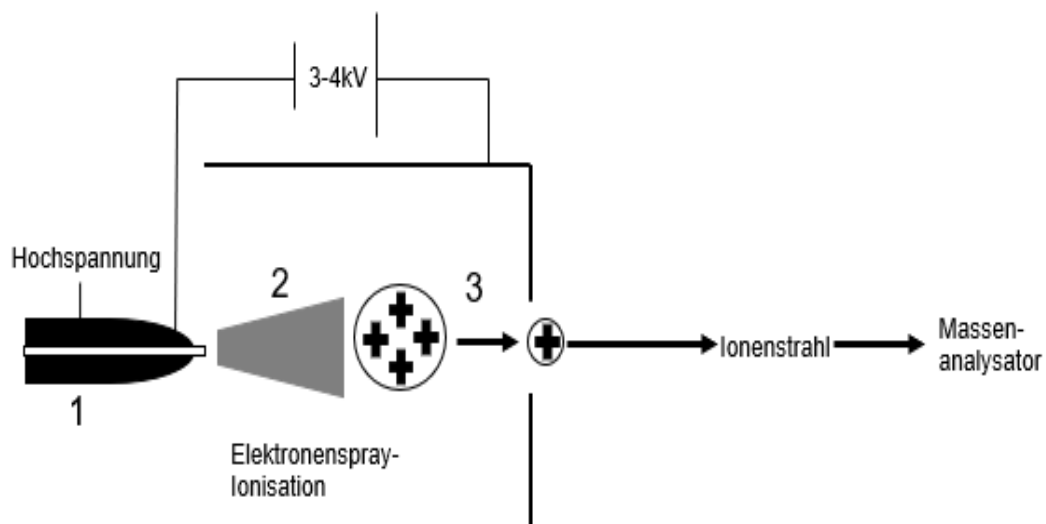


Abb. 13: Vereinfachte Darstellung der Erzeugung eines Ionenstrahls mittels ESI (Gross 2011)

Durch Einleitung von Stickstoff kommt es zur raschen und feinen Zerstäubung (2) der austretenden Lösung sowie zur effektiven Ionisierung der Analyt-Moleküle (3) (Abb. 13)

Die verschiedenen Masseanalytoren mit unterschiedlichen Funktionsprinzipien haben alle das Ziel, die Ionen nach ihrem Masse-zu-Ladungs-Verhältnis zu trennen. Man unterscheidet zwischen TOF (Time-of-Flight), Magnetischem Sektorfeld, Linearem Quadrupol, Linearer Quadrupol-Ionenfalle (LIT), Quadrupol-Ionenfalle (QIT), Fourier-Transform-Ionencyclotronresonanz (FT-ICR) und Orbitrap.

Als Tandem-Massenspektrometrie bezeichnet man Verfahren, bei denen zwei Stufen der Massenanalyse verwendet werden, um die zuvor bereits massenselektierten Ionen einer zweiten massenspektrometrischen Analyse zu unterziehen (deHoffmann 1996). Ein Quadrupol-Massenanalysator besteht aus vier hyperbolisch geformten Stabelektroden, die quadratisch angeordnet sind (Abb. 14). Die gegenüberliegenden Elektrodenpaare werden auf demselben Potential gehalten, das sich aus einer Gleichstrom- und einer Wechselstromkomponente zusammensetzt. Auf ein Ion, das sich durch die Quadrupol Analysatoren (M_s1 , M_s2) bewegt, wirkt eine anziehende Kraft, die von einem der Stäbe ausgeht, dessen Ladung der des Ions entgegengesetzt ist. Aufgrund einer periodisch angelegten Spannung wechseln sich Anziehung und Abstoßung des Ions ab. Nur Ionen mit einer stabilen Flugbahn können den Quadrupol passieren und letztendlich auch detektiert werden. Die anderen Ionen kollidieren mit den Stäben oder werden herausgeschleudert. Somit kommt es zu einer Masseselektion (Gross 2011).

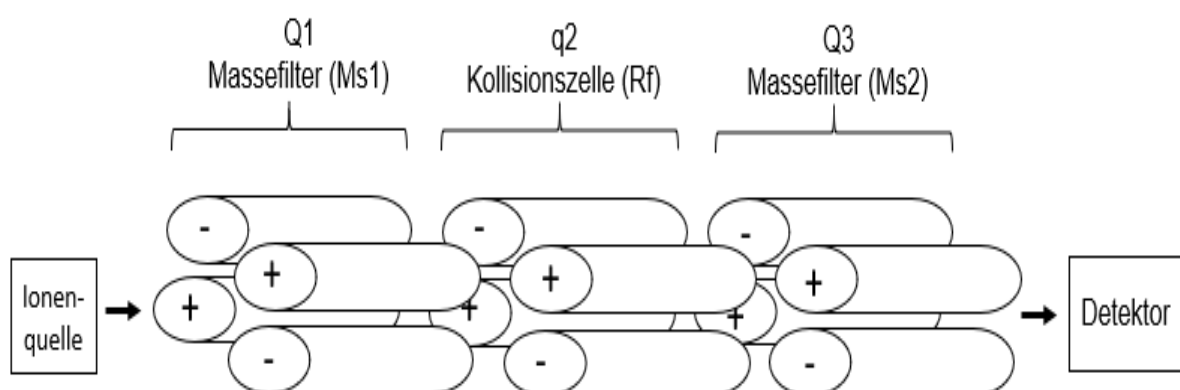


Abb. 14: Schematischer Aufbau eines Triple Quadrupol Tandem Massenspektrometers (Gross 2011)

Zwischen den Quadrupol-Analysatoren (M_s1 , M_s2) befindet sich ein sogenannter RF-Quadrupol ($q2$). Seine Funktion besteht darin, Restgas entweichen zu lassen sowie die kinetische Energie der Ionen zu dämpfen. Dies führt zu einer verbesserten Transmission und Detektion der Ionen durch den Masse-Analysator. Als Detektor wurden früher sogenannte Faraday Cups (becherförmige Elektrode) benutzt, in den die Ionen ihre Ladung abgeben konnten. Neuerdings werden sogenannte Sekundärelektronenvervielfacher (SEM) benutzt, bei denen das Auftreffen energiereicher Ionen Sekundärelektronen von der Oberfläche auslöst. Zusätzlich können noch Elektronenvervielfacher mit eingesetzt werden, um das detektierte Signal zu verstärken (Gross 2011).

3.4.2 Durchführung

Die S1P-Messungen (Abb. 15) wurden nach einem etablierten Protokoll unter Verwendung von Flüssigkeits-Chromatographie gekoppelt mit Triple-Quadrupol-Massenspektrometrie (LC/MS/MS) durchgeführt (Bode und Graler 2012, Bode et al. 2010).

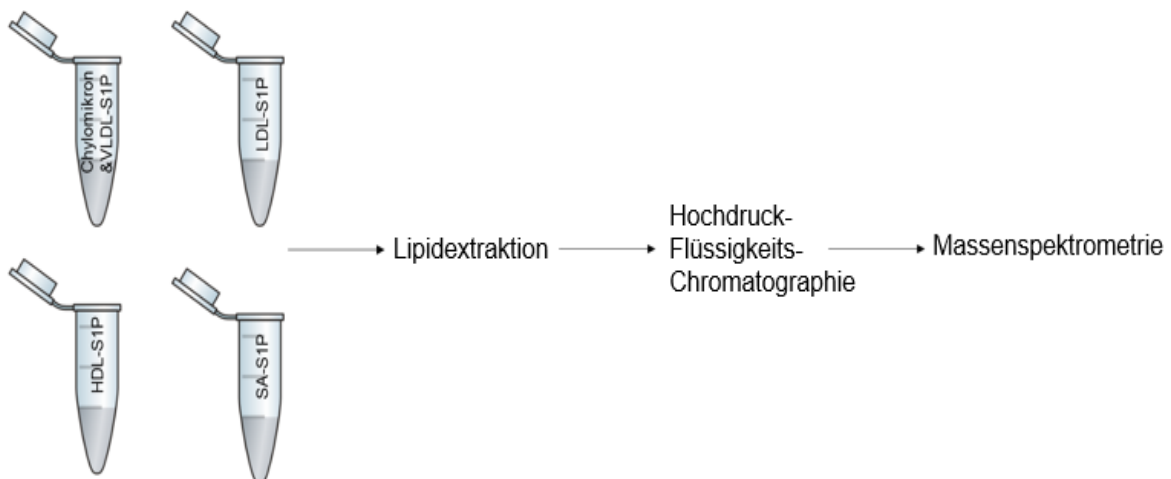


Abb. 15: Durchführung der Massenspektrometrie im Überblick

Nach Zugabe von C17-Base S1P als interner Standard (100 pmol/Probe, Avanti Polar Lipids) wurden die Proben in Glaszentrifugenröhrchen überführt und mit H₂O auf ein Endvolumen von 1 mL eingestellt. Nach Zugabe von 0,3 mL 6 N HCl, 1 mL Methanol und 2 mL Chloroform wurden die Proben 10 min lang kräftig vermischt. Somit wurde die wässrige und die Chloroform-Phase durch die Zentrifugation für 3 min bei 1900 rcf getrennt. Die untere Chloroform-Phase wurde mit Hilfe einer Glas-Pasteur Pipette in ein neues Glaszentrifugenröhrchen überführt (Abb. 16).

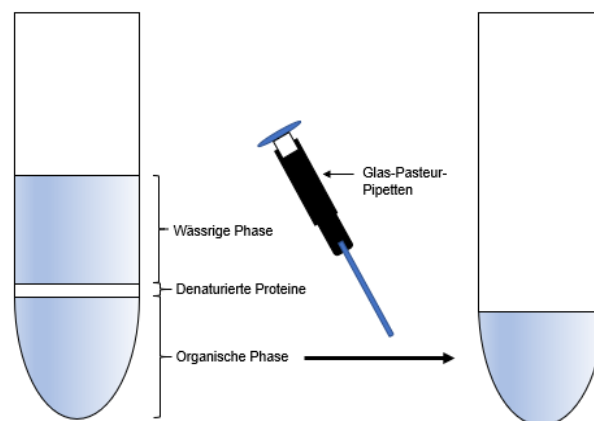


Abb. 16: Transfer von organischer Phase in ein neues Glasröhrchen mittels einer Glas-Pasteur Pipette

Nach einer zweiten Runde der Lipidextraktion mit zusätzlichen 2 mL Chloroform pro Milliliter wässriger Probe wurden die beiden Chloroform-Phasen kombiniert und bei 60 °C für 50 min in einem Vakuumkonzentrator vakuumgetrocknet.

Die extrahierten Lipide wurden in 100 µL Methanol/Chloroform (4:1, v/v) gelöst und bei -20 °C gelagert. Die Detektion wurde mit dem Triple-Quadrupol-Massenspektrometer QTrap (Sciex) in Verbindung mit dem Chromatographen der Serie 1100 (Agilent), dem Hitachi Elite LaChrom Säulenofen (VWR) und dem Spectra System AS3500 Autosampler (Thermo Separation Products) durchgeführt.

Tab. 8: Massenübergänge und die typische Retentionszeit für S1P

Sphingolipid	Mass transition (m/z)
1,3-dihydroxy-2-amino-4E-heptadecene-1-phosphate (C17-S1P)	366/250
(2S,3R,4E)-2-aminooctadec-4-ene-1,3-diol-1-phosphate (S1P)	380/264

Die LC/MS/MS-Analyse mit positiver Elektrospray-Ionisation (ESI) wurde zum Nachweis von S1P und C17-S1P verwendet. Die Übergänge der mehrfachen Reaktionsüberwachung (MRM) waren wie folgt: S1P m/z 380/264 und C17-S1P m/z 366/250 (Tab. 8).

Die flüssigkeits-chromatographische Auflösung aller Analyten wurde mit einer 2 × 60 mm MultoHigh C18 Umkehrphasen-Säule mit einer Partikelgröße von 3 µm (CS-Chromatographie Service) erreicht. Die Säule wurde 5 Minuten lang mit 10 % Methanol und 90 % von 1 % Ameisensäure in H₂O äquilibriert, gefolgt von einer Probeninjektion und einer 15-minütigen Elution mit 100 % Methanol bei einer Flussrate von 300 µL/min.

Standardkurven wurden durch Zugabe zunehmender Konzentrationen von S1P zu 100 pmol des internen Standards C17-S1P erstellt. Die Linearität der Standardkurven und Korrelationskoeffizienten wurden durch lineare Regressionsanalysen ermittelt. Die Datenanalysen wurden mit Analyst 1.6.2 (Sciex) durchgeführt.

3.5 Verwendete statistische Analyseverfahren

Die primären Untersuchungsvariablen waren Plasma S1P, HDL-S1P, SA-S1P, VLDL-S1P und LDL-S1P gemessen in Mikrogramm pro Liter. Die Unterschiede zwischen zwei Gruppen wurden mit einem nicht-parametrischen Mann-Whitney-U-Test oder der Kruskal-Wallis-Varianzanalyse (ANOVA) für mehr als zwei Gruppen auf Signifikanz getestet. Im Falle einer signifikant ausfallenden ANOVA-Analyse wurde im Anschluss ein Post hoc-Test (Dunn-Test) durchgeführt. Die Daten wurden in Tabellen als Median und in Abbildungen als Mittelwert mit Interquartilsabstand (IQR) dargestellt.

Die Kohorte wurde in SOFA-Tertile unterteilt: untere < 3 , Median 4-7 und obere ≥ 8 SOFA-Tertile, um den Unterschied bei Patienten mit steigendem Schweregrad zu demonstrieren. Die Korrelationen wurden mit Hilfe der Spearman'schen Rangkorrelation berechnet. Das Odds-Ratio wurde mit einem 95%igen Konfidenzintervall unter der Verwendung einer multivariaten logistischen Regressionsanalyse mit septischem Schock oder einem SOFA-Score ≥ 8 als abhängige Variable durchgeführt. Für alle Tests wurde ein p-Wert von weniger als 0,05 als signifikant erachtet. Die statistischen Analysen wurden unter Verwendung von Graph Pad Prism (La Jolla, CA, USA) und SPSS (IBM, Armonk, New York, USA) durchgeführt (Winkler et al. 2019).

4. Ergebnisse

Die Ergebnisse dieser Studie resultieren aus der Analyse der Plasma S1P-Konzentration humaner Proben. Dabei wurde auf der Grundlage verschiedener Einteilungskriterien (SOFA, Patientengruppen, Geschlecht, Alter) die S1P-Konzentration im Plasma im Hinblick auf Veränderungen - bezogen auf die spezifischen Transportproteine (VLDL, LDL, HDL, SA) - im Verlauf einer Sepsis untersucht. Einen Teil der Ergebnisse, die im Rahmen dieser empirischen Studie gewonnenen wurden, hat der Verfasser (als Co-Autor) unter dem Titel „Loss of sphingosine 1-phosphate (S1P) in septic shock is predominantly caused by decreased levels of high-density lipoproteins (HDL)“ im Intensive Care Journal publiziert (Winkler et al. 2019) .

Im Vorfeld der statistischen Analyse wurde zunächst mittels GraphPad QuickCalcs nach Outlinern bezogen auf das Plasma S1P-Gesamt, VLDL-S1P, LDL-S1P, HDL-S1P und SA-S1P mit einem p von 0,05 gesucht. Dabei wurden ein Outliner in der Kontrollgruppe (K-1), drei in der chirurgischen Gruppe (A-09, A-13, A-19), einer in der Sepsisgruppe (B-20) und drei in der septischen Schockgruppe (B-18, B-19, B-21) identifiziert.

4.1 Demographische Daten

Die demographischen Daten der Studienkohorte (n=88 Patienten, n=6 Kontrollen) sind in Tab. 9 dargestellt. Die Patienten wurden anhand der oben beschriebenen Parameter in die Gruppen **Chirurgie** (n=16), **Sepsis** (n=59) und **septischer Schock** (n=13) unterschieden. Die Patientenkohorte bestand aus 50 Männern (56,8%) und 38 Frauen (43,2%). Die Kontrollgruppe setzte sich aus 33% Männern und 67% Frauen zusammen. Der Altersmedian der Kontrollen lag bei 37 Jahren, der der Patientengruppen bei 60-63 Jahren.

Tab. 9: Demographische Daten der Studienkohorte

Klinische Parameter	Kontrolle	Chirurgie	Sepsis	Septischer Schock	p-Wert
Anzahl (n)	6	16	59	13	n/a
Alter, Jahre	37 (26-50)	63 (59-70)	60 (51-71)	61 (54-70)	Ns
Geschlecht (Mann), n (%)	2 (33)	8 (50)	33 (55)	9 (69)	Ns
SOFA Score	N/A	4 (2-6)	5 (3-7)	10 (8-13)	<0,0001
Leukozyten x109/L	6,3 (5,9-7,3)	13,3 (12,2-14,7)	13,8 (10,3-19,0)	14,6 (9,9-22,1)	Ns
Interleukin-6 ng/L	n/d	101,2 (68,0-231,4)	111,0 (47,7-270,8)	406,9 (117,6-817,2)	<0,05
Procalcitonin, µg/L	n/d	1,24 (0,32-2,66)	0,55 (0,24-1,67)	5,76 (1,89-10,16)	<0,01
C-reaktives Protein	5,0 (5,0-5,0)	97,5 (72,8-126,3)	145 (76,0-235,0)	125 (100,0-206,0)	Ns
Laktat, mmol/L	n/d	1,25 (1,05-1,90)	1,3 (1,0-1,6)	3,1 (2,6-6,5)	<0,0001
ITS Aufenthalt, Tage	n/a	2 (1-4)	7 (3-10)	13 (7-15)	0,0001
Inv. Beatmung, n (%)	n/a	1 (6,3)	17 (28,8)	4 (30,8)	ns*
Dialyse, n (%)	n/a	0 (0)	3 (5,1)	5 (38,5)	<0,01*
Mortalität, n (%)	n/a	2 (12,5)	10 (16,9)	4 (30,8)	ns*

Sequential Organ Failure Assessment Score (SOFA), Intensivstation (ITS), nicht anwendbar (n/a), nicht determiniert (n/d), nicht significant (ns). Die Daten werden als Median (IQR) dargestellt. *p-Wert für Trend zwischen Patientengruppen unter Verwendung eines nicht-parametrischen ANOVA Kruskal-Wallis-Tests, falls nicht anders angegeben, * Chi 2 Test (Winkler et al. 2019).

Septische Schock Patienten hatten mit Abstand die höchsten SOFA-Werte (SOFA: 10). Fast ein Drittel (30,8%) der septischen Schock Patienten musste invasiv beatmet und ca. 40% dieser Patienten dialysiert werden. Die Mortalitätsrate war in dieser Patientengruppe ebenfalls am höchsten (30,8%). Die mediane Aufenthaltsdauer der septischen Schock Patienten auf der Intensivstation (13 Tage) war fast doppelt so lang wie die von septischen Patienten (7 Tage). Die Entzündungsparameter zeigten - mit Ausnahme von C-Reaktivem Protein (CRP) - in der septischen Schock Gruppe ihre höchsten Werte.

4.2 Konzentrationsmessung und Verteilung von Transportprotein-S1P

Die folgenden Datenauswertungen geben Aufschluss darüber, ob es signifikante Unterschiede in der Konzentration von S1P an seinen spezifischen Transportproteinen bezogen auf die verschiedenen Patientengruppen sowie auf den SOFA-Score (SOFA-Score Tertile: ≤ 3 , 4-7, ≥ 8) gibt. Darüber hinaus ist von Interesse, ob es im Verlauf einer Sepsis zu einer Umverteilung von S1P zwischen seinen einzelnen Transportproteinen - wiederum bezogen auf die genannten Patientengruppen und den SOFA-Score - kommt.

Tab. 10 zeigt die Gesamt-Plasma S1P-Konzentration sowie die einzelnen S1P-Konzentrationen an den einzelnen Transportproteinen (VLDL, LDL, HDL, SA) bezogen auf die Patientengruppen (Kontrolle, Chirurgie, Sepsis, Septischer Schock) und den SOFA-Score (SOFA-Score ≤ 3 , 4-7, ≥ 8). Es wird jeweils der Median sowie das 25. Quartil und das 75. Quartil angegeben.

Die Gesamt-S1P Konzentration bei der gesunden Kontrollgruppe liegt bei 205,5 μ g/L und unterscheidet sich nur geringfügig von der S1P-Konzentration chirurgischer Patienten (199,4 μ g/L) bzw. von Patienten mit einem SOFA ≤ 3 (236,9 μ g/L).

Tab. 10: Plasma S1P Konzentration an seinen unterschiedlichen Transportproteinen bezogen auf die Patientengruppen (Chirurgie, Sepsis, Septischer Schock) und SOFA-Score (≤ 3 , 4-7, ≥ 8)

Variable	Kontrolle	Chirurgie	Sepsis	Septischer Schock	p-Wert
Transportproteine von Sphingosin 1-Phosphat					
Gesamt Plasma S1P, µg/L	205,5 (190,8-213,3)	199,4 (137,6-246,4)	178,6 (123,6-248,6)	96,4 (76,4-103,5)	<0.0001
HDL-S1P, µg/L	93,7 (85,0-101,3)	103,2 (77,8-127,5)	99,4 (71,8-135,5)	51,3 (41,7-69,1)	0,0003
<i>Gesamtanteil in %</i>	45,9 (44,9-47,1)	59,1 (50,5-63,6)	54,9 (48,7-64,8)	54,5 (46,4-63,6)	
SA-S1P, µg/L	71,3 (63,6-74,9)	20,5 (6,8-30,8)	15,5 (8,5-33,4)	5,1 (3,5-6,8)	0,0032
<i>Gesamtanteil in %</i>	35,2 (33,0-35,5)	11,3 (4,7-0,13,0)	8,8 (5,2-15,6)	5,2 (4,4-7,0)	
LDL-S1P, µg/L	31,0 (28,7-33,4)	27,7 (13,9-55,6)	40,2 (23,0-57,4)	16,5 (11,8-26,3)	0,0013
<i>Gesamtanteil in %</i>	15,9 (15,1-16,9)	16,0 (8,9-24,9)	22,9 (16,5-27,8)	17,2 (12,7-24,7)	
VLDL-S1P, µg/L,	5,0 (4,5-5,7)	20,1 (10,0-33,4)	9,4 (5,1-20,5)	16,1 (4,7-22,1)	ns
<i>Gesamtanteil in %</i>	2,6 (2,4-3,7)	15,0 (6,7-19,7)	5,4 (3,3-13,6)	16,8 (4,5-24,3)	
		SOFA ≤ 3	SOFA 4-7	SOFA ≥ 8	
Gesamt Plasma S1P, µg/L		236,9 (178,2-258,2)	162,8 (124,4-241,7)	96,4 (81,0-111,4)	<0.0001
HDL-S1P, µg/L		134,3 (108,5-159,4)	96,4 (78,0-129,6)	51,3 (40,2-63,9)	<0.0001
<i>Gesamtanteil in %</i>		59,6 (53,0-64,6)	55,2 (47,6,-66,7)	52,9 (45,2-59,9)	
SA-S1P, µg/L		30,0 (15,5-38,8)	13,2 (6,7-31,9)	5,4 (3,6-11,3)	<0.0001
<i>Gesamtanteil in %</i>		11,7 (8,8-16,0)	7,7 (4,4-15,4)	6,2 (4,9-10,8)	
LDL-S1P, µg/L		49,3 (28,8-68,1)	32,6 (17,3-54,5)	20,6 (11,5-28,7)	0,0002
<i>Gesamtanteil in %</i>		23,0 (15,4-26,3)	20,4 (12,9-26,8)	20,4 (12,7-30,6)	
VLDL-S1P, µg/L,		9,6 (8,5-20,4)	16,7 (5,2-23,1)	16,0 (4,9-20,9)	ns
<i>Gesamtanteil in %</i>		5,1 (3,2-8,3)	10,7 (3,3-17,2)	15,5 (5,0-22,6)	

High density Lipoprotein (HDL), Serum Albumin (SA), Low Density Lipoprotein (LDL), Very Low Density Lipoprotein (VLDL), Sphingosin-1-Phosphat (S1P), ns nicht signifikant. Die Daten werden als Median (IQR) dargestellt, mit 25 Quantil und 75 Quantil. *p-Wert für den Trend zwischen allen Patientengruppen unter Verwendung eines nichtparametrischen ANOVA Kruskal-Wallis-Tests

Bei Patienten mit einer Sepsis (178,6 $\mu\text{g/L}$) bzw. Patienten mit einem SOFA 4-7 (162,8 $\mu\text{g/L}$) ist hingegen ein Trend bezüglich einer Reduktion der Gesamt-Plasma S1P-Konzentration zu erkennen. Bei Patienten mit einem septischen Schock (96,4 $\mu\text{g/L}$) oder bei Patienten mit einem SOFA-Score ≥ 8 (96,4 $\mu\text{g/L}$) fällt die Gesamt-Plasma S1P-Konzentration signifikant um über 50% des Ausgangswertes (Tab. 10 und Abb. 17).

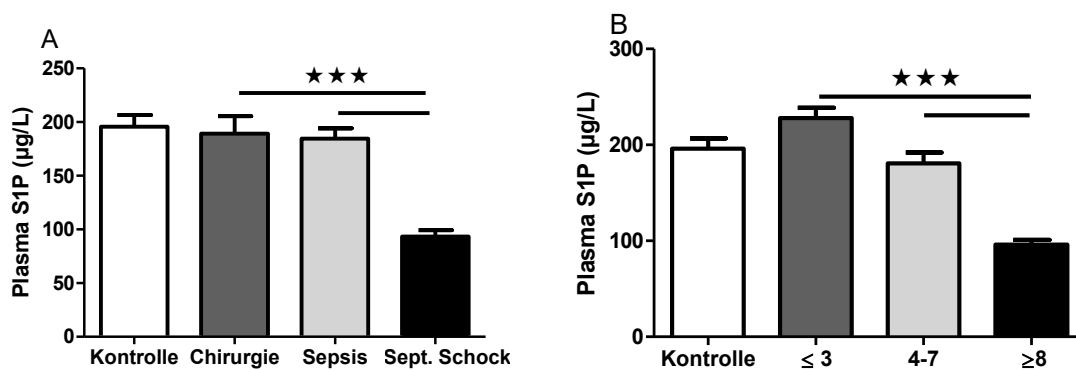


Abb. 17: **Die Plasma S1P-Konzentration fällt signifikant in Patienten mit einem septischen Schock oder einem SOFA-Score ≥ 8 .** Massenspektrometrische Analyse des Plasmas S1P Levels zwischen den einzelnen Patientengruppen (Kontrolle, Chirurgie, Sepsis, Septischer Schock) bzw. den SOFA Score (≤ 3 , 4-7, ≥ 8) bezogen auf das Gesamt-Plasma Sphingosin-1-Phosphat (S1P), S1P gebunden an Serum Albumin (SA-S1P), S1P gebunden an High Density Lipoprotein (HDL-S1P), S1P gebunden an Low Density Lipoprotein (LDL-S1P) und S1P gebunden an Very Low Density Lipoprotein (VLDL-S1P); S1P in $\mu\text{g/L}$; Die Daten werden als Mittelwert mit 95% Konfidenzintervall dargestellt. Die Patientengruppen werden mit einem nicht parametrischen ANOVA Kruskal-Wallis-Test mit Post Hoc Dunn Test verglichen. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$

In Tab. 10 und den Abb. 18, 19 zeigt sich ein signifikanter Abfall des SA-S1Ps um rund 60-70% (71,3 $\mu\text{g/L}$ \rightarrow 20,5 $\mu\text{g/L}$) bei chirurgischen Patienten sowie bei Patienten mit einem SOFA ≤ 3 (71,3 $\mu\text{g/L}$ \rightarrow 30 $\mu\text{g/L}$), wobei jedoch die Gesamt-Plasma S1P-Konzentration weitgehend unverändert bleibt. Gleichzeitig ist bei diesen beiden Patientengruppen eine Zunahme der S1P-Konzentration der VLDL- (5,0 $\mu\text{g/L}$ \rightarrow 20,1 $\mu\text{g/L}$ bzw. 9,6 $\mu\text{g/L}$) und der HDL-Fraktion (93,7 $\mu\text{g/L}$ \rightarrow 103,2 $\mu\text{g/L}$ bzw. 134,3 $\mu\text{g/L}$) festzustellen.

Die Zunahme der VLDL-S1P Konzentration zeigt sich im Vergleich zu den Kontrollen ebenfalls bei Patienten mit einem SOFA-Score zwischen 4-7 ($5,0\mu\text{g/L} \rightarrow 16,7 \mu\text{g/L}$) und bei Sepsis-Patienten ($5,0\mu\text{g/L} \rightarrow 9,4\mu\text{g/L}$). HDL-S1P weist bei den beiden Gruppen (Sepsis, SOFA Score 4-7) - bezogen auf die Kontrollen - keinen signifikanten Unterschied auf (Tab. 10 und Abb. 18, 19).

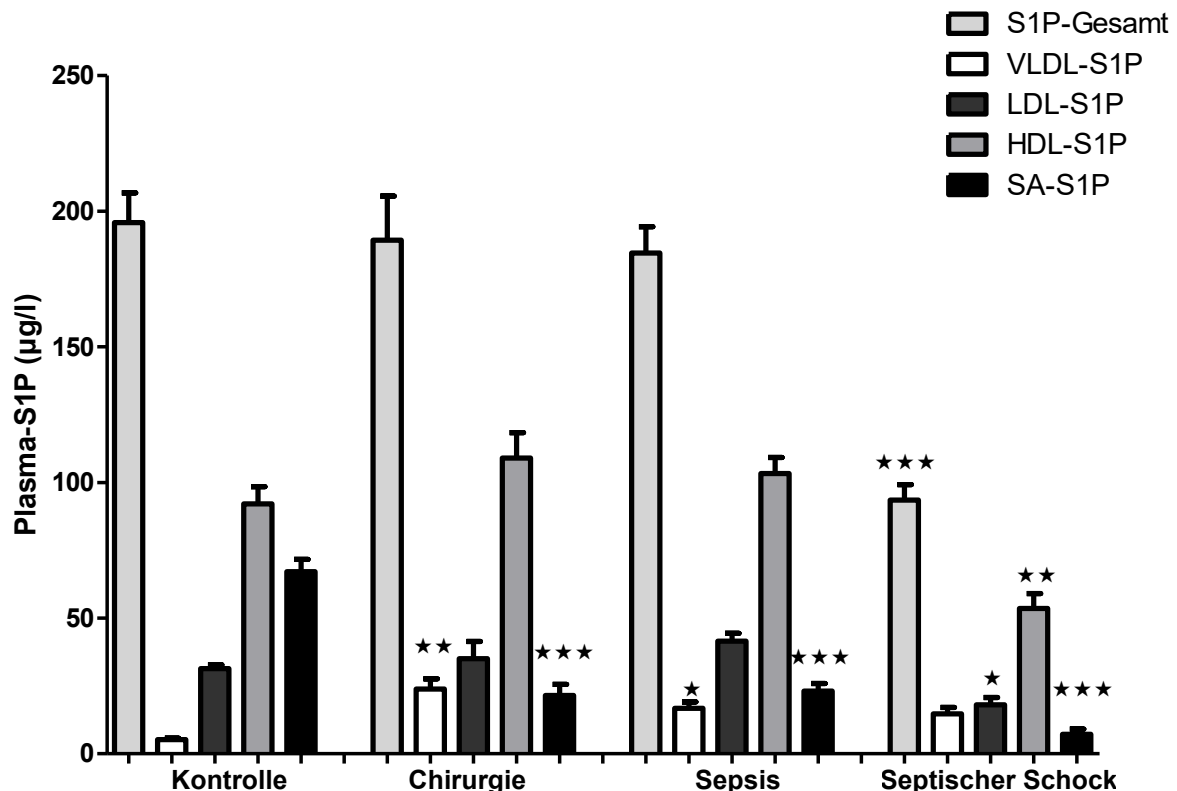


Abb.18: Die Plasma S1P-Konzentration fällt signifikant in Patienten mit einem septischen Schock. Es kommt zu einem frühzeitigen Verlust des SA-S1P. Im Verlauf hin zum septischen Schock fällt die HDL- und LDL-S1P Konzentration. Massenspektrometrische Analyse des Plasmas S1P Levels zwischen den einzelnen Patientengruppen (Kontrolle, Chirurgie, Sepsis, Septischer Schock) bezogen auf das Gesamt-Plasma Sphingosin-1-phosphat (S1P), S1P gebunden an Serum Albumin (SA-S1P), S1P gebunden an High Density Lipoprotein (HDL-S1P), S1P gebunden an Low Density Lipoprotein (LDL-S1P) und S1P gebunden an Very Low Density Lipoprotein (VLDL-S1P); S1P in $\mu\text{g/L}$; Die Daten werden als Mittelwert mit 95% Konfidenzintervall dargestellt. Die Gruppen werden mit einem nicht-parametrischen Mann-Whitney U-Test gegen die Kontrolle verglichen: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$

Die signifikante Zunahme der VLDL-S1P Konzentration wurde im Vergleich zu den Kontrollen in der septischen Schock Gruppe bzw. SOFA Score ≥ 8 Gruppe nicht mehr detektiert. In diesen beiden Gruppen wurde erstmals eine signifikante Reduktion der HDL-S1P um ca. 50% gemessen ($93,7\mu\text{g/L} \rightarrow 51,3\mu\text{g/L}$).

Ebenfalls kam es zu einer Reduktion der LDL-S1P Konzentration im Plasma von septischen Schock Patienten (31,0µg/L → 16,5µg/L) bzw. von Patienten mit einem SOFA-Score ≥ 8 (31,0µg/L → 20,6µg/L) (Tab. 10 und Abb. 18, 19).

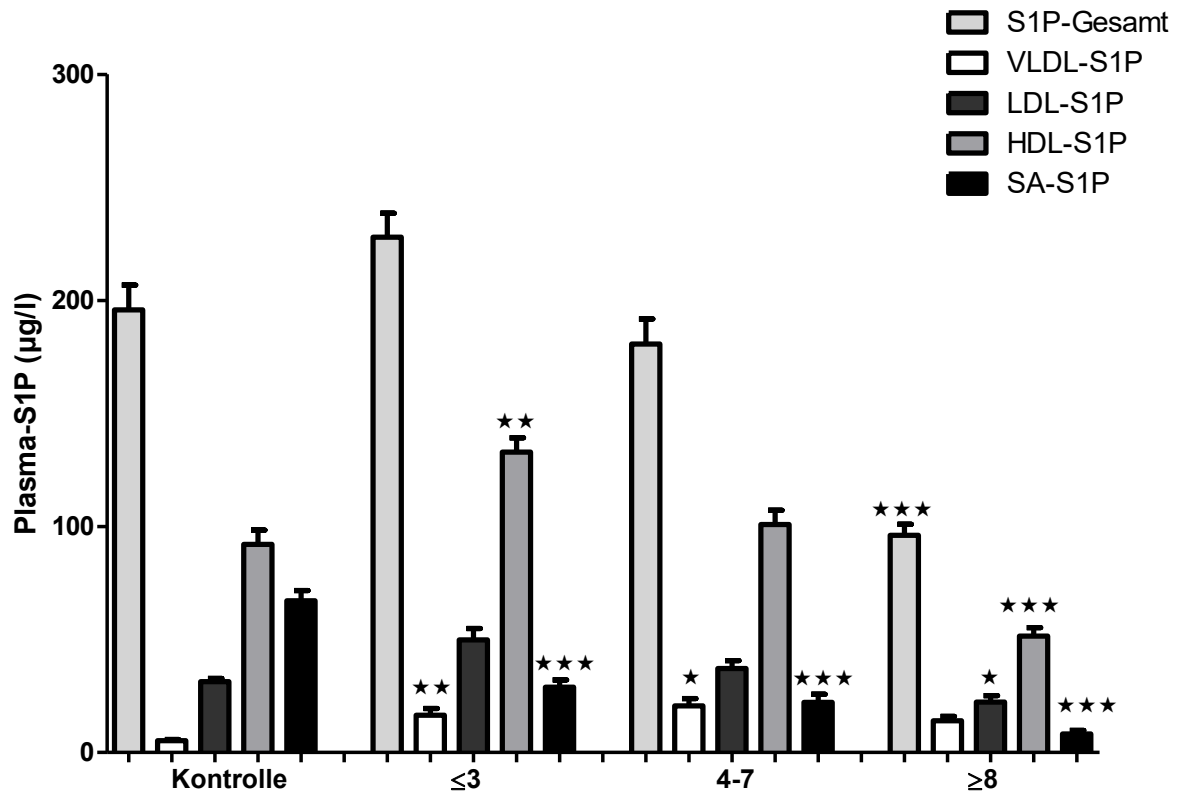


Abb.19: Die Plasma S1P-Konzentration fällt signifikant in Patienten mit einem SOFA Score ≥ 8. Es kommt zu einem frühzeitigen Verlust des SA-S1P. Im Verlauf hin zu einem hohen SOFA-Score fällt die HDL- und LDL-S1P Konzentration. Massenspektrometrische Analyse des Plasmas S1P Levels zwischen den einzelnen Patientengruppen (Kontrolle, Chirurgie, Sepsis, Septischer Schock) bezogen auf das Gesamt-Plasma Sphingosin-1-phosphat (S1P), S1P gebunden an Serum Albumin (SA-S1P), S1P gebunden an High Density Lipoprotein (HDL-S1P), S1P gebunden an Low Density Lipoprotein (LDL-S1P) und S1P gebunden an Very Low Density Lipoprotein (VLDL-S1P); S1P in µg/L; Die Daten werden als Mittelwert mit 95% Konfidenzintervall dargestellt. Die Gruppen werden mit einem nicht-parametrischen Mann-Whitney U-Test gegen die Kontrolle verglichen: *p ≤ 0,05; **p ≤ 0,01, ***p ≤ 0,001

Abb. 20 zeigt die prozentuale Verteilung von S1P an seinen spezifischen Transportproteinen innerhalb der Gesamt-Plasma S1P Konzentration bezogen sowohl auf den SOFA-Score als auch auf die Patienten-Gruppen. Es lässt sich erkennen, dass es bei chirurgischen Patienten bzw. bei SOFA-Score ≤ 3 Patienten zu einer prozentualen Zunahme der S1P Menge an VLDL (2,6% → 15,0% bzw. 5,1%) und HDL (45,9% → 59,1% bzw. 59,6%) kommt. Gleichzeitig lässt sich ein signifikanter prozentualer Verlust der S1P Menge in der SA Fraktion (34,2% → 11,3% bzw. 11,7%)

im Vergleich zu den Kontrollen beobachten (Abb. 20A, B, E). In der Sofa-Score 4-7 Gruppe ist weiterhin eine starke signifikante Reduktion der prozentualen S1P Menge am SA (35,2% → 7,7%) zu erkennen.

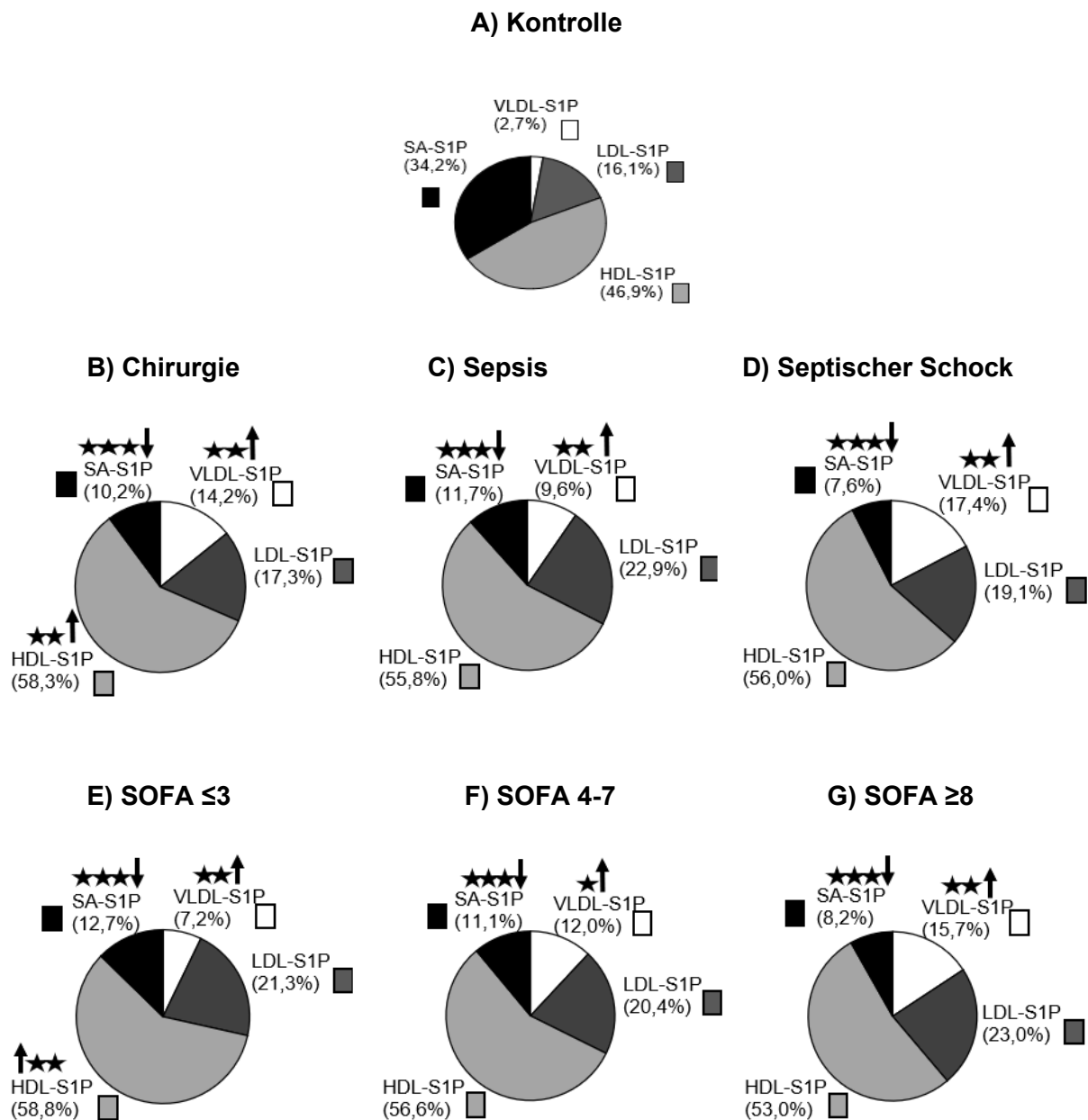


Abb. 20: **Prozentuale Umverteilung innerhalb des Gesamt-Plasma S1P von SA zu HDL und VLDL im Verlauf einer Sepsis hin zum septischen Schock.** Massenspektrometrische Analyse der S1P Konzentration an den einzelnen Transportproteinen bezogen auf das Gesamt-Plasma S1P in % zwischen den einzelnen Patientengruppen (Kontrolle (A), Chirurgie (B), Sepsis (C), Septischer Schock (D), SOFA-Score ≤ 3 (E), 4-7 (F), ≥ 8 (G)), S1P gebunden an Serum Albumin (SA-S1P), S1P gebunden an High Density Lipoprotein (HDL-S1P), S1P gebunden an Low Density Lipoprotein (LDL-S1P) und S1P gebunden an Very Low Density Lipoprotein (VLDL-S1P); Die Daten werden als Mittelwert dargestellt. Die Gruppen werden mit einem nicht-parametrischen Mann-Whitney U-Test gegen die Kontrolle verglichen: *p ≤ 0,05; **p ≤ 0,01, ***p ≤ 0,001

Gleichzeitig bleibt die erhöhte prozentuale S1P Menge an HDL (45,9% → 55,2%) erhalten, die jedoch nicht mehr statistisch signifikant ist. Die signifikant erhöhte prozentuale S1P Menge an VLDL (2,6% → 10,7%) bleibt bestehen. In der Sepsisgruppe kann die oben genannte Zunahme der prozentualen S1P-Konzentration an HDL (45,9% → 54,9%) und VLDL (2,6% → 5,4%) weiterhin detektiert werden, ist jedoch bezogen auf HDL nicht mehr signifikant. Die signifikante prozentuale Reduktion des S1P an SA (35,2% → 8,8%) bleibt ebenfalls bestehen (Abb. 20A, C, F).

Bei septischen Schock bzw. SOFA-Score ≥ 8 Patienten lässt sich weiter eine nicht signifikante Veränderung der prozentualen Menge des S1P zugunsten des HDL (54,9% → 54,5% bzw. 52,9%) im Vergleich zu den Kontrollen erkennen. Jedoch gibt es weiter eine signifikante prozentuale Zunahme des S1Ps an VLDL (2,6% → 16,8% bzw. 15,5%) im Vergleich zu den Kontrollen. Die signifikante Reduktion des prozentualen Anteils des S1P an SA (35,2% → 5,2% bzw. 6,2%) bleibt ebenfalls bei diesen Patienten bestehen (Abb. 20A, D, G). Die LDL-S1P Konzentration zeigt keine signifikanten Veränderungen über alle Patientengruppen hinweg (Abb. 20).

Aufgrund dieser Ergebnisse lässt sich eine Umverteilung des S1P von SA hauptsächlich auf HDL und in geringerem Maß auf VLDL ohne einen Verlust des Gesamt- Plasma S1P sowohl bei chirurgischen Patienten als auch bei Patienten mit einem niedrigen SOFA-Score vermuten. Ein signifikanter Abfall der S1P-Gesamtkonzentration bei Patienten mit einem septischen Schock oder einem SOFA-Score von über 8 wird hauptsächlich durch den weiteren Verlust des S1P an HDL und LDL hervorgerufen (Tab.10 und Abb. 17, 18, 19, 20).

4.3 Vergleich zwischen Transportprotein und Transportprotein-S1P

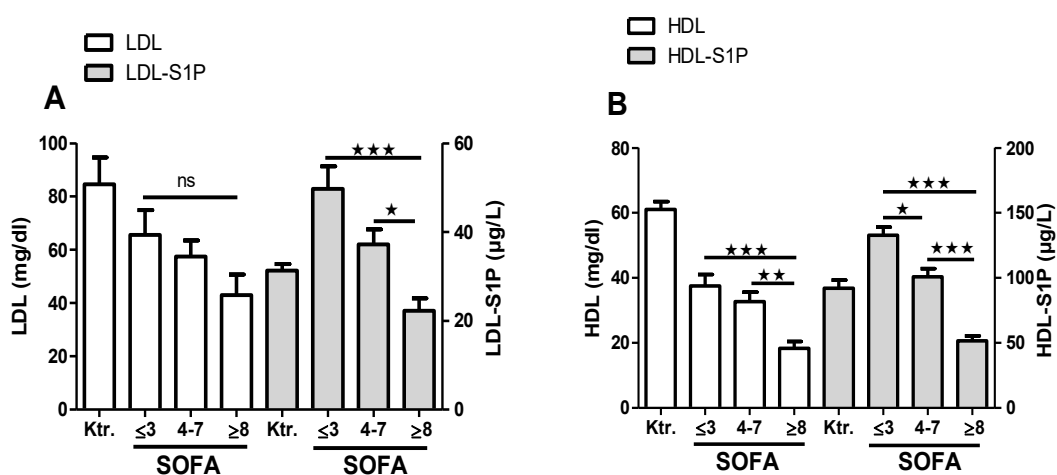
Im Folgenden wird untersucht, inwieweit sich die Konzentration der Transportproteine (LDL, HDL, SA) in Bezug auf den SOFA-Score verändern. Ebenso ist von Interesse, ob ein Abfall der S1P-Konzentration mit einer Reduktion der Transportkapazität zusammenhängen könnte. Hierfür wird die Plasma Konzentration von LDL, HDL und SA mit der Konzentration von HLD-S1P, SA-S1P und LDL-S1P verglichen. Die VLDL-Konzentration wurde nicht von der ursprünglichen Studienkohorte gemessen und konnte deswegen auch nicht dargestellt werden.

Tab. 11: Konzentrationsveränderungen der Transportproteine (LDL, HDL, SA) bezogen auf den SOFA Score

Variable	Kontrolle	SOFA ≤ 3	SOFA 4-7	SOFA ≥ 8	p-Wert
Transportproteine von Sphingosin 1-Phosphat					
HDL, mg/dL n=71	60,5 (57,8-63,3)	35,5 (25,3-44,3)	31,0 (21,0-37,0)	16,5 (13,3-18)	0.0001
SA, g/L n=86	40,5 (40,0-44,0)	23,5 (21,8-27,3)	19,0 (15,0-22,0)	18,0 (13,0-26,0)	0,0062
LDL, mg/dL n=68	71,5 (68,8-96,0)	44,5 (34,8-94,3)	48,0 (30,8-73,3)	42,5 (24,0-59,0)	ns

High density Lipoprotein (HDL), Serum Albumin (SA), Low Density Lipoprotein (LDL), Very Low Density Lipoprotein (VLDL), Sphingosin-1-Phosphat (S1P), nicht signifikant (ns). Die Daten werden als Median (IQR) dargestellt, mit 25 Quantil und 75 Quantil. *p-Wert für den Trend zwischen allen Patientengruppen unter Verwendung eines nichtparametrischen ANOVA Kruskal-Wallis-Tests *p ≤ 0,05; **p ≤ 0,01, ***p ≤ 0,001

Mittels Lipoprotein-Präzipitation und anschließender massenspektrometrischer sowie klinischer Chemie wurde den genannten Fragestellungen nachgegangen. Auf der linken Y-Achse der Diagramme wird jeweils die Konzentration der Transportproteine angegeben. Die rechte Y-Achse zeigt jeweils die Konzentration von S1P an seinen Transportproteinen HDL, SA und LDL.



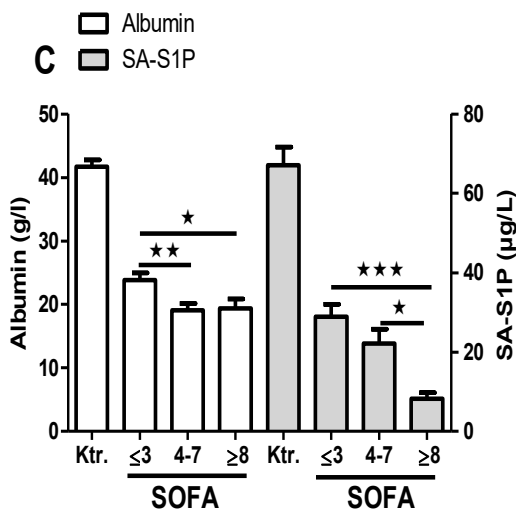


Abb. 21: **LDL-S1P, HDL-, HDL-S1P- und SA-S1P-Werte zeigen eine inverse Korrelation mit dem SOFA-Score.** Vergleich der Trägerproteine von Sphingosin-1-Phosphat (linke y-Achse) und trägerspezifischer S1P-Fractionen (rechte y-Achse) bei Sepsispatienten mit steigendem Schweregrad. A) Low Density Lipoprotein (LDL) und LDL-S1P B) High-Density-Lipoprotein (HDL) und HDL-S1P und C) Serum Albumin (SA) und SA-S1P werden gezeigt. Die Daten werden als Mittelwert mit 95% Konfidenzintervall dargestellt. Die Patientengruppen werden unter Verwendung eines nicht parametrischen ANOVA Kruskal-Wallis-Tests mit Post Hoc Dunn Test zur Trendanalyse zwischen Gruppen mit steigendem Sepsis-Schweregrad verglichen * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$.

Interessanterweise zeigten die LDL-S1P, HDL, HDL-S1P- und SA-S1P-Spiegel eine stetige inverse Korrelation mit dem SOFA-Score, während die SA-Spiegel ab einem SOFA-Score von 4-7 nicht mehr signifikant fallen (Tab. 10, 11 und Abb. 21).

Es kommt zu einer Reduktion der HDL-Konzentration von ca. 40% zwischen den gesunden Kontrollen und den Patienten mit einem SOFA ≤ 3 . Mit steigendem SOFA Score zeigt sich eine kontinuierliche weitere Reduktion der HDL-Konzentration um dann ca. 50%. Bei Patienten mit einem SOFA Score ≥ 8 zeigt sich der größte Abfall des HDL um ca. 70% (Tab.11 und Abb. 21B). Im Vergleich zu HDL ergibt sich bei HDL-S1P zwischen gesunden Kontrollen und Patienten mit einem SOFA Score ≤ 3 zunächst eine Zunahme der HDL-S1P Konzentration um ca. 40%. Mit steigendem SOFA-Score kommt es dann allerdings zu einer stetigen Reduktion der HDL-S1P Konzentration um bis zu 50% des Ausgangswertes. Somit zeigt sich einerseits eine stetige Reduktion von HDL und andererseits zunächst eine Zunahme und anschließend eine Abnahme der HDL-S1P mit steigendem SOFA Score (Tab. 10, 11 und Abb. 21B).

Die SA-Konzentration fällt signifikant bei Patienten mit eine SOFA von ≤ 3 um ca. 40% im Vergleich zu den gesunden Kontrollen. Es konnte eine weitere Reduktion der SA Konzentration bei Patienten mit einem SOFA von 4-7 detektiert werden. Allerdings kommt es bei weiter steigendem SOFA Score zu keiner weiteren Reduktion der SA-

Konzentration. Die SA-S1P Konzentration nimmt mit steigendem SOFA-Score jedoch wie oben beschrieben kontinuierlich ab (Tab. 10, 11 und Abb. 21C).

Das gleiche Phänomen wie bei SA lässt sich bei LDL und LDL-S1P beobachten. Allerdings ist bei der Betrachtung des Graphen zu vermuten, dass die LDL-Konzentration während einer Sepsis abfällt und mit steigendem SOFA-Score weiter abnimmt. Dieser Abfall ist jedoch in der vorliegenden Studienkohorte noch nicht signifikant (Tab. 10, 11 und Abb. 21A). Die gewonnenen Ergebnisse lassen vermuten, dass ein korrelativer Zusammenhang zwischen den HDL-Spiegeln und dem SOFA Score besteht, aber nicht zwischen dem SOFA-Score und den SA-Spiegeln im Plasma septischer Patienten.

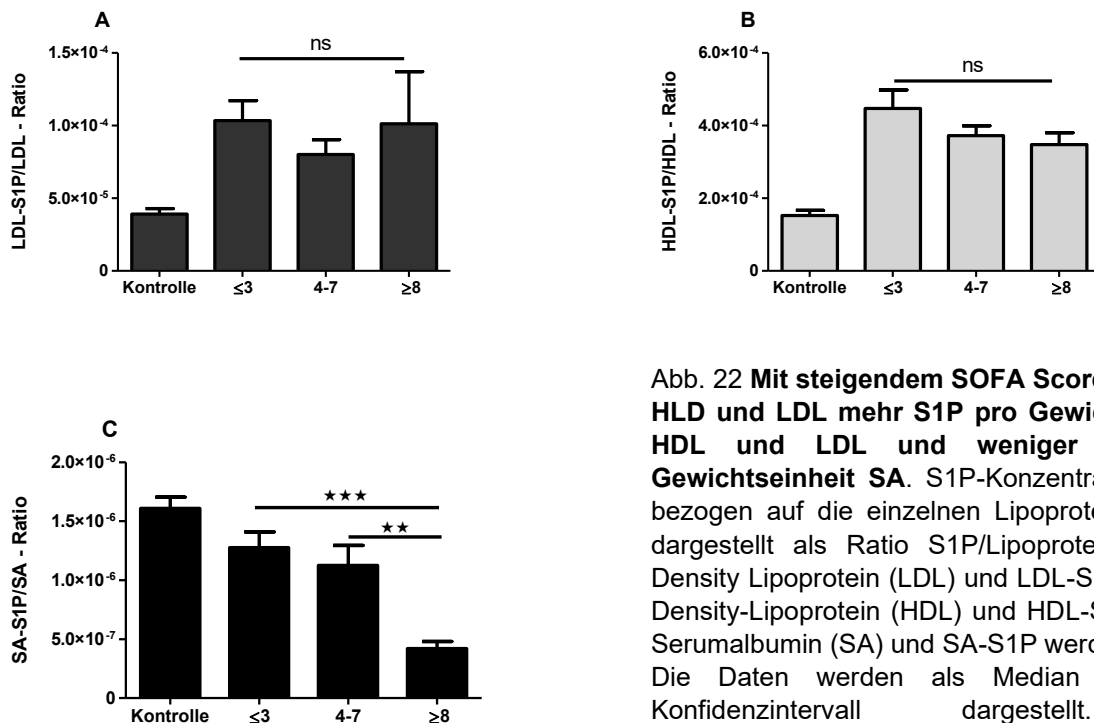


Abb. 22 **Mit steigendem SOFA Score enthalten HLD und LDL mehr S1P pro Gewichtseinheit HDL und LDL und weniger S1P pro Gewichtseinheit SA.** S1P-Konzentration ($\mu\text{g/L}$) bezogen auf die einzelnen Lipoproteine ($\mu\text{g/L}$), dargestellt als Ratio S1P/Lipoprotein A) Low Density Lipoprotein (LDL) und LDL-S1P B) High-Density-Lipoprotein (HDL) und HDL-S1P und C) Serumalbumin (SA) und SA-S1P werden gezeigt. Die Daten werden als Median und 95% Konfidenzintervall dargestellt. Die Patientengruppen werden unter Verwendung eines nichtparametrischen ANOVA Kruskal-Wallis-Tests mit Post-Test: Dunn's Multiple Comparison Test zur Trendanalyse zwischen Gruppen mit steigendem Sepsis-Schweregrad verglichen * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$

Um die oben gezeigten Ergebnisse zu verdeutlichen, wurden aus den oben genannten Daten ein Transportprotein-S1P zu Transportprotein Ratio gebildet. Dies soll zeigen, wieviel S1P pro Transportprotein-Partikel enthalten ist. Zunächst lässt sich erkennen, dass pro μg Transportprotein insgesamt nur sehr wenig S1P gebunden ist.

HDL (Ratio = 0,00015) enthält das meiste S1P pro Gewichtseinheit, danach folgen LDL (Ratio = 3,9E-005) und SA (Ratio = 1,61E-006) (Abb. 22 A, B, C). Bei Betrachtung des LDL-Graphen (Abb. 22A) lässt sich erkennen, dass bei Patienten mit einem SOFA-Score von ≤ 3 , 4-7 oder ≥ 8 im Vergleich zu den Kontrollen mehr S1P pro μg LDL gebunden wird. Das bestärkt die oben genannte Vermutung, dass LDL wie auch LDL-S1P während einer Sepsis abfallen und es somit zu keiner Veränderung des LDL-S1P/LDL-Ratio kommt. Bei HDL zeigt sich, dass bei niedrigen (≤ 3), mittleren (4-7) und hohen (≥ 8) SOFA-Scores wesentlich mehr S1P pro μg HDL gebunden wird (Abb. 22B). Bezogen auf SA ist zu beobachten, dass bei gesunden Kontrollen sowie bei Patienten mit einem niedrigen (≤ 3) und mittleren (4-7) SOFA-Score kein Unterschied bezogen auf die Menge des S1P pro mg SA besteht. Allerdings kommt es bei Patienten mit einem $\text{SOFA} \geq 8$ zu einer signifikanten Reduktion der S1P Menge pro mg SA und somit zu einer signifikanten Veränderung der SA-S1P/SA-Ratio (Abb. 22C).

4.4 Regression und Korrelation

Es stellt sich die Frage, ob zwischen dem Gesamt-S1P, VLDL-S1P, LDL-S1P, HDL-S1P und SA-S1P und dem SOFA Score ein korrelativer Zusammenhang besteht, der einen prognostischen Aussagewert zum SOFA-Score besitzt. Für diese Analyse wurde eine Spearman-Korrelation und eine multivariate logistische Regressionsanalyse durchgeführt (Tab. 12 und Abb. 23).

Die Graphen wurden in Tertile (SOFA-Score ≤ 3 , 4-7, ≥ 8) aufgeteilt. Jeder Punkt veranschaulicht eine massenspektrometrisch analysierte Plasmaprobe eines Patienten der Studienkohorte. Die S1P-Konzentration wurde auf der y-Achse in $\mu\text{g/L}$ und der SOFA-Score auf der x-Achse von 0-20 dargestellt.

Es zeigt sich eine signifikante starke inverse Korrelation zwischen der Gesamt-Plasma S1P- (rho -0,71, $p < 0,0001$), HDL-S1P- (rho -0,73, $p < 0,0001$) und SA-S1P-Konzentration (rho -0,50, $p < 0,0001$). Bei LDL-S1P ist eine mäßige signifikante inverse Korrelation (rho -0,47, $p < 0,0001$) zu beobachten. Eine signifikante Korrelation zwischen VLDL-S1P und dem SOFA-Score konnte nicht festgestellt werden (Abb. 23).

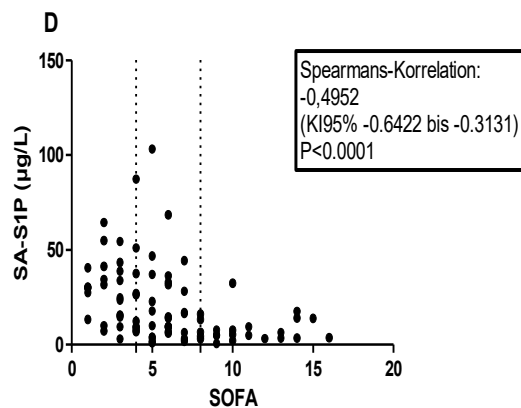
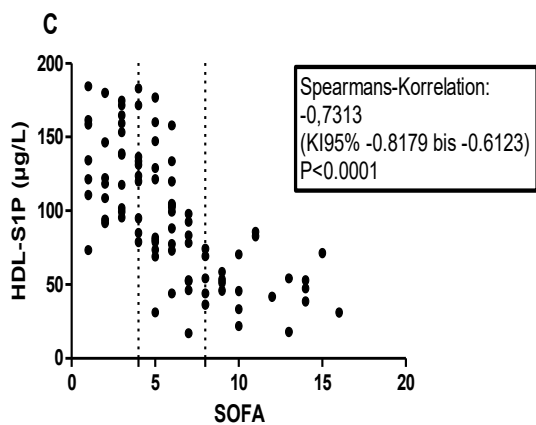
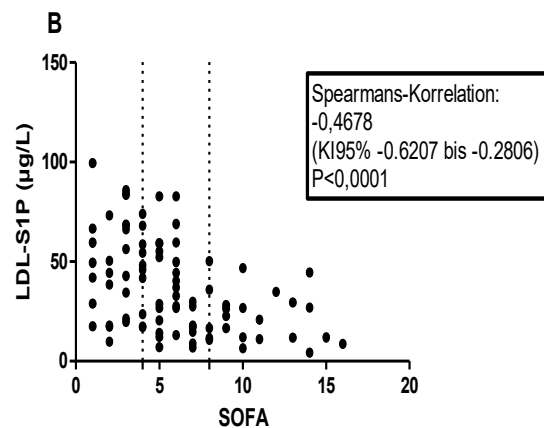
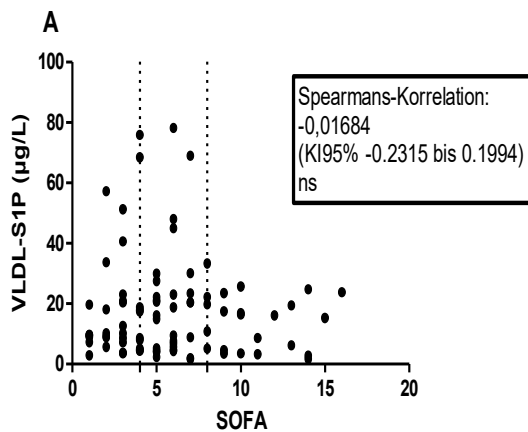
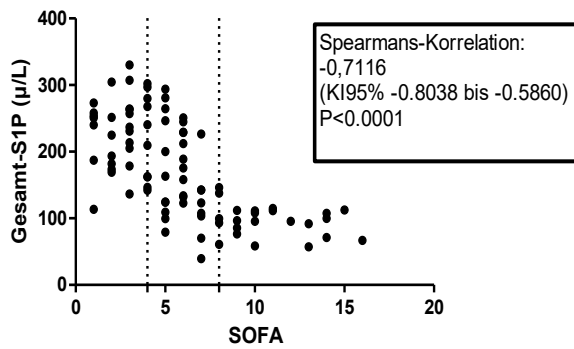


Abb. 23: **Signifikante inverse Korrelation von Gesamt-Plasma S1P, HDL-S1P, SA-S1P und LDL-S1P mit dem SOFA-Score.** Es wird der Spearman'sche Rangkorrelationskoeffizient (rho mit 95% Konfidenzintervall) für Gesamt-Plasma S1P- (A), VLDL-S1P- (B), LDL-S1P (C)-, HDL-S1P-(D), SA-S1P Plasmaspiegel (E) im Zusammenhang mit dem SOFA-Score dargestellt. Vertikale gepunktete Linien zeigen SOFA-Tertile an: unteres SOFA ≤ 3 , mittleres SOFA 4-7 und oberes SOFA ≥ 8 Tertil. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$

Da HDL und SA als die Hauptträger von S1P identifiziert wurden und diese Analyten die stärksten korrelativen Veränderungen bezüglich der Sepsisschwere aufzeigen, wurde eine multivariate logistische Regressionsanalyse durchgeführt. Mit Hilfe dieser Methode wurden HDL, SA, HDL-S1P, SA-S1P mit bekannten Entzündungsparametern (Leukozyten, C-Reaktives Protein, Interleukin-6, Procalcitonin) verglichen. Dabei wurde analysiert, inwieweit diese Parameter einen Einfluss auf den SOFA-Score haben und ob mit Hilfe dieser Parameter eine prognostische Aussage bezüglich des Verlaufs einer Sepsis möglich ist. Es wurden zwei Gruppen gebildet und nur Patienten eingeschlossen, bei denen die Patientendaten vollständig vorlagen (n=69). In der ersten Gruppe waren die Patienten mit einem SOFA Score ≥ 8 bzw. mit einem septischen Schock. Die zweite Gruppe umfasste die Patienten, die keines der zwei Kriterien der ersten Gruppe erfüllten.

Tab.12: Die multivariate logistische Regression zeigt HDL-S1P zusammen mit HDL als stärkste und signifikanteste Prädiktoren für den Sepsis-Schweregrad in diesem Modell.

Variable	Regressionskoeffizient	Odds ratio (95% KI)	p-Wert
HDL-S1P, $\mu\text{g/L}$	- 0,147	0,86 (0,77–0,97)	0.013
SA-S1P, $\mu\text{g/L}$	+ 0,056	1,06 (0,92–1,22)	ns
HDL, mg/dL	- 0,280	0,76 (0,57–1,00)	0.05
SA, g/L	+ 0,139	1,15 (0,83–1,59)	ns
Leukozyten, $\times 10^9/\text{L}$	+ 0,104	1,11 (0,96–1,29)	ns
C-Reaktives Protein, mg/L	-0,002	1,00 (0,98–1,02)	ns
Interleukin-6, ng/L	+ 0,001	1,00 (1,00–1,00)	ns
Procalcitonin, $\mu\text{g/L}$	+ 0,242	1,27 (0,96–1,88)	ns

Multivariate logistische Regression von High density Lipoprotein (HDL), HDL- Sphingosin-1-Phosphat (S1P), Serum Albumin (SA), SA-S1P und spezifischen Entzündungsparametern (Leukozyten, CRP, Interleukine-6, Procalcitonin), nicht signifikant (ns). Die Daten werden als Odds Ratio mit 25 Quantil und 75 Quantil angegeben. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$

Gemäß Tab. 12 zeigt sich, dass vor allem HDL und HDL-S1P einen signifikanten prädiktiven Aussagewert bezüglich der Sepsisschwere besitzen ($p = 0,006$ bzw. $p = 0,002$). Eine Erhöhung der HDL-S1P bzw. HDL Werte zeigten mit einer Odds-Ratio von 0,86 ($p=0.013$) bzw. 0,76 ($p=0,05$) eine signifikante Assoziation zwischen HDL-S1P und HDL sowie der Entwicklung eines ≥ 8 SOFA-Scores bzw. eines septischen Schocks. Interessanterweise besitzen in diesem Modell SA-S1P und SA sowie die klassischen Entzündungsparameter wie Leukozyten, CRP, IL-6 und PCT keine signifikante Assoziation bezüglich des Verlaufs einer Sepsis hin zu einem septischen Schock.

4.5 Konzentrationsmessung bezogen auf die 28-Tage-Mortalität

Im Rahmen der Analyse der 28-Tage-Mortalität wurden nur Patienten mit Sepsis und septischem Schock berücksichtigt (Abb. 24). Bei diesen beiden Gruppen wurde zwischen Patienten (Überleben, $n=60$), die eine Sepsis bzw. einen septischen Schock überlebt hatten, und Patienten (Tod, $n=12$), die an einer Sepsis bzw. an einem septischen Schock innerhalb von 28 Tagen verstorben waren, unterschieden.

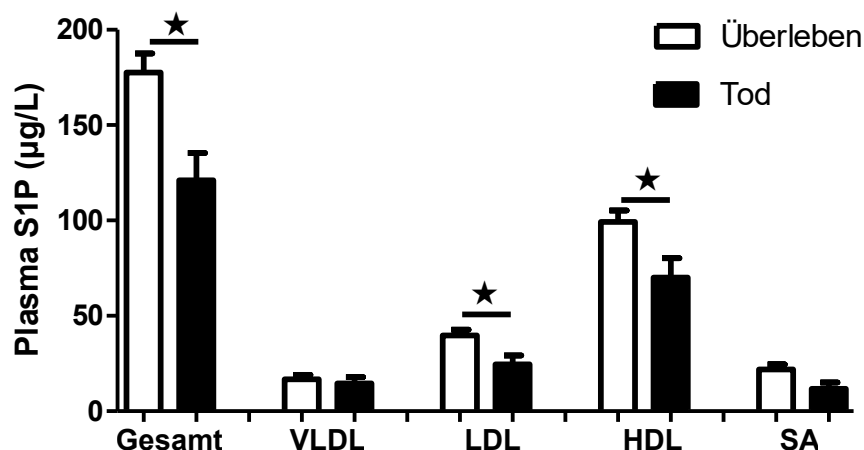


Abb. 24: **Signifikanter Abfall des HDL-S1P und LDL-S1P bei den verstorbenen Patienten im Vergleich zu den überlebenden Patienten bei Sepsis und bei einem septischen Schock.** Massenspektrometrische Analyse der S1P Konzentration gebunden an seine Transportproteine im Vergleich zwischen überlebenden und verstorbenen Patienten (Sepsis, Septischer Schock), Gesamt-Plasma S1P (Gesamt), S1P gebunden an Very Low Density Lipoprotein (VLDL-S1P), S1P gebunden an Low Density Lipoprotein (LDL-S1P), S1P gebunden an High Density Lipoprotein (HDL-S1P) und S1P gebunden an Serum Albumin (SA-S1P); S1P in $\mu\text{g/L}$; Die Daten werden als Mittelwert und 95% Konfidenzintervall dargestellt. Die Gruppen werden mit einem nicht-parametrischen Mann-Whitney U-Test verglichen: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$

Es wurde verglichen, ob es Unterschiede zwischen den beiden Gruppen bezogen auf die Gesamt-Plasma S1P Konzentration bzw. die S1P Konzentration an den spezifischen Transportproteinen gibt. Interessanterweise zeigte sich ein signifikanter Unterschied des Gesamt-S1P, des LDL-S1P und des HDL-S1P zwischen Patienten, die eine Sepsis bzw. einen septischen Schock überlebt hatten, und jenen Patienten, die daran verstorben waren. Patienten, die an einer Sepsis oder septischen Schock verstarben, zeigten ca. 30% niedrigere Gesamt-S1P-Konzentrationen (166,2µg/L→113,3µg/L). Bei den verstorbenen Patienten fiel das HDL-S1P um 30,6µg/L von 94,5µg/L auf 63,9µg/L. Die LDL-Konzentration fiel von 34,5µg/L um 13,0µg/L auf 21,5µg/L. Septische und septische Schock Patienten mit niedrigem Gesamt-Plasma S1P- sowie niedrigeren HDL-S1P- und LDL-S1P-Konzentrationen am ersten Tag zeigten eine erhöhte Mortalität (Abb. 24). Ein Unterschied in der VLDL-S1P- und SA-S1P-Konzentration konnte bezogen auf die Mortalität zwischen den beiden Gruppen nicht detektiert werden.

4.6 Ergebnisse im Überblick

Als zentrales Ergebnis ist festzuhalten, dass es signifikante Unterschiede sowohl in der Konzentration als auch in der prozentualen Verteilung von S1P an seinen unterschiedlichen Transportproteinen im Verlauf einer Sepsis gibt (Abb. 25).

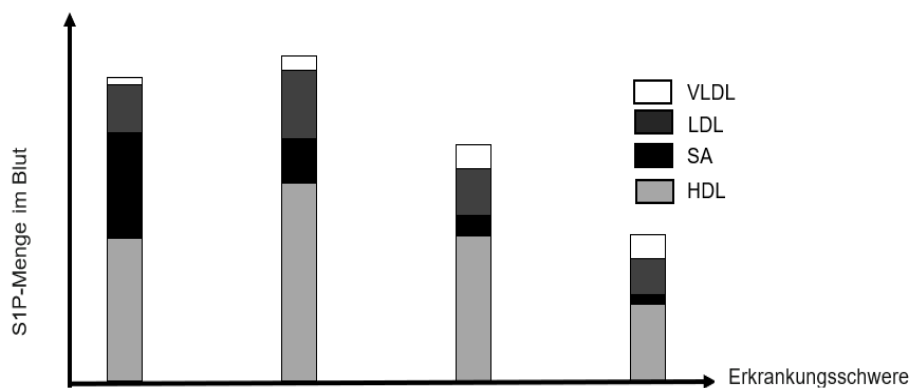


Abb. 25: Konzentrations- und Verteilungsänderung von S1P an seinen Transportproteinen im Verlauf einer Sepsis

Im Hinblick auf die in Kapitel 2 formulierte wissenschaftliche Fragestellung wurden die folgenden Erkenntnisse gewonnen:

- Es kommt frühzeitig zu einem Abfall der SA-S1P Konzentration und zu einer Zunahme der VLDL-S1P und vor allem der HDL-S1P Konzentration. Im Verlauf einer Sepsis hin zum septischen Schock kommt es zu einem Konzentrationsverlust von HDL-S1P und in geringerem Umfang auch von LDL-S1P.
- Bereits bei niedrigen SOFA Scores kommt es zu einer prozentualen Umverteilung innerhalb des Gesamt-Plasma S1P zugunsten vor allem von HDL-S1P und in geringerem Umfang auch VLDL-S1P zu Lasten von SA-S1P.
- Bei allen Patientengruppen ist mehr S1P pro μg HDL gebunden als bei den Kontrollgruppen. Im Vergleich zu HDL kommt es zu einer stetigen Reduktion der S1P Menge pro mg SA mit steigendem SOFA Score.
- Es zeigt sich, dass HDL und HDL-S1P die stärksten Prädiktoren für einen schweren Sepsisverlauf im hier verwendeten Modell sind.

5. Diskussion

Im Rahmen der folgenden Diskussion sollen die gewonnenen Ergebnisse im Lichte der aktuellen wissenschaftlichen Literatur eingeordnet werden. Nach herrschender Meinung kommt es im Verlauf einer Sepsis zu einem Abfall von S1P (Winkler et al. 2015). Allerdings war bisher ungeklärt, ob dieser Abfall des Gesamt-Plasma S1P durch den Verlust von S1P an einem oder mehreren Lipoproteinen bedingt ist und ob dieser Abfall durch den Verlust der Transportkapazität von S1P während einer Sepsis verursacht wird.

Im Rahmen dieser Untersuchung ergeben sich drei zentrale Erkenntnisse:

1. Im Vergleich zu den gesunden Kontrollen kommt es in allen Patientengruppen zu einer prozentualen Umverteilung von S1P von SA hauptsächlich zu HDL und geringer zu VLDL (Winkler et al. 2019).
2. Die beiden Transportproteine SA und HDL verhalten sich bezogen auf die Krankheitsschwere unterschiedlich. Während SA-S1P bei postoperativen Patienten und Sepsispatienten, die sich durch einen niedrigen SOFA-Score auszeichneten, signifikant sank, wurden die Gesamt-S1P-Plasmaspiegel bei diesen Patienten über erhöhte HDL-S1P und VLDL-S1P Spiegel aufrechterhalten. Im Gegensatz dazu wurde der endgültige Übergang zu verringertem Gesamt-Plasma S1P bei Patienten mit septischem Schock vorwiegend durch einen Abfall des HDL-S1P und in geringerem Maß von LDL-S1P verursacht (Winkler et al. 2019).
3. Es zeigt sich, dass bei Patienten mit einem SOFA Score ≥ 8 die Assoziation von S1P mit SA noch geringer ist als bei Patienten mit einem SOFA-Score ≤ 3 , obwohl sich die Konzentration von SA nicht wesentlich zwischen den beiden Patientengruppen verändert. Umgekehrt ergibt sich bei allen Patientengruppen eine stärkere Assoziation von HDL mit S1P. Dies könnte auf strukturelle Veränderungen von SA und HDL im Verlauf einer Sepsis deuten, die zu geringeren bzw. höheren Bindungsaffinitäten des SA bzw. HDL für S1P bei Patienten führen könnten.

5.1 Methode

Die Isolation der Lipoproteine erfolgte mittels einer Lipoprotein-Präzipitation. Auf der Grundlage einer Literaturrecherche sowie der Erfahrung der Durchführer mit dieser Methode wurde diese zur Extraktion von Lipoproteinen gewählt (Burstein et al. 1970, Bode et al. 2010). Die Lipoproteinextraktion wurde im Vorfeld mittels eines Western-Blots auf ihre Sensitivität bezüglich der einzelnen Lipoproteine (VLDL, LDL, HDL) geprüft. Es zeigten sich bezogen auf den Lipoproteingehalt sehr reine Banden. Somit wurde im Vorfeld ausgeschlossen, dass es zu einer Kontamination der einzelnen Lipoproteine untereinander kommen konnte. Die Flüssigkeits-Chromatographiegekoppelte Tandem-Massenspektrometrie zeigt sich aufgrund ihrer hohen Sensitivität und überlegenen Spezifität anderen methodischen Ansätzen überlegen und hat sich zu einer allgemein anerkannten Methode für den Nachweis von Sphingolipidmetaboliten entwickelt. Die Durchführung der Methode erfolgte nach einem etablierten Protokoll (Bode und Graler 2012).

5.2 Demographische Daten

Die vorliegenden Daten zeigen, dass Patienten mit einem septischen Schock im Vergleich sowohl zu post-chirurgischen Patienten als auch septischen Patienten die längste Aufenthaltsdauer auf Intensivstationen, die höchste Mortalität (ca. 30%), die höchsten SOFA-Werte (10) und die höchsten Entzündungsparameter aufzeigen (Tab. 9). Ebenso musste fast ein Drittel aller septischen Schock Patienten invasiv beatmet werden. Diese Erkenntnisse stehen im Einklang mit anderen wissenschaftlichen Studien, die zu ähnlichen Ergebnissen kommen. (Engel et al. 2007, Vincent et al. 2006, SepNet Critical Care Trials 2016, Bloos et al. 2017, Thomas-Ruddel et al. 2018).

5.3 S1P-Verteilung an den Transportproteinen

Es konnte gezeigt werden, dass bei gesunden Kontrollen 45,9% des Gesamt-Plasma S1P an HDL, 35,2% an SA, 15,9% an LDL und 2,6% an VLDL binden (Tab. 10). Eine Studie von Murata et al. (2000) kommt ebenso zu dem Ergebnis, dass HDL (54,1%)

das meiste S1P bindet, gefolgt von SA (35,6%), LDL (8,2 %) und VLDL (2,1%). Eine weitere Studie aus dem Jahr 2010 konnte zeigen, dass das Gesamt-Plasma S1P zu ca. 78% an HDL3, ca. 16,3% an HDL2, ca. 3,73% an LDL und nur ca. 1,33% an VLDL bindet. Dabei wurde jedoch nicht das S1P berücksichtigt, welches an SA bindet (Hammad et al. 2010). Nach Abzug der SA-S1P Werte von der Gesamt-Plasma S1P Konzentration konnten wir detektieren, dass ca. 70% an HDL, ca. 25,5% an LDL und 4,5% an VLDL bindet. Im Vergleich zu den Daten von Hammad et al. (2010) und Murata et al. (2000) zeigte sich erfreulicherweise eine gleiche Reihenfolge bezogen auf die S1P Menge an den jeweiligen Transportproteinen (VLDL<LDL<SA<HDL). Allerdings ergab sich ein deutlicher Unterschied bezogen auf die prozentuale Menge des S1P an LDL. Gleichzeitig zeigten sich bei uns leicht erniedrigte HDL-S1P Werte (46,1% zu 54,1% (Murata et al. 2000) und 70% zu 94,3%(Hammad et al. 2010). Hier ist jedoch zu betonen, dass die Stichprobenanzahl bei Hammad et al. (2010) (n=6) und Murata et al. (2000) (n≤3) relativ gering war und teilweise andere Methoden zur Detektion benutzt worden sind.

Interessanterweise konnten Hammad et al (2010) zeigen, dass pro Lipoproteinpartikel VLDL-Partikel den höchsten Gehalt an S1P haben. HDL3-Partikel weisen höhere S1P-Konzentrationen pro Lipoproteinpartikel auf als LDL-Partikel. Die niedrigste S1P-Konzentration pro Partikel befindet sich in HDL2-Partikeln (Hammad et al. 2010). Auch wir konnten zeigen, dass HDL mehr S1P pro µg HDL bindet als LDL (Abb. 22). Zusätzlich konnten wir zeigen, dass SA am wenigsten S1P pro mg SA bindet (Abb. 22). Leider konnten wir keine Aussage bezüglich der VLDL Konzentration treffen, da VLDL von der Studienkohorte nicht bestimmt worden war.

Eine weitere Studie belegt, dass ApoM der Träger von S1P in HDL ist (Christoffersen et al. 2011). S1P bevorzugt die Bindung mit kleinen, dichten HDL-Partikeln, welche einen hohen Anteil von ApoM besitzen, im Vergleich zu großen, leichten HDL-Partikeln (Kontush et al. 2007, Davidson et al. 2009). Zusätzlich haben Obinata et al. (2019) festgestellt, dass S1P bei ApoM und Albumin Knock-out (KO) Mäusen zusätzlich an ApoA4 binden kann (Obinata et al. 2019). Die HDL-S1P-Konzentration korreliert positiv mit den Apo-A-I-, Apo-A-II-, Cholesteringehalt des HDL sowie mit den Gesamt-Plasma S1P-Spiegeln. Die LDL-S1P-Konzentration korreliert positiv mit den Apo-B-Spiegeln und dem Cholesterin Gehalt des LDL. In ApoA-I-haltigen Partikeln war die Menge der

Phospholipide (z.B. S1P) höher als bei ApoB-haltigen Partikeln (Zhang et al. 2005, Bottcher et al. 2000). Aufgrund der oben beschriebenen Verteilung von S1P an den jeweiligen Transportproteinen könnte ApoM eine größere Bindungsaffinität für S1P besitzen als das bis jetzt noch unbekannte Bindeprotein von LDL und SA für S1P. Somit wird die Bindungsaffinität von S1P an seinen einzelnen Transportproteinen (VLDL, LDL, HDL) vermutlich von deren Zusammensetzung, insbesondere im Hinblick auf ihren Apolipoproteingehalt, bestimmt.

5.4 SA-S1P

In unserer Studie konnte wir einen Abfall des SA um ca. 40% und einen Abfall des SA-S1P um ca. 70% bei chirurgischen Patienten bzw. bei Patienten mit einem SOFA ≤ 3 beobachten (Tab. 10, 11). Gleichzeitig ließ sich bei beiden Patientengruppen eine Zunahme der HDL-S1P Konzentration detektieren (Tab. 10). Zusätzlich konnten wir zeigen, dass HDL pro Partikel bei niedrigen SOFA-Scores mehr S1P bindet als das HDL von gesunden Probanden (Abb. 22B). SA hatte bei hohen SOFA-Scores signifikant weniger S1P pro Partikel gebunden als das SA von gesunden Probanden (Abb. 22C). Unsere Daten lassen vermuten, dass es zu einer Umverteilung des S1P von SA hauptsächlich zu HDL und geringer zu VLDL schon sowohl bei post-chirurgischen Patienten als auch bei Patienten mit einem SOFA-Score ≤ 3 kommt.

Somit kommt es zwar zu einem Verlust der SA-S1P Konzentration, jedoch zu keinem Verlust der Gesamt-Plasma S1P Konzentration. Bei septischen Patienten bzw. Patienten mit einem SOFA von 4-7 lässt sich eine geringe Reduktion der Gesamt-Plasma S1P-Konzentration detektieren, die jedoch nicht signifikant ist (Tab. 10 und Abb.17). Die prozentuale Umverteilung von SA-S1P zu HDL und VLDL bleibt erhalten, allerdings kommt es hier erstmals zu einer geringfügigen Reduktion der HDL-S1P Konzentration, die sich in einem geringen Abfall der Gesamt-Plasma S1P-Konzentration widerspiegelt (Tab. 10 und Abb. 20). Mit Hilfe der multivariaten logistischen Regression konnten wir in unserem Modell SA und SA-S1P keinen prädiktiven Aussagewert bezüglich des Verlaufes einer Sepsis zuordnen (Tab. 12).

Es stellt sich die Frage, ob die Reduktion der SA-S1P Konzentration auf einer verminderten Synthese von SA beruht, die die Transportkapazität einschränkt oder ob es zu strukturellen Konformitätsänderungen innerhalb des SA kommt, die zu einer verminderten Bindungsaffinität von SA für S1P führen.

Hypoalbuminämie ist definiert durch ein Serum Albumin <35 g/L (Vincent et al. 2003). Unsere Ergebnisse zeigen, dass es schon bei einem SOFA von ≤ 3 zu einer Hypoalbuminämie kommt, welche sich mit steigendem SOFA-Score jedoch nicht mehr signifikant verändert (Tab. 11 und Abb. 21). Viele Studien konnten diesen Abfall ebenfalls bei chirurgischen wie auch septischen Patienten bestätigen (Ryan et al. 2007, Ueda et al. 2009, Kendall et al. 2019). Ein post-chirurgischer Abfall der SA-Konzentration lässt sich unter anderem durch eine Kombination von verminderter Albuminproduktion, erhöhten Verlusten, akuter Verdünnung oder Verschiebungen aus dem Gefäßraum erklären (Doweiko und Nompleggi 1991b). Ein Verlust des SA im Plasma lässt sich bei vielen weiteren Erkrankungen wie z.B. bei Leberzirrhose, nephrotischem Syndrom und Mangelernährung detektieren (Gatta et al. 2012). Eine Hypoalbuminämie ist ein Risikofaktor für eine erhöhte Mortalität bei einer Vielzahl von Erkrankungen (Goldwasser und Feldman 1997). Ein Abfall des Serum Albumin korreliert mit der Inzidenz einer Sepsis und Sepsismortalität (Kendall et al. 2019, Yin et al. 2018). Eine Metaanalyse aus dem Jahr 2003 konnte zeigen, dass eine Hypoalbuminämie bei akuten Erkrankungen mit einer schlechten Prognose bezüglich Morbidität und Mortalität einhergeht. Eine Entzündung kann eine Hypoalbuminämie durch Erhöhung der vaskulären Permeabilität und das dadurch entweichende Albumin in den extravaskulären Raum fördern. Die Auswirkungen der Hypoalbuminämie auf das Outcome von Patienten mit einer Sepsis waren jedoch von CRP und anderen inflammatorischen Markern unabhängig. Somit könnte eine Entzündung eine Rolle in der Entwicklung einer Hypoalbuminämie spielen, jedoch das schlechte Outcome, das mit einer Hypoalbuminämie einhergeht, nicht erklären (Vincent et al. 2003).

Somit lässt sich anhand der oben gezeigten Daten und dem Literaturstand vermuten, dass ein Abfall von SA ein unspezifischer Parameter für Erkrankungen im Allgemeinen ist. Jedoch ist der prognostische Aussagewert von SA bezogen auf eine Sepsis bzw. auf den Verlauf einer Sepsis als gering einzuschätzen.

Allerdings korrelierten im Vergleich zu SA niedrige SA-S1P Werte mit einem steigendem SOFA-Score (Abb. 21C). Dies könnte auf strukturelle Veränderungen des Albumins während einer Sepsis hindeuten. Rhode et al. (2019) konnten zeigen, dass Albumin 17 posttranslationale Modifikationen (z.B. Oxidation, Glykosylierung, S-Nitrosylierung) durchmacht (Rhode et al. 2019). Diese Modifikationen könnten während einer Sepsis verändert sein und zu einer geringeren Bindungsaffinität des SA für S1P führen. Oetzl et al. (2013) konnten zum Beispiel zeigen, dass oxidativer Stress im Allgemeinen zu einer Beeinträchtigung der Bindungskapazitäten von SA führt (Oetzl et al. 2013). Allerdings ist hier noch ein weites Feld für Forschungsarbeiten, um die Bindung von SA zu S1P und deren Veränderungen im Verlauf einer Sepsis besser verstehen zu können.

Die Substitution von Albumin bei Patienten mit niedrigen Serum Albumin-Ausgangswerten vor einer Sepsis stellte einen Überlebensvorteil für diese Patienten dar (Chou et al. 2009). Interessanterweise zeigten septische Patienten auf einer Intensivstation keinen Überlebensvorteil bei zusätzlicher Gabe von Albumin im Vergleich zur alleinigen Gabe von Kristalloiden (Caironi et al. 2014). Ebenso konnte gezeigt werden, dass eine intravenöse Zugabe von Albumin bei septischen Patienten nicht die vaskuläre Permeabilität reduziert (Margaron und Soni 2002). Während einer Sepsis fällt das Albumin mit geringer molekularer Masse am stärksten ab (Baum et al. 2008).

Zusammenfassend lässt sich nach dem Stand der Literatur sowie unserer Datenanalyse vermuten, dass es unabhängig von einer Sepsis zu einem frühzeitigen Abfall der SA-Konzentration sowie zu strukturellen Veränderungen des SA bei Erkrankungen, wie z.B. bei chirurgischen Eingriffen, kommt. Diese beiden Pathomechanismen führen dazu, dass weniger S1P transportiert wird und somit die positiven Effekte von SA auf z.B. die vaskuläre Integrität nicht mehr stattfinden können. Somit sollten die Substitution und vor allem der Zeitpunkt der Substitution von SA während einer Sepsis aufgrund unserer Ergebnisse überdacht werden. Es könnte von Vorteil sein, sehr frühzeitig Albumin zu substituieren, um allgemein den initialen Abfall von SA zu verhindern und somit der Entwicklung einer Sepsis entgegenzuwirken.

5.5 HDL-S1P

Ein Abfall des Gesamt-Plasma S1P im Verlaufe einer Sepsis bis hin zum septischen Schock konnte bestätigt werden (Abb. 17). Dies wurde durch unterschiedlichste Studien ebenfalls dargestellt (Winkler et al. 2015, Coldewey et al. 2016). Allerdings wurde bisher nicht festgestellt, ob dieser Abfall des Gesamt-Plasma S1P durch den Verlust von S1P an einem oder mehreren Lipoproteinen bedingt ist.

Tab. 10 und Abb. 18,19 zeigen, dass im Verlauf einer Sepsis bis hin zum septischen Schock hauptsächlich der Verlust des HDL-S1P zu einer verminderten Gesamt-Plasma S1P Konzentration führt. Ein Abfall der HDL-Konzentration bei septischen Patienten wurde - wie in anderen Studien - ebenfalls festgestellt (Tab.11 und Abb. 21B) (Murch et al. 2007, Bottcher et al. 2000, Shor et al. 2008). Zusätzlich konnten wir zeigen, dass es im Verlauf einer Sepsis bis hin zum septischen Schock zu einem weiteren Abfall der HDL-Konzentration kommt, der mit dem SOFA-Score indirekt assoziiert (Abb. 21B). Wir konnten darüber hinaus aufzeigen, dass pro μg HDL bei steigenden SOFA-Scores mehr S1P gebunden ist als bei gesunden Probanden (Abb.22B). Der Abfall des HDL korreliert mit der Schwere und Mortalität einer Sepsis (Murch et al. 2007, Chien et al. 2005). Patienten mit einer niedrigeren HDL-Konzentration zeigten im Vergleich zu Patienten mit höheren HDL-Plasma Konzentrationen keine erhöhte Sepsisanfälligkeit. Jedoch ist die Mortalität dieser Patienten erhöht (Liu et al. 2020). Bei septischen Patienten mit einem HDL-Spiegel unter 20 mg/d gab es eine signifikante Korrelation mit der Mortalität einer Sepsis (Shor et al. 2008). Unsere Spearman Korrelation und multivariate logistische Regressionsanalyse konnte ebenfalls eine signifikante inverse Korrelation zwischen HDL und HDL-S1P mit dem SOFA-Score detektieren. Darüber hinaus konnte aufgezeigt werden, dass die Wahrscheinlichkeit eines schweren Sepsisverlaufs steigt, wenn HDL und HDL-S1P abfallen (Tab. 12 und Abb. 23). Nun stellt sich erneut die Frage, ob der Abfall des HDL-S1P auf einer verminderten Transportkapazität von S1P bei Patienten mit einem septischen Schock beruht oder ob der Abfall mit einer verminderten Affinität des HDL für S1P zusammenhängt.

HDL werden sowohl anti- als auch proinflammatorische Eigenschaften zugeschrieben. Einerseits besitzen VLDL, LDL und HDL die Funktion, LPS zu binden bzw. zu neutralisieren und dadurch die Immunantwort zu dämpfen, wobei HDL die höchste Bindungskapazität für LPS im Vergleich zu LDL und VLDL besitzt (Levels et al. 2001, Levels et al. 2003). Bei gleichzeitiger Gabe von HDL und LPS wurde die LPS induzierte TNF- α -Freisetzung von Makrophagen reduziert (Chien et al. 2005). Andererseits werden HDL unter bestimmten Umständen proinflammatorische Eigenschaften zugesagt (Ansell et al. 2006). Es kommt zu einer veränderten Zusammensetzung des HDL während einer Sepsis. Das sogenannte „Akut-Phase HDL“ enthält vermehrt Serum Amyloid A und weniger Cholesterol, Apo-A-I und ApoM. Diese veränderte Zusammensetzung beeinträchtigt sowohl die Struktur wie auch die Funktion des HDL und kann eine Inflammation über verschiedenste Wege wie z.B. durch einen erniedrigten RCT, vermehrte vaskuläre Entzündungen und erhöhte LDL-Oxidierung triggern (Tanaka et al. 2020, van Leeuwen et al. 2003, Kumaraswamy et al. 2012, Ansell et al. 2006).

S1P bevorzugt die Bindung von HDL-Partikeln, die einen hohen Anteil von ApoM besitzen. Unter bestimmten Voraussetzungen kann S1P auch an ApoA-4 binden (Kontush et al. 2007, Davidson et al. 2009, Obinata et al. 2019). Während einer Sepsis kommt es zu einer Konzentrationssteigerung der sHDL-Subfraktion, die die größten Mengen an ApoA-4 im Vergleich zu den anderen HDL-Subfraktionen besitzt (Bottcher et al. 2000). ApoM, das spezifische Bindeprotein für S1P in HDL, ist während einer Sepsis reduziert. Der Abfall von ApoM korreliert stark mit der Zunahme proinflammatorischer Marker, wie PCT und CRP (Kumaraswamy et al. 2012). Dies lässt eine veränderte Bindungsaffinität von HDL für S1P aufgrund einer veränderten Zusammensetzung des HDL vermuten. Hier bedarf es jedoch weiterer Forschung, um diese erhöhte Bindungskapazität am Anfang einer Erkrankung von HDL für S1P zu erklären.

Zusammenfassend ist zu betonen, dass HDL am Anfang einer Erkrankung eine erhöhte Affinität besitzt, um S1P zu binden. Diese erhöhte Affinität von HDL inhibiert den initialen Abfall der Gesamt-Plasma S1P Konzentration, welche durch den Verlust von SA-S1P bedingt wäre. Mit steigender Sepsisschwere kommt es jedoch zu einem stetig steigenden Abfall der HDL-Konzentration. Dieser Abfall der Transportkapazität

kann ab einem gewissen Punkt durch die erhöhte Affinität des HDL für S1P nicht mehr kompensiert werden und somit kommt es zu einer signifikanten Reduktion der Gesamt-Plasma S1P-Konzentration. Darüber hinaus sollten aufgrund der multivariaten logistischen Regressionsanalyse HDL sowie HDL-S1P als mögliche Parameter genutzt werden, um den Verlauf einer Sepsis besser zu prognostizieren und somit Patienten mit einem septischen Schock schneller zu identifizieren. Ebenfalls sollte die Substitution von physiologischem HDL bei Patienten mit septischem Schock in Erwägung gezogen werden, da vor allem der Abfall des HDL-S1P eine treibende Kraft von einer Sepsis hin zum septischen Schock zu sein scheint.

5.6 LDL- und VLDL-S1P

In der Literatur gibt es aktuell keine Daten bezüglich des Bindungsortes bzw. des Bindungselements von LDL und VLDL mit S1P. Ebenso sind die spezifischen Funktionen von S1P-LDL und S1P-VLDL und ihr Einfluss auf das Gewebe während einer Inflammation noch nicht weitergehend erforscht und sollten Gegenstand zukünftiger wissenschaftlicher Studien sein. Es konnte lediglich gezeigt werden, dass S1P mit diesen beiden Lipoproteinen im Plasma assoziiert ist (Hammad et al. 2010, Murata et al. 2000). VLDL steigt zunächst mit steigendem CRP- und IL-6- Werten bis es ab einem gewissen Punkt zu einem Abfall der VLDL Konzentration mit weiter steigenden Entzündungsparametern kommt (Jiang et al. 2016). Aufgrund unserer Ergebnisse und dem aktuellen Stand der Literatur lässt sich bezogen auf VLDL und VLDL-S1P vermuten, dass es bei einer Sepsis frühzeitig zu einer geringen Zunahme der VLDL Konzentration kommt. Somit könnte es zu einer erhöhten Transportkapazität für S1P kommen, die zu einer erhöhten VLDL-S1P Konzentration führen könnte. Im Laufe einer Sepsis hin zu einem septischen Schock ist diese erhöhte Transportkapazität aufgrund eines nun eintretenden Konzentrationsabfalls des VLDL nicht mehr vorhanden.

Aufgrund unserer Daten lässt sich allerdings vermuten, dass LDL-S1P und VLDL-S1P eine eher untergeordnete Rolle in der Entwicklung und des Verlaufs einer Sepsis bis hin zum septischen Schock einnehmen und es weiterer Forschungsarbeiten auf diesem Gebiet bedarf, um unsere Vermutungen validieren zu können.

5.7 Auswirkungen eines S1P-Abfalls an seinen Transportproteinen

Ein wesentliches Therapieziel der Sepsis besteht darin, einem Organversagen entgegenzuwirken. Ein Haupt-Pathomechanismus dafür ist der Verlust der vaskulären Integrität. Für die Aufrechterhaltung der vaskulären Integrität spielt S1P eine zentrale Rolle (Lelubre und Vincent 2018).

Experimentelle Studien an septischen Tieren haben gezeigt, dass eine intravenöse Supplementation von S1P in der Lage ist, Sepsis-Symptome wie Lungenödem, Kapillarleckagen und Vasoplegie zu dämpfen (Gazit et al. 2016, Camerer et al. 2009, Oskeritzian et al. 2010, Sanna et al. 2006). Ebenfalls konnten die kapillare Perfusion und renale Funktion durch S1PR1-Agonisten bei septischen Mäusen verbessert und aufrechterhalten werden (Wang et al. 2015). Außerdem wurde gezeigt, dass mittels der Zugabe von S1P die Ausbildung eines pulmonalen Ödems sowie der Verlust der endothelialen Barriere während einer Sepsis gedämpft werden kann (Jacobson und Garcia 2007, Peng et al. 2004). Eine der Funktionen von S1P ist die Stimulation der Lymphozyten-Migration aus den Lymphknoten in die Lymphe und das Blut. Niedrige S1P-Konzentrationen im Plasma könnten die Migration der Lymphozyten aus den sekundären Lymphatischen Organen hemmen (Pappu et al. 2007). Bei septischen Patienten wurde oft eine Lymphopenie festgestellt (Wyllie et al. 2004). S1P, welches an HDL gebunden ist, spielt sowohl bei der Vermittlung der protektiven Eigenschaften von HDL auf die vaskuläre Integrität als auch bei den anti-atherosklerotischen Eigenschaften des HDL eine essentielle Rolle (Okajima 2002, Galvani et al. 2015). HDL kann über die Aktivierung von S1P-Rezeptoren vasoprotektive Moleküle wie z.B. Stickstoffmonoxid (NO) und Prostazykline freisetzen (Rodriguez et al. 2009). HDL-S1P kann in Very Smooth Muscle Cells (VSMC) über den S1PR3 die ROS-Bildung hemmen und somit die MCP-1 Produktion reduzieren. Darüber hinaus führt es über den gleichen Rezeptor zu einer Vasodilatation der Gefäße (Tolle et al. 2008, Nofer et al. 2004). Zusätzlich wurde nachgewiesen, dass eine wichtige Funktion von Albumin – und zwar die Aufrechterhaltung der vaskulären Integrität - auf eine andere Funktion von Albumin – nämlich den Transport von S1P - zurückgeführt werden kann (Adamson et al. 2014). Eine Studie aus dem Jahr 2017 konnte das S1P-bindende ApoM und die Fc-Region von Immunglobulinen als stabiles Fusionsprotein synthetisieren. Mittels dieses Fusionsproteins konnte in Mausmodellen mit verschiedenen Gefäßerkrankungen eine

anhaltende Aktivierung des S1P1-Rezeptors durch ApoM-Fc-gebundenes S1P erreicht werden. Diese Aktivierung des S1P1-Rezeptors führte zu einer Verbesserung der endothelialen Barrierefunktion und hatte zusätzlich keinen Einfluss auf die Lymphozytenzahl (Swendeman et al. 2017).

Somit zeigt sich, dass ein Abfall der HDL-S1P sowie der SA-S1P Konzentration bei septischen Patienten eine bedeutende Rolle in der Entwicklung der Pathophysiologie einer Sepsis einnehmen und der Verlauf einer Sepsis bis hin zum septischen Schock durch den Abfall dieser beiden Analyten getriggert werden kann. Allerdings ist zu betonen, dass aufgrund der Ergebnisse speziell der Abfall der HDL-S1P Konzentration die entscheidende Kraft bezüglich der Entwicklung eines septischen Schocks zu sein scheint. Somit könnten vor allem Patienten mit einem septischen Schock von einer HDL-Substitution profitieren. In Zukunft sollten spezielle Therapiestrategien analysiert, weiterentwickelt und erforscht werden, um HDL anstatt SA bei Patienten mit einem septischen Schock zu supplementieren.

6. Schlussfolgerungen

Sepsis ist weltweit eine der häufigsten Krankheiten, deren medizinische Behandlung mit hohen Kosten verbunden ist. Die Entwicklung neuer therapeutischer Optionen für die Sepsis erfordert ein Verständnis der zugrunde liegenden molekularen Prozesse. Sphingolipide und Proteine des Sphingolipid-Stoffwechsels spielen dabei im Verlauf einer Sepsis eine zentrale Rolle.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Frage analysiert, ob und inwieweit Unterschiede bezogen auf die Gesamt-S1P, VLDL-S1P-, LDL-S1P-, HDL-S1P- und SA-S1P Konzentration bei septischen Patienten detektiert werden können. Die massenspektrometrische Analyse von Plasmaproben unterschiedlicher Patientenkohorten (chirurgische, septische, septischen Schock Patienten) führt zu der zentralen Erkenntnis, dass es signifikante Unterschiede sowohl in der Konzentration als auch in der Verteilung von S1P an seinen unterschiedlichen Transportproteinen (VLDL, LDL, HDL, SA) während einer Sepsis gibt. Im Verlauf einer Sepsis hin zum septischen Schock kommt es zu einem Abfall der Gesamt-S1P-Konzentration im Plasma von Patienten, der mit der Schwere einer Sepsis korreliert. Darüber hinaus ist bei Sepsis ein Konzentrationsabfall einzelner Transportproteine festzustellen. Dabei erfolgt bereits bei einem niedrigen SOFA-Score eine Umverteilung von SA-S1P zu HDL-S1P und in geringerem Maße zu VLDL-S1P. Im Verlauf einer Sepsis hin zum septischen Schock wird der Konzentrationsabfall des Gesamt-S1P signifikant durch den Abfall des HDL-S1P und LDL-S1P bestimmt. Dies könnte unter anderem auf strukturelle Veränderungen der Transportproteine während einer Sepsis hinweisen, die zu Affinitätsänderungen im Hinblick auf S1P führen. Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen vermuten, dass der Abfall des HDL-S1P und HDL als prognostischer Parameter bezüglich der Schwere und der Mortalität einer Sepsis interpretiert werden kann.

Die Ergebnisse dieser Arbeit können einen ersten Hinweis auf die pathophysiologischen Mechanismen während einer Sepsis auf S1P und seine Transportproteine geben. Die gewonnenen Erkenntnisse eröffnen damit neue Ansatzpunkte für weitere Studien in diesem Forschungsgebiet.

Literaturverzeichnis

- Adamson RH, Clark JF, Radeva M, Kheirilomoom A, Ferrara KW, Curry FE. 2014. Albumin modulates S1P delivery from red blood cells in perfused microvessels: mechanism of the protein effect. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 306 (7):H1011-1017.
- Ancellin N, Hla T. 1999. Differential pharmacological properties and signal transduction of the sphingosine 1-phosphate receptors EDG-1, EDG-3, and EDG-5. *J Biol Chem*, 274 (27):18997-19002.
- Ansell BJ, Fonarow GC, Fogelman AM. 2006. High-density lipoprotein: is it always atheroprotective? *Curr Atheroscler Rep*, 8 (5):405-411.
- Baum A, Pohl M, Kreuzsch S, Cumme GA, Ditze G, Misselwitz J, Kiehntopf M, Udby L, Meier-Hellmann A, Rhode H. 2008. Searching biomarker candidates in serum using multidimensional native chromatography. II Method evaluation with Alport syndrome and severe inflammation. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 876 (1):31-40.
- Bloos F, Thomas-Ruddel D, Ruddel H, Engel C, Schwarzkopf D, Marshall JC, Harbarth S, Simon P, Riessen R, Keh D, Dey K, Weiss M, Toussaint S, Schadler D, Weyland A, Ragaller M, Schwarzkopf K, Eiche J, Kuhnle G, Hoyer H, Hartog C, Kaisers U, Reinhart K, Group MS. 2014. Impact of compliance with infection management guidelines on outcome in patients with severe sepsis: a prospective observational multi-center study. *Crit Care*, 18 (2):R42.
- Bloos F, Ruddel H, Thomas-Ruddel D, Schwarzkopf D, Pausch C, Harbarth S, Schreiber T, Grundling M, Marshall J, Simon P, Levy MM, Weiss M, Weyland A, Gerlach H, Schurholz T, Engel C, Matthaus-Kramer C, Scheer C, Bach F, Riessen R, Poidinger B, Dey K, Weiler N, Meier-Hellmann A, Haberle HH, Wobker G, Kaisers UX, Reinhart K, group Ms. 2017. Effect of a multifaceted educational intervention for anti-infectious measures on sepsis mortality: a cluster randomized trial. *Intensive Care Med*, 43 (11):1602-1612.
- Bode C, Graler MH. 2012. Quantification of sphingosine-1-phosphate and related sphingolipids by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Methods Mol Biol*, 874:33-44.

- Bode C, Sensken SC, Peest U, Beutel G, Thol F, Levkau B, Li Z, Bittman R, Huang T, Tolle M, van der Giet M, Graler MH. 2010. Erythrocytes serve as a reservoir for cellular and extracellular sphingosine 1-phosphate. *J Cell Biochem*, 109 (6):1232-1243.
- Boldt J. 2010. Use of albumin: an update. *Br J Anaesth*, 104 (3):276-284.
- Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, Schein RM, Sibbald WJ. 1992. 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*, 101 (6):1644-1655.
- Bottcher A, Schlosser J, Kronenberg F, Dieplinger H, Knipping G, Lackner KJ, Schmitz G. 2000. Preparative free-solution isotachopheresis for separation of human plasma lipoproteins: apolipoprotein and lipid composition of HDL subfractions. *J Lipid Res*, 41 (6):905-915.
- Burstein M, Scholnick HR, Morfin R. 1970. Rapid method for the isolation of lipoproteins from human serum by precipitation with polyanions. *J Lipid Res*, 11 (6):583-595.
- Caironi P, Tognoni G, Masson S, Fumagalli R, Pesenti A, Romero M, Fanizza C, Caspani L, Faenza S, Grasselli G, Iapichino G, Antonelli M, Parrini V, Fiore G, Latini R, Gattinoni L, Investigators AS. 2014. Albumin replacement in patients with severe sepsis or septic shock. *N Engl J Med*, 370 (15):1412-1421.
- Camerer E, Regard JB, Cornelissen I, Srinivasan Y, Duong DN, Palmer D, Pham TH, Wong JS, Pappu R, Coughlin SR. 2009. Sphingosine-1-phosphate in the plasma compartment regulates basal and inflammation-induced vascular leak in mice. *J Clin Invest*, 119 (7):1871-1879.
- Caraceni P, Tufoni M, Bonavita ME. 2013. Clinical use of albumin. *Blood Transfus*, 11 Suppl 4:s18-25.
- Chien JY, Jerng JS, Yu CJ, Yang PC. 2005. Low serum level of high-density lipoprotein cholesterol is a poor prognostic factor for severe sepsis. *Crit Care Med*, 33 (8):1688-1693.
- Chien YF, Chen CY, Hsu CL, Chen KY, Yu CJ. 2015. Decreased serum level of lipoprotein cholesterol is a poor prognostic factor for patients with severe community-acquired pneumonia that required intensive care unit admission. *J Crit Care*, 30 (3):506-510.

- Choi SH, Hong SB, Ko GB, Lee Y, Park HJ, Park SY, Moon SM, Cho OH, Park KH, Chong YP, Kim SH, Huh JW, Sung H, Do KH, Lee SO, Kim MN, Jeong JY, Lim CM, Kim YS, Woo JH, Koh Y. 2012. Viral infection in patients with severe pneumonia requiring intensive care unit admission. *Am J Respir Crit Care Med*, 186 (4):325-332.
- Chou CD, Yien HW, Wu DM, Kuo CD. 2009. Albumin administration in patients with severe sepsis due to secondary peritonitis. *J Chin Med Assoc*, 72 (5):243-250.
- Christoffersen C, Obinata H, Kumaraswamy SB, Galvani S, Ahnstrom J, Sevvana M, Egerer-Sieber C, Muller YA, Hla T, Nielsen LB, Dahlback B. 2011. Endothelium-protective sphingosine-1-phosphate provided by HDL-associated apolipoprotein M. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108 (23):9613-9618.
- Coldewey SM, Benetti E, Collino M, Pfeilschifter J, Sponholz C, Bauer M, Huwiler A, Thiemermann C. 2016. Elevation of serum sphingosine-1-phosphate attenuates impaired cardiac function in experimental sepsis. *Sci Rep*, 6:27594.
- Coskun O. 2016. Separation techniques: Chromatography. *North Clin Istanb*, 3 (2):156-160.
- Cuvillier O, Pirianov G, Kleuser B, Vanek PG, Coso OA, Gutkind S, Spiegel S. 1996. Suppression of ceramide-mediated programmed cell death by sphingosine-1-phosphate. *Nature*, 381 (6585):800-803.
- Davidson WS, Silva RA, Chantepie S, Lagor WR, Chapman MJ, Kontush A. 2009. Proteomic analysis of defined HDL subpopulations reveals particle-specific protein clusters: relevance to antioxidative function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 29 (6):870-876.
- deHoffmann E. 1996. Tandem mass spectrometry: A primer. *Journal of Mass Spectrometry*, 31 (2):129-137.
- Deutsche Sepsis-Hilfe e.V. Häufigkeit von Sepsis <http://sepsis-hilfe.org/de/informationen-zur-sepsis/haeufigkeit.html>.
- Dolin HH, Papadimos TJ, Chen X, Pan ZK. 2019. Characterization of Pathogenic Sepsis Etiologies and Patient Profiles: A Novel Approach to Triage and Treatment. *Microbiol Insights*, 12:1178636118825081.
- Doweiko JP, Nompleggi DJ. 1991a. Role of albumin in human physiology and pathophysiology. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*, 15 (2):207-211.

- Doweiko JP, Nompleggi DJ. 1991b. The role of albumin in human physiology and pathophysiology, Part III: Albumin and disease states. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*, 15 (4):476-483.
- Engel C, Brunkhorst FM, Bone HG, Brunkhorst R, Gerlach H, Grond S, Gruendling M, Huhle G, Jaschinski U, John S, Mayer K, Oppert M, Olthoff D, Quintel M, Ragaller M, Rossaint R, Stuber F, Weiler N, Welte T, Bogatsch H, Hartog C, Loeffler M, Reinhart K. 2007. Epidemiology of sepsis in Germany: results from a national prospective multicenter study. *Intensive Care Med*, 33 (4):606-618.
- Fanali G, di Masi A, Trezza V, Marino M, Fasano M, Ascenzi P. 2012. Human serum albumin: from bench to bedside. *Mol Aspects Med*, 33 (3):209-290.
- Feingold KR, Grunfeld C. 2000. Introduction to Lipids and Lipoproteins. In: Feingold KR, Anawalt B, Boyce A, Chrousos G, Dungan K, Grossman A, Hershman JM, Kaltsas G, Koch C, Kopp P, Korbonits M, McLachlan R, Morley JE, New M, Perreault L, Purnell J, Rebar R, Singer F, Trencle DL, Vinik A, Wilson DP, Hrsg. *Endotext*. South Dartmouth (MA).
- Fleischmann C, Scherag A, Adhikari NK, Hartog CS, Tsaganos T, Schlattmann P, Angus DC, Reinhart K, International Forum of Acute Care T. 2016. Assessment of Global Incidence and Mortality of Hospital-treated Sepsis. Current Estimates and Limitations. *Am J Respir Crit Care Med*, 193 (3):259-272.
- Frej C, Linder A, Happonen KE, Taylor FB, Lupu F, Dahlback B. 2016. Sphingosine 1-phosphate and its carrier apolipoprotein M in human sepsis and in *Escherichia coli* sepsis in baboons. *J Cell Mol Med*, 20 (6):1170-1181.
- Galvani S, Sanson M, Blaho VA, Swendeman SL, Obinata H, Conger H, Dahlback B, Kono M, Proia RL, Smith JD, Hla T. 2015. HDL-bound sphingosine 1-phosphate acts as a biased agonist for the endothelial cell receptor S1P1 to limit vascular inflammation. *Sci Signal*, 8 (389):ra79.
- Garcia JG, Liu F, Verin AD, Birukova A, Dechert MA, Gerthoffer WT, Bamberg JR, English D. 2001. Sphingosine 1-phosphate promotes endothelial cell barrier integrity by Edg-dependent cytoskeletal rearrangement. *J Clin Invest*, 108 (5):689-701.
- Gatta A, Verardo A, Bolognesi M. 2012. Hypoalbuminemia. *Intern Emerg Med*, 7 Suppl 3:S193-199.

- Gault CR, Obeid LM, Hannun YA. 2010. An overview of sphingolipid metabolism: from synthesis to breakdown. *Adv Exp Med Biol*, 688:1-23.
- Gazit SL, Mariko B, Therond P, Decouture B, Xiong Y, Couty L, Bonnin P, Baudrie V, Le Gall SM, Dizier B, Zoghiani N, Ransinan J, Hamilton JR, Gaussem P, Tharaux PL, Chun J, Coughlin SR, Bachelot-Loza C, Hla T, Ho-Tin-Noe B, Camerer E. 2016. Platelet and Erythrocyte Sources of S1P Are Redundant for Vascular Development and Homeostasis, but Both Rendered Essential After Plasma S1P Depletion in Anaphylactic Shock. *Circ Res*, 119 (8):e110-126.
- Ghosh TK, Bian J, Gill DL. 1990. Intracellular calcium release mediated by sphingosine derivatives generated in cells. *Science*, 248 (4963):1653-1656.
- Gibbons GF. 1990. Assembly and secretion of hepatic very-low-density lipoprotein. *Biochem J*, 268 (1):1-13.
- Goldwasser P, Feldman J. 1997. Association of serum albumin and mortality risk. *J Clin Epidemiol*, 50 (6):693-703.
- Graler MH, Bernhardt G, Lipp M. 1998. EDG6, a novel G-protein-coupled receptor related to receptors for bioactive lysophospholipids, is specifically expressed in lymphoid tissue. *Genomics*, 53 (2):164-169.
- Gross JH. 2011. *Massenspektrometrie Ein Lehrbuch*. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag.
- Gruffat D, Durand D, Graulet B, Bauchart D. 1996. Regulation of VLDL synthesis and secretion in the liver. *Reprod Nutr Dev*, 36 (4):375-389.
- Gyawali B, Ramakrishna K, Dharmoon AS. 2019. Sepsis: The evolution in definition, pathophysiology, and management. *SAGE Open Med*, 7:2050312119835043.
- Hammad SM, Pierce JS, Soodavar F, Smith KJ, Al Gadban MM, Rembiesa B, Klein RL, Hannun YA, Bielawski J, Bielawska A. 2010. Blood sphingolipidomics in healthy humans: impact of sample collection methodology. *J Lipid Res*, 51 (10):3074-3087.
- Hanel P, Andreani P, Graler MH. 2007. Erythrocytes store and release sphingosine 1-phosphate in blood. *FASEB J*, 21 (4):1202-1209.
- Hannun YA, Loomis CR, Merrill AH, Jr., Bell RM. 1986. Sphingosine inhibition of protein kinase C activity and of phorbol dibutyrate binding in vitro and in human platelets. *J Biol Chem*, 261 (27):12604-12609.
- He XM, Carter DC. 1992. Atomic structure and chemistry of human serum albumin. *Nature*, 358 (6383):209-215.

- Im DS, Heise CE, Ancellin N, O'Dowd BF, Shei GJ, Heavens RP, Rigby MR, Hla T, Mandala S, McAllister G, George SR, Lynch KR. 2000. Characterization of a novel sphingosine 1-phosphate receptor, Edg-8. *J Biol Chem*, 275 (19):14281-14286.
- Jacobson JR, Garcia JG. 2007. Novel therapies for microvascular permeability in sepsis. *Curr Drug Targets*, 8 (4):509-514.
- Jiang ZG, de Boer IH, Mackey RH, Jensen MK, Lai M, Robson SC, Tracy R, Kuller LH, Mukamal KJ. 2016. Associations of insulin resistance, inflammation and liver synthetic function with very low-density lipoprotein: The Cardiovascular Health Study. *Metabolism*, 65 (3):92-99.
- Kendall H, Abreu E, Cheng AL. 2019. Serum Albumin Trend Is a Predictor of Mortality in ICU Patients With Sepsis. *Biol Res Nurs*, 21 (3):237-244.
- Kontush A, Lindahl M, Lhomme M, Calabresi L, Chapman MJ, Davidson WS. 2015. Structure of HDL: particle subclasses and molecular components. *Handb Exp Pharmacol*, 224:3-51.
- Kontush A, Therond P, Zerrad A, Couturier M, Negre-Salvayre A, de Souza JA, Chantepie S, Chapman MJ. 2007. Preferential sphingosine-1-phosphate enrichment and sphingomyelin depletion are key features of small dense HDL3 particles: relevance to antiapoptotic and antioxidative activities. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 27 (8):1843-1849.
- Ksiazek M, Chacinska M, Chabowski A, Baranowski M. 2015. Sources, metabolism, and regulation of circulating sphingosine-1-phosphate. *J Lipid Res*, 56 (7):1271-1281.
- Kumaraswamy SB, Linder A, Akesson P, Dahlback B. 2012. Decreased plasma concentrations of apolipoprotein M in sepsis and systemic inflammatory response syndromes. *Crit Care*, 16 (2):R60.
- Lee MJ, Van Brocklyn JR, Thangada S, Liu CH, Hand AR, Menzeleev R, Spiegel S, Hla T. 1998. Sphingosine-1-phosphate as a ligand for the G protein-coupled receptor EDG-1. *Science*, 279 (5356):1552-1555.
- Lee MJ, Thangada S, Claffey KP, Ancellin N, Liu CH, Kluk M, Volpi M, Sha'afi RI, Hla T. 1999. Vascular endothelial cell adherens junction assembly and morphogenesis induced by sphingosine-1-phosphate. *Cell*, 99 (3):301-312.
- Lelubre C, Vincent JL. 2018. Mechanisms and treatment of organ failure in sepsis. *Nat Rev Nephrol*, 14 (7):417-427.

- Levels JH, Abraham PR, van den Ende A, van Deventer SJ. 2001. Distribution and kinetics of lipoprotein-bound endotoxin. *Infect Immun*, 69 (5):2821-2828.
- Levels JH, Abraham PR, van Barreveld EP, Meijers JC, van Deventer SJ. 2003. Distribution and kinetics of lipoprotein-bound lipoteichoic acid. *Infect Immun*, 71 (6):3280-3284.
- Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, Cohen J, Opal SM, Vincent JL, Ramsay G, International Sepsis Definitions C. 2003. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Intensive Care Med*, 29 (4):530-538.
- Lewis GF, Rader DJ. 2005. New insights into the regulation of HDL metabolism and reverse cholesterol transport. *Circ Res*, 96 (12):1221-1232.
- Liu SH, Liang HY, Li HY, Ding XF, Sun TW, Wang J. 2020. Effect of low high-density lipoprotein levels on mortality of septic patients: A systematic review and meta-analysis of cohort studies. *World J Emerg Med*, 11 (2):109-116.
- Mansbach CM, Siddiqi SA. 2010. The biogenesis of chylomicrons. *Annu Rev Physiol*, 72:315-333.
- Margarson MP, Soni NC. 2002. Effects of albumin supplementation on microvascular permeability in septic patients. *J Appl Physiol* (1985), 92 (5):2139-2145.
- Meloun B, Moravek L, Kostka V. 1975. Complete amino acid sequence of human serum albumin. *FEBS Lett*, 58 (1):134-137.
- Mineo C, Deguchi H, Griffin JH, Shaul PW. 2006. Endothelial and antithrombotic actions of HDL. *Circ Res*, 98 (11):1352-1364.
- Mishima Y, Kurano M, Kobayashi T, Nishikawa M, Ohkawa R, Tozuka M, Yatomi Y. 2018. Dihydro-sphingosine 1-phosphate interacts with carrier proteins in a manner distinct from that of sphingosine 1-phosphate. *Biosci Rep*, 38 (5).
- Murata N, Sato K, Kon J, Tomura H, Yanagita M, Kuwabara A, Ui M, Okajima F. 2000. Interaction of sphingosine 1-phosphate with plasma components, including lipoproteins, regulates the lipid receptor-mediated actions. *Biochem J*, 352 Pt 3:809-815.
- Murch O, Collin M, Hinds CJ, Thiemermann C. 2007. Lipoproteins in inflammation and sepsis. I. Basic science. *Intensive Care Med*, 33 (1):13-24.
- Nofer JR, van der Giet M, Tolle M, Wolinska I, von Wnuck Lipinski K, Baba HA, Tietge UJ, Godecke A, Ishii I, Kleuser B, Schafers M, Fobker M, Zidek W, Assmann G, Chun J, Levkau B. 2004. HDL induces NO-dependent

- vasorelaxation via the lysophospholipid receptor S1P3. *J Clin Invest*, 113 (4):569-581.
- Obinata H, Hla T. 2019. Sphingosine 1-phosphate and inflammation. *Int Immunol*, 31 (9):617-625.
- Obinata H, Kuo A, Wada Y, Swendeman S, Liu CH, Blaho VA, Nagumo R, Satoh K, Izumi T, Hla T. 2019. Identification of ApoA4 as a sphingosine 1-phosphate chaperone in ApoM- and albumin-deficient mice. *J Lipid Res*, 60 (11):1912-1921.
- Oettl K, Birner-Gruenberger R, Spindelboeck W, Stueger HP, Dorn L, Stadlbauer V, Putz-Bankuti C, Krisper P, Graziadei I, Vogel W, Lackner C, Stauber RE. 2013. Oxidative albumin damage in chronic liver failure: relation to albumin binding capacity, liver dysfunction and survival. *J Hepatol*, 59 (5):978-983.
- Okajima F. 2002. Plasma lipoproteins behave as carriers of extracellular sphingosine 1-phosphate: is this an atherogenic mediator or an anti-atherogenic mediator? *Biochim Biophys Acta*, 1582 (1-3):132-137.
- Olivera A, Spiegel S. 1993. Sphingosine-1-phosphate as second messenger in cell proliferation induced by PDGF and FCS mitogens. *Nature*, 365 (6446):557-560.
- Olivera A, Kohama T, Edsall L, Nava V, Cuvillier O, Poulton S, Spiegel S. 1999. Sphingosine kinase expression increases intracellular sphingosine-1-phosphate and promotes cell growth and survival. *J Cell Biol*, 147 (3):545-558.
- Oskeritzian CA, Price MM, Hait NC, Kapitonov D, Falanga YT, Morales JK, Ryan JJ, Milstien S, Spiegel S. 2010. Essential roles of sphingosine-1-phosphate receptor 2 in human mast cell activation, anaphylaxis, and pulmonary edema. *J Exp Med*, 207 (3):465-474.
- Pappu R, Schwab SR, Cornelissen I, Pereira JP, Regard JB, Xu Y, Camerer E, Zheng YW, Huang Y, Cyster JG, Coughlin SR. 2007. Promotion of lymphocyte egress into blood and lymph by distinct sources of sphingosine-1-phosphate. *Science*, 316 (5822):295-298.
- Peng X, Hassoun PM, Sammani S, McVerry BJ, Burne MJ, Rabb H, Pearse D, Tuder RM, Garcia JG. 2004. Protective effects of sphingosine 1-phosphate in murine endotoxin-induced inflammatory lung injury. *Am J Respir Crit Care Med*, 169 (11):1245-1251.

- Peters TJ. 1995. All about Albumin: Biochemistry, Genetics, and Medical Applications San Diego, CA, USA: Elsevier Inc.
- Phua J, Ngerng W, See K, Tay C, Kiong T, Lim H, Chew M, Yip H, Tan A, Khalizah H, Capistrano R, Lee K, Mukhopadhyay A. 2013. Characteristics and outcomes of culture-negative versus culture-positive severe sepsis. *Crit Care*, 17 (5):R202.
- Rhode H, Muckova P, Buchler R, Wendler S, Tautkus B, Vogel M, Moore T, Grosskreutz J, Klemm A, Nabity M. 2019. A next generation setup for pre-fractionation of non-denatured proteins reveals diverse albumin proteoforms each carrying several post-translational modifications. *Sci Rep*, 9 (1):11733.
- Rodriguez C, Gonzalez-Diez M, Badimon L, Martinez-Gonzalez J. 2009. Sphingosine-1-phosphate: A bioactive lipid that confers high-density lipoprotein with vasculoprotection mediated by nitric oxide and prostacyclin. *Thrombosis and Haemostasis*, 101 (4):665-673.
- Ryan AM, Hearty A, Prichard RS, Cunningham A, Rowley SP, Reynolds JV. 2007. Association of hypoalbuminemia on the first postoperative day and complications following esophagectomy. *J Gastrointest Surg*, 11 (10):1355-1360.
- Sanchez T, Hla T. 2004. Structural and functional characteristics of S1P receptors. *J Cell Biochem*, 92 (5):913-922.
- Sanna MG, Wang SK, Gonzalez-Cabrera PJ, Don A, Marsolais D, Matheu MP, Wei SH, Parker I, Jo E, Cheng WC, Cahalan MD, Wong CH, Rosen H. 2006. Enhancement of capillary leakage and restoration of lymphocyte egress by a chiral S1P1 antagonist in vivo. *Nat Chem Biol*, 2 (8):434-441.
- Schwab SR, Cyster JG. 2007. Finding a way out: lymphocyte egress from lymphoid organs. *Nat Immunol*, 8 (12):1295-1301.
- SepNet Critical Care Trials G. 2016. Incidence of severe sepsis and septic shock in German intensive care units: the prospective, multicentre INSEP study. *Intensive Care Med*, 42 (12):1980-1989.
- Shor R, Wainstein J, Oz D, Boaz M, Matas Z, Fux A, Halabe A. 2007. Low serum LDL cholesterol levels and the risk of fever, sepsis, and malignancy. *Ann Clin Lab Sci*, 37 (4):343-348.

- Shor R, Wainstein J, Oz D, Boaz M, Matas Z, Fux A, Halabe A. 2008. Low HDL levels and the risk of death, sepsis and malignancy. *Clin Res Cardiol*, 97 (4):227-233.
- Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, Bellomo R, Bernard GR, Chiche JD, Coopersmith CM, Hotchkiss RS, Levy MM, Marshall JC, Martin GS, Opal SM, Rubenfeld GD, van der Poll T, Vincent JL, Angus DC. 2016. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA*, 315 (8):801-810.
- Spiegel S, Milstien S. 1995. Sphingolipid metabolites: members of a new class of lipid second messengers. *J Membr Biol*, 146 (3):225-237.
- Sugio S, Kashima A, Mochizuki S, Noda M, Kobayashi K. 1999. Crystal structure of human serum albumin at 2.5 Å resolution. *Protein Eng*, 12 (6):439-446.
- Swendeman SL, Xiong Y, Cantalupo A, Yuan H, Burg N, Hisano Y, Cartier A, Liu CH, Engelbrecht E, Blaho V, Zhang Y, Yanagida K, Galvani S, Obinata H, Salmon JE, Sanchez T, Di Lorenzo A, Hla T. 2017. An engineered S1P chaperone attenuates hypertension and ischemic injury. *Sci Signal*, 10 (492).
- Tabah A, Koulenti D, Laupland K, Misset B, Valles J, Bruzzi de Carvalho F, Paiva JA, Cakar N, Ma X, Eggimann P, Antonelli M, Bonten MJ, Csomos A, Krueger WA, Mikstacki A, Lipman J, Depuydt P, Vesin A, Garrouste-Orgeas M, Zahar JR, Blot S, Carlet J, Brun-Buisson C, Martin C, Rello J, Dimopoulos G, Timsit JF. 2012. Characteristics and determinants of outcome of hospital-acquired bloodstream infections in intensive care units: the EUROBACT International Cohort Study. *Intensive Care Med*, 38 (12):1930-1945.
- Tailleux A, Fruchart JC. 1996. HDL heterogeneity and atherosclerosis. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 33 (3):163-201.
- Tanaka S, Couret D, Tran-Dinh A, Duranteau J, Montravers P, Schwendeman A, Meilhac O. 2020. High-density lipoproteins during sepsis: from bench to bedside. *Crit Care*, 24 (1):134.
- Thomas-Ruddel DO, Poidinger B, Kott M, Weiss M, Reinhart K, Bloos F, group Ms. 2018. Influence of pathogen and focus of infection on procalcitonin values in sepsis patients with bacteremia or candidemia. *Crit Care*, 22 (1):128.
- Thudichum JLW, Hrsg. 1884. A treatise on the chemical constitution of the brain : based throughout upon original researches. London: Bailliere, Tindall, and Cox.

- Tiwari S, Siddiqi SA. 2012. Intracellular trafficking and secretion of VLDL. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 32 (5):1079-1086.
- Tolle M, Pawlak A, Schuchardt M, Kawamura A, Tietge UJ, Lorkowski S, Keul P, Assmann G, Chun J, Levkau B, van der Giet M, Nofer JR. 2008. HDL-associated lysosphingolipids inhibit NAD(P)H oxidase-dependent monocyte chemoattractant protein-1 production. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 28 (8):1542-1548.
- Trafkowski J. 2008. Anwendungen der HPLC-Triple Quadrupol Massenspektrometrie in der forensischen und klinischen Toxikologie bei der Analytik von Opioiden [Dissertation]. bonndoc.uln.uni-bonn: Rheinischen Friedrich-Wilhelms- Universität Bonn.
- Ueda M, Endo I, Nakashima M, Minami Y, Takeda K, Matsuo K, Nagano Y, Tanaka K, Ichikawa Y, Togo S, Kunisaki C, Shimada H. 2009. Prognostic factors after resection of pancreatic cancer. *World J Surg*, 33 (1):104-110.
- van Leeuwen HJ, Heezius EC, Dallinga GM, van Strijp JA, Verhoef J, van Kessel KP. 2003. Lipoprotein metabolism in patients with severe sepsis. *Crit Care Med*, 31 (5):1359-1366.
- Venkataraman K, Lee YM, Michaud J, Thangada S, Ai Y, Bonkovsky HL, Parikh NS, Habrukowich C, Hla T. 2008. Vascular endothelium as a contributor of plasma sphingosine 1-phosphate. *Circ Res*, 102 (6):669-676.
- Vincent JL, Dubois MJ, Navickis RJ, Wilkes MM. 2003. Hypoalbuminemia in acute illness: is there a rationale for intervention? A meta-analysis of cohort studies and controlled trials. *Ann Surg*, 237 (3):319-334.
- Vincent JL, Sakr Y, Sprung CL, Ranieri VM, Reinhart K, Gerlach H, Moreno R, Carlet J, Le Gall JR, Payen D, Sepsis Occurrence in Acutely Ill Patients I. 2006. Sepsis in European intensive care units: results of the SOAP study. *Crit Care Med*, 34 (2):344-353.
- Vincent JL, Rello J, Marshall J, Silva E, Anzueto A, Martin CD, Moreno R, Lipman J, Gomersall C, Sakr Y, Reinhart K, Investigators EICo. 2009. International study of the prevalence and outcomes of infection in intensive care units. *JAMA*, 302 (21):2323-2329.
- Wang Z, Sims CR, Patil NK, Gokden N, Mayeux PR. 2015. Pharmacologic targeting of sphingosine-1-phosphate receptor 1 improves the renal microcirculation during sepsis in the mouse. *J Pharmacol Exp Ther*, 352 (1):61-66.

- Winkler MS, Martz KB, Nierhaus A, Daum G, Schwedhelm E, Kluge S, Graler MH. 2019. Loss of sphingosine 1-phosphate (S1P) in septic shock is predominantly caused by decreased levels of high-density lipoproteins (HDL). *J Intensive Care*, 7:23.
- Winkler MS, Nierhaus A, Holzmann M, Mudersbach E, Bauer A, Robbe L, Zahrte C, Geffken M, Peine S, Schwedhelm E, Daum G, Kluge S, Zoellner C. 2015. Decreased serum concentrations of sphingosine-1-phosphate in sepsis. *Crit Care*, 19:372.
- Winkler MS, Kluge S, Holzmann M, Moritz E, Robbe L, Bauer A, Zahrte C, Prießler M, Schwedhelm E, Boger RH, Goetz AE, Nierhaus A, Zoellner C. 2017. Markers of nitric oxide are associated with sepsis severity: an observational study. *Crit Care*, 21 (1):189.
- Wyllie DH, Bowler IC, Peto TE. 2004. Relation between lymphopenia and bacteraemia in UK adults with medical emergencies. *J Clin Pathol*, 57 (9):950-955.
- Yang CY, Chen SH, Gianturco SH, Bradley WA, Sparrow JT, Tanimura M, Li WH, Sparrow DA, DeLoof H, Rosseneu M, et al. 1986. Sequence, structure, receptor-binding domains and internal repeats of human apolipoprotein B-100. *Nature*, 323 (6090):738-742.
- Yatomi Y, Ruan F, Hakomori S, Igarashi Y. 1995. Sphingosine-1-phosphate: a platelet-activating sphingolipid released from agonist-stimulated human platelets. *Blood*, 86 (1):193-202.
- Yatomi Y, Igarashi Y, Yang L, Hisano N, Qi R, Asazuma N, Satoh K, Ozaki Y, Kume S. 1997. Sphingosine 1-phosphate, a bioactive sphingolipid abundantly stored in platelets, is a normal constituent of human plasma and serum. *J Biochem*, 121 (5):969-973.
- Yin M, Si L, Qin W, Li C, Zhang J, Yang H, Han H, Zhang F, Ding S, Zhou M, Wu D, Chen X, Wang H. 2018. Predictive Value of Serum Albumin Level for the Prognosis of Severe Sepsis Without Exogenous Human Albumin Administration: A Prospective Cohort Study. *J Intensive Care Med*, 33 (12):687-694.
- Yusef D, Shalakhti T, Awad S, Algharaibeh H, Khasawneh W. 2017. Clinical characteristics and epidemiology of sepsis in the neonatal intensive care unit

- in the era of multi-drug resistant organisms: A retrospective review. *Pediatr Neonatol*.
- Zhang B, Tomura H, Kuwabara A, Kimura T, Miura S, Noda K, Okajima F, Saku K. 2005. Correlation of high density lipoprotein (HDL)-associated sphingosine 1-phosphate with serum levels of HDL-cholesterol and apolipoproteins. *Atherosclerosis*, 178 (1):199-205.
- Zhang H, Buckley NE, Gibson K, Spiegel S. 1990. Sphingosine stimulates cellular proliferation via a protein kinase C-independent pathway. *J Biol Chem*, 265 (1):76-81.
- Zhang H, Desai NN, Olivera A, Seki T, Brooker G, Spiegel S. 1991. Sphingosine-1-phosphate, a novel lipid, involved in cellular proliferation. *J Cell Biol*, 114 (1):155-167.
- Zhou F, Yu T, Du R, Fan G, Liu Y, Liu Z, Xiang J, Wang Y, Song B, Gu X, Guan L, Wei Y, Li H, Wu X, Xu J, Tu S, Zhang Y, Chen H, Cao B. 2020. Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. *Lancet*, 395 (10229):1054-1062.
- Zhou L, Li C, Gao L, Wang A. 2015. High-density lipoprotein synthesis and metabolism (Review). *Mol Med Rep*, 12 (3):4015-4021.

Verzeichnis der Abbildungen

- Abb. 1: Ursachen einer Sepsis im Überblick
- Abb. 2: Pathophysiologie einer Sepsis im Überblick
- Abb. 3: Chemische Struktur von S1P
- Abb. 4: De-Novo Synthese und Degradierung von Sphingosin 1-Phosphat
- Abb. 5: Übersicht über die Signaltransduktion von S1P
- Abb. 6: Grundstruktur eines Lipoproteins
- Abb. 7: 3D Struktur von Albumin (Fanali et al. 2012)
- Abb. 8: Wissenschaftliche Fragestellung im Überblick
- Abb. 9: Die Studienpopulationen 2015 und 2017 im Überblick
- Abb. 10: Lipoprotein-Fällung im Überblick
- Abb. 11: Übersicht der Flüssigkeits-Chromatographie (Trafkowski 2008)
- Abb. 12: Generelle schematische Darstellung eines Massenspektrometers (Gross 2011)
- Abb. 13: Vereinfachte Darstellung der Erzeugung eines Ionenstrahls mittels ESI (Gross 2011)
- Abb. 14: Schematischer Aufbau eines Triple Quadrupol Tandem Massenspektrometers (Gross 2011)
- Abb. 15: Durchführung der Massenspektrometrie im Überblick
- Abb. 16: Transfer von organischer Phase in ein neues Glasröhrchen mittels einer Glas-Pasteur Pipette
- Abb. 17: Die Plasma S1P-Konzentration fällt signifikant in Patienten mit einem septischen Schock oder einem SOFA-Score ≥ 8 .
- Abb. 18: Die Plasma S1P-Konzentration fällt signifikant in Patienten mit einem septischen Schock. Es kommt zu einem frühzeitigen Verlust des SA-S1P. Im Verlauf hin zum septischen Schock fällt die HDL- und LDL-S1P Konzentration.
- Abb. 19: Die Plasma S1P-Konzentration fällt signifikant in Patienten mit einem SOFA Score ≥ 8 . Es kommt zu einem frühzeitigen Verlust des SA-S1P. Im Verlauf hin zu einem hohen SOFA-Score fällt die HDL- und LDL-S1P Konzentration.

Abb. 20: Prozentuale Umverteilung innerhalb des Gesamt-Plasma S1P von SA zu HDL und VLDL im Verlauf einer Sepsis hin zum septischen Schock

Abb. 21: LDL-S1P, HDL-, HDL-S1P- und SA-S1P-Werte zeigen eine inverse Korrelation mit dem SOFA-Score.

Abb. 22: Mit steigendem SOFA Score enthalten HDL und LDL mehr S1P pro Gewichtseinheit HDL und LDL und weniger S1P pro Gewichtseinheit SA.

Abb. 23: Signifikante inverse Korrelation von Gesamt-Plasma S1P, HDL-S1P, SA-S1P und LDL-S1P mit dem SOFA-Score

Abb. 24: Signifikanter Abfall des HDL-S1P und LDL-S1P bei den verstorbenen Patienten im Vergleich zu den überlebenden Patienten bei Sepsis und bei einem septischen Schock

Abb. 25: Konzentrations- und Verteilungsänderung von S1P an seinen Transportproteinen im Verlauf einer Sepsis

Verzeichnis der Tabellen

Tab. 1: SOFA-Score

Tab. 2: Quick SOFA-Score

Tab. 3: Übersicht über die Charakteristika der wichtigsten Lipoproteine (in Anlehnung an Feingold und Grunfeld 2000)

Tab. 4: Grundlagenmaterial im Überblick

Tab. 5: Verbrauchsmaterial im Überblick

Tab. 6: Verwendete Chemikalien im Überblick

Tab. 7: Verwendete Software-Programme im Überblick

Tab. 8: Massenübergänge und die typische Retentionszeit für S1P

Tab. 9: Demographische Daten der Studienkohorte

Tab. 10: Plasma S1P Konzentration an seinen unterschiedlichen Transportproteinen bezogen auf die Patientengruppen (Chirurgie, Sepsis, Septischer Schock) und SOFA-Score (≤ 3 , 4-7, ≥ 8)

Tab. 11: Konzentrationsveränderungen der Transportproteine (LDL, HDL, SA) bezogen auf den SOFA Score

Tab. 12: Die multivariate logistische Regression zeigt HDL-S1P zusammen mit HDL als stärkste und signifikanteste Prädiktoren für den Sepsis-Schweregrad in diesem Modell.

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,
dass ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,
dass mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Prof. Dr. Markus Gräler und Dr. med. Martin Sebastian Winkler,
dass die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,
dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und
dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Stuttgart, den

Konstantin B. März

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Professor Dr. Markus Gräler, der den Anstoß zu dieser Untersuchung gab und die Arbeit mit wertvollen Anregungen und kritischen Hinweisen jederzeit förderte. Ebenso danke ich Dr. med. Martin Sebastian Winkler für seine Unterstützung bei der Anfertigung dieser Dissertation.

Auch möchte ich mich bei allen Mitarbeitern der AG Gräler für die freundliche Zusammenarbeit, für die vielfältige Unterstützung und für die angenehme Atmosphäre bedanken, die es mir sehr erleichtert haben, diese wissenschaftliche Untersuchung durchzuführen.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern für ihre uneingeschränkte Unterstützung, mit der sie mir das Medizinstudium und damit auch das Verfassen dieser Dissertation ermöglichten. Meinen Geschwistern Alexandra und Oliver und meiner Freundin Réka danke ich für ihre direkte und indirekte Unterstützung, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Konstantin B. März