Einfluss einer ω-3- versus ω-6-Lipidemulsion auf Fettsäureprofil, inflammatorische Mediatoren und klinische Parameter septischer Patienten

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

des Fachbereiches Humanmedizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Christine Fegbeutel
aus Bad Nauheim

Gießen 2004

Aus dem Zentrum für Innere Medizin
Medizinische Klinik und Poliklinik II
Direktor: Prof. Dr. med. W. Seeger
des Universitätsklinikums Gießen

Betreuer: Dr. med. K. Mayer
Gutachter: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. F. Grimminger
Gutachter: PD Dr. med. Th. Menges

Tag der Disputation: 03.02.2005

Meinen Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

1. VORWORT **1**

2. EINLEITUNG **2-49**

2.1. Sepsis und septischer Schock als ungesteuerte inflammatorische Antwort des menschlichen Organismus auf die Konfrontation mit Keimen und Toxinen - Definition und Pathophysiologie **2-8**

2.2. Wirkung bakterieller Toxine und anderer bakterieller Produkte **8-10**

2.3. Zirkulierende humorale Effektoren der Immunantwort in der Sepsis **11-13**

2.3.1. Das Komplement-System 11

2.3.2. Die Gerinnungskaskade 12-13

2.4. Zirkulierende zelluläre Komponenten der Immunantwort und ihre Mediatoren in der Sepsis **14-38**

2.4.1. Mononukläre Zellen 14-18

2.4.1.1. Proinflammatorische Zytokine 15-17

2.4.1.2. Antiinflammatorische Zytokine 18

2.4.2. Neutrophile Granulozyten 18-35

2.4.2.1. Chemotaxis und Transmigration 19-20

2.4.2.2. Phagozytose 21

2.4.2.3. Degranulierung 21-22

2.4.2.4. Produktion reaktiver Sauerstoffspezies - „respiratorischer Burst" 23-24

2.4.2.5. Lipidmediatoren 24-31

2.4.2.5.1. Oxygenierungsprodukte der Arachidonsäure - Lipoxygenase-Metabolite

2.4.2.5.2. Plättchen-aktivierender Faktor

2.4.2.6. Zellaktivierung und „second messenger-generation”: Bildung von Inositolphosphaten 32-35

2.4.3. Thrombozytäre Reaktion und die Auswirkung der Cyclooxygenase-Produkte auf die Mikrozirkulation in der Sepsis 35-38

2.5. Ortsständige zelluläre Komponenten der Immunantwort in der Sepsis 38-39

2.5.1. Die Rolle der Endothelzellen 38-39

2.5.2. Die Rolle der Makrophagen 39

2.6. ω-6- und ω-3-Fettsäuren und ihre Beeinflussung der inflammatorischen Antwort 41-48

2.6.1. Übersicht 40-46

2.6.2. Freisetzung von Fettsäuren 46-47

2.6.2.1. Freisetzung aus Membranfettsäuren 47

2.6.2.2. Freisetzung aus Infusionen 47

2.6.3. Rolle der extrazellulären freien Fettsäuren 47

2.6.4. Grundlagen einer immunmodulatorischen Therapie mit ω-3-Lipiden 48

2.7. Fragestellung 49

3. METHODIK 50-74

3.1. Studienprotokoll 50-57

3.1.1. Patientenpopulation 50-53

3.1.1.1. Einschlusskriterien 50-52

3.1.1.2. Ausschlusskriterien 52-53

3.1.2. Dokumentation des klinischen Verlaufs 54-55

3.1.3. Studienmedikation 55-56

3.1.4. Blutentnahme 56

3.1.5. Kontrollgruppe 56-57

3.2. Isolation der Blutzellen und Gewinnung von Plasma **57-58**
3.2.1. Granulozyten 57-58
3.2.2. Thrombozyten 58
3.2.3. Plasma 58

3.3. Granulozytäre Funktionsparameter **59-69**
3.3.1. Versuchsprotokolle 59
3.3.2. Degranulierung 59-60
3.3.3. Bildung von reaktiven Sauerstoffradikalen – „respiratorischer Burst" 60
3.3.4. Phosphatidylinositol-Metabolismus 61-62
3.3.5. Analytik der Lipoxygenase-Produkte von AA und EPA 62-67
3.3.5.1. Festphasen-Extraktion 62-63
3.3.5.2. HPLC-Analytik 63-67
3.3.6. Plättchen-aktivierender Faktor 67-69

3.4. Thrombozytäre Funktionsparameter: Analytik der Cyclooxygenase-Produkte von AA und EPA **69-71**
3.4.1. Standardprotokoll der Thrombozytenstimulation 69
3.4.2. Festphasen-Extraktion 69-70
3.4.3. Reversed-Phase-HPLC 70
3.4.4. Post-HPLC-ELISA 70-71

3.5. Charakterisierung von freien Fettsäuren im Plasma **72-73**
3.5.1. Extraktion und Methylierung 72
3.5.2. Gaschromatographie 72-73

3.6. Statistik **74**

4. MATERIAL **75-80**

4.1. Inkubationsmedien und Agenzien der Zellisolation **75**
4.2. Experimentelle Agenzien und Pharmaka **76**

4.3. Elastase-Messung **76**
4.4. Materialien zur Analytik der Inositolphosphate **76-77**
4.5. HPLC-Materialien **77-78**
4.6. Agenzien zur PAF-Analytik **78**
4.7. Agenzien zur Analyse der Cyclooxygenase-Metabolite **78**
4.8. Gaschromatographie-Materialien **78**
4.9. Authentische Standards **79-80**
4.9.1. Lipoxygenase-Produkte
4.9.2. Cyclooxygenase-Produkte
4.9.3. Fettsäuren und Fettsäuremethylester
4.10. Geräte **80**

5. ERGEBNISSE **81-96**

5.1. Einfluss der Lipidinfusionstherapie auf das Profil und die Plasmaspiegel freier Fettsäuren in septischen Patienten **83-87**
5.1.1. Summe der freien Fettsäuren im Plasma 84-85
5.1.2. Verhalten der freien Arachidonsäure im Plasma 86
5.1.3. Verhalten der freien Eicosapentaensäure/Docosahexaensäure im Plasma 86-87

5.2. Einfluss der Infusionstherapie auf den granulozytären Entzündungsmetabolismus **88-93**
5.2.1. Leukotriene 88-89
5.2.2. ROS 90
5.2.3. Elastase 91
5.2.4. Phosphatidylinositol 92
5.2.5. PAF 93

5.3. Veränderungen des Thromboxanmetabolismus der Plättchen unter der Lipidinfusion **94**

5.4. Einfluss der parenteralen Lipidtherapie auf den Verlauf ausgewählter klinischer Parameter der beobachteten Sepsispatienten 95-96

5.4.1. Beatmung 95

5.4.2. Katecholamine 95

5.4.3. APACHE II 96

6. DISKUSSION 97-110

6.1. Anstieg des freien Präkursors „Fettsäure" im Plasma 97-98

6.2. Immunmodulatorische Therapie der Sepsis durch ω-3-Lipide infolge einer verbesserten Immunantwort durch Reduktion der hyperinflammatorischen Antwort der Leukozyten? 99-102

6.3. Das Konzept der parenteralen Immunnutrition - eine Perspektive 102-110

6.3.1. Vorteile einer parenteralen versus enteralen Darreichungsform von Lipiden 103-104

6.3.2. Phasen der Sepsis 104-107

6.3.3. Mögliche Intervention mit ω-3- versus ω-6-Lipidemulsionen 108-110

7. ZUSAMMENFASSUNG / SUMMARY 111/112

8. LITERATURVERZEICHNIS 113-142

Anhang

- Lebenslauf
- Publikationsverzeichnis
- Danksagung

Liste verwendeter Abkürzungen

AA	Arachidonsäure (arachidonic acid)
APACHE	Acute Physiology and Chronic Health Evaluation
ARDS	adult respiratory distress syndrome
CARS	compensatory anti-inflammatory response syndrome
COX	Cyclooxygenase
CSF	Kolonie-stimulierender Faktor
DAG	Diacylglycerol
DIC	disseminierte intravasale Gerinnung
EC	Endothelzelle
EPA	Eicosapentaensäure (eicosapentaenoic acid)
FFA	freie Fettsäure
FS	Fettsäure
GC	Gaschromatograph
HLA	Humanes Leukozyten-Antigen
HPLC	High Performance Lipid Chromatographic
IFN	Interferon
IL	Interleukin
LO	Lipoxygenase
LPS	Lipopolysaccharid, Endotoxin
LT	Leukotrien
MHC	major histocompatibility complex
MODS	multiple organ dysfunction syndrome
MOF	Multiorganversagen (multiple organ failure)
NF-κB	nuclear factor κB
NO	Stickstoffmonoxid (nitric oxid)
PAF	Plättchen-aktivierender Faktor
PG	Prostaglandin
PI	Phosphatidylinositol
PLA_2	Phospholipase A_2
PLC	Phospholipase C
PKC	Proteinkinase C
PMN	polymorphkernige Neutrophile
PUFA	polyunsaturated fatty acid
ROS	reactive oxygen species
SIRS	systemic inflammatory response syndrome
TGF	transforming growth factor
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
Tx	Thromboxan

1. VORWORT

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit vom Oktober 1993 bis September 1995 am Zentrum für Innere Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen im Laborbereich von Herrn Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Friedrich Grimminger unter der Betreuung von Herrn Dr. med. Konstantin Mayer. Die im Rahmen einer Pilotstudie an septischen Patienten durchgeführten Untersuchungen wurden von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) (SFB 547 „Kardiopulmonales Gefäßsystem", Projekt B4) gefördert und widmeten sich dem immunmodulatorischen Einfluss parenteral verabreichter Fettemulsionen in septischen Patienten. Zu diesem Zeitpunkt lagen der Klinischen Forschergruppe des Instituts umfangreiche Erfahrungen bezüglich der Beeinflussung des Lipidmetabolismus mittels verabreichter ω-3- versus ω-6-Fettsäuren auf zellphysiologischer Ebene, in isolierten Organmodellen sowie im Falle von Patienten mit Psoriasis und mit Colitis ulcerosa vor. Zur Weiterführung dieser Beobachtungen erfolgte im Rahmen der vorliegenden Studie erstmals die Untersuchung an beatmeten und parenteral ernährten Sepsispatienten. Aus der umfassenden Studie gibt diese Dissertationsschrift einen Ausschnitt wieder. Über das Thema dieser Dissertation hinaus erfolgten die Aufarbeitung des Fettsäureprofils der Membranlipide aus den isolierten Blutzellen und dem Blutplasma, zusätzlich ex vivo LPS-Stimulationsexperimente an isolierten mononukleären Zellen und Monozyten der Studienpatienten, nachdem mir die Isolation von Monozyten aus septischen Patienten gelungen war.

2. EINLEITUNG

2.1. Sepsis und septischer Schock als ungesteuerte inflammatorische Antwort des menschlichen Organismus auf die Konfrontation mit Keimen und Toxinen – Definition und Pathophysiologie

Trotz der Fortschritte in der Intensivmedizin sind Sepsis und septischer Schock weiterhin mit einer hohen Mortalität von 30 bis 60 % vergesellschaftet (1, 2, 3) bei einer seit 1930 stetig zunehmenden Inzidenz (4). Bislang existiert keine weltweite Statistik bezüglich der Morbidität, aber allein in den USA kam es in dem Beobachtungszeitraum von 1979 bis 2000 zu einem Anstieg von 164000 Fällen (das entspricht 82.7 Sepsiskranken von 100000 Einwohnern) auf nahezu 660000 Fälle (entsprechend 240.4 Kranken von 100000 Einwohnern) jährlich, dies bedeutet eine jährliche Steigerung der Inzidenz um 8.7 % (5). Sepsis repräsentiert die häufigste Todesursache auf den nichtkardiologischen Intensivstationen (6, 7). Die ansteigende Sepsisinzidenz erklärt sich unter anderem über die Keimeinschwemmung durch invasivere diagnostische und therapeutische Maßnahmen, durch die steigende Zahl der chronisch kranken Patienten und durch den zunehmenden Einsatz immunsuppressiver Behandlungsformen.

Anfang der 90er Jahre wurde eine Standardisierung der Terminologie vorgenommen, nachdem bis zu diesem Zeitpunkt aufgrund der mangelnden Übereinstimmung der Sepsis-Diagnose die Patientenpopulationen zahlreicher Sepsisstudien variierten und so ein direkter Vergleich der Ergebnisse nicht möglich war (8). Einen Überblick über Terminologie und deren Definitionen - in Anlehnung an die ACCP/SCCM Consensus Conference von 1991 - soll Tabelle 1 geben (9).

Nach der „International Sepsis Definitions Conference 2001“ wird Sepsis über das Vorhandensein folgender Kriterien der systemischen Inflammation als Anwort auf ein auslösendes infektiöses Agens definiert: allgemeine Veränderungen (Fieber, Hypothermie, Tachykardie, Tachypnoe, Bewusstseinsänderung, signifikantes Ödem/Volumenretention, Hyperglykämie), Zeichen der Inflammation (Leukozytose oder Leukopenie, > 10 % unreife Zellformen, erhöhtes CRP, erhöhtes Procalcitonin), Probleme der Hämodynamik (arterielle Hypotension, Cardiac Index > 3.5 l/(min x m^2)), Organdysfunktion (arterielle Hypoxämie, akute Oligurie, Kreatininanstieg, Gerinnungsstörungen, Ileus, Thrombopenie, Bilirubinanstieg) und gestörte Gewebeperfusion (Laktatanstieg, verminderte kapilläre

Wiederfüllung, Marmorierung) (10). Mit dem Beginn eines infektionsortfernen Organversagens wird von schwerer Sepsis gesprochen, das Vorliegen einer Hypotension oder die Notwendigkeit des Einsatzes von vasopressorischen Agenzien kennzeichnet den Beginn des septischen Schocks. Während der septische Schock die Haupttodesursache in der Frühphase der Sepsis darstellt und in 20 - 50 % der Sepsisfälle auftritt, steht im Spätstadium die Letalität auf dem Boden der Entwicklung eines MODS/MOF (MODS = multiple organ dysfunction syndrome; MOF = multiple organ failure) im Vordergrund (11, 12).

Tabelle 1: **Definitionen in Anlehnung an „ACCP/SCCM consensus conference", 1991 (9)**

Infektion	Ein mikrobielles Phänomen, charakterisiert durch eine inflammatorische Antwort auf die Präsenz von Mikroorganismen oder die Invasion von normalerweise sterilem Gewebe durch diese Organismen.
Bakteriämie	Der Nachweis von lebensfähigen Bakterien im Blut (Beschreibung des Nachweises anderer Organismen in gleicher Weise, z. B., Fungämie, Virämie etc.).
SIRS	Die systemische inflammatorische Antwort auf eine Vielzahl von schweren Ereignissen, einschließlich Infektion, Pankreatitis, Ischämie, Multitrauma und Gewebsverletzung, hämorrhagischer Schock, immunologische Stimulation und exogene Verabreichung von inflammatorischen Mediatoren wie TNF-α oder anderen Zytokinen.
Sepsis	Die systemische Antwort auf Infektion. Diese Antwort ist mit SIRS identisch, außer dass sie durch eine Infektion bedingt ist.
Schwere Sepsis	Sepsis, die mit Organdysfunktion, Perfusionsabnormalitäten oder Hypotension assoziiert ist.
Septischer Schock	Sepsis mit Hypotension trotz adäquater Flüssigkeitssubstitution, in Verbindung mit Perfusionsabnormalitäten.
MODS	Veränderte Organfunktion in einem akut kranken Patienten, so dass Homöostase nicht ohne Intervention aufrechterhalten werden kann.

In zahlreichen experimentellen Modellen sowie unter klinischen Bedingungen konnte eine unkontrollierte Freisetzung einer Fülle von proinflammatorischen und potentiell autotoxischen Mediatoren gefunden werden (13, 14, 15). Der Tatsache, dass eine solche systemische inflammatorische Antwort nicht allein durch eine mikrobielle Invasion bedingt ist, sondern vielmehr eine Antwort auf verschiedene Arten der Gewebsverletzung darstellt, wird Rechnung getragen durch den Begriff „systemic inflammatory response syndrome" (SIRS). So ist die Entstehung einer systemischen inflammatorischen Reaktion auch im Rahmen eines großen operativen Eingriffs, nach Polytrauma sowie nach Verbrennungen beschrieben (16, 17). Einen Überblick über die Auslöser von SIRS und Sepsis und den Zusammenhang beider gibt Abbildung 1.

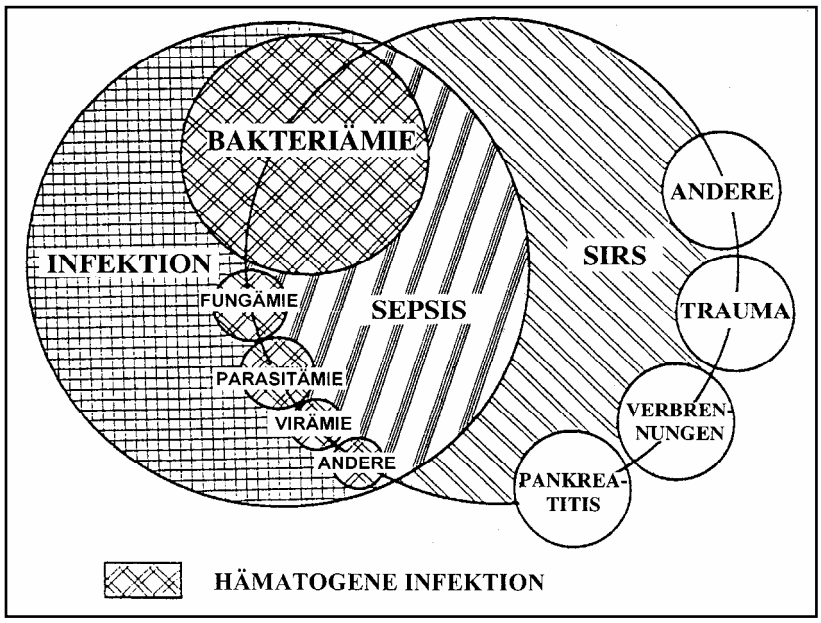


Abbildung 1: Die Beziehung zwischen SIRS, Sepsis und Infektion

Im Vordergrund der Initiierung einer Sepsis steht die Bakteriämie. Trauma, Verbrennungen, operative Eingriffe und andere schwere Gewebsverletzungen sind ebenfalls in der Lage, in eine ausgeprägte sytemische inflammatorische Reaktion - das SIRS (systemic inflammatory response syndrome) - zu münden [Abb. verändert aus Bone, R. C., et al.. Chest 1992. (9)].

In den vergangenen Jahren erlangte das Procalcitonin – das Propeptid des Calcitonin - als laborchemischer Parameter neben dem C-reaktiven Protein eine zunehmende klinische Bedeutung, erlaubt es bei SIRS sowie ARDS eine Differenzierung zwischen infektiöser und nicht-infektiöser Genese. Während das Maximum des CRP erst nach 48 Stunden erreicht wird, bietet das Procalcitonin dieses bereits nach 24 Stunden und dient damit als „schneller Marker".

Im Gesunden ist eine komplexe und streng regulierte Kaskade immunologischer Faktoren - sowohl zellulärer als auch humoraler Herkunft - für die Abwehr von invasiven Organismen verantwortlich.

Die pathophysiologische Sequenz der Sepsis lässt sich vereinfachend in 3 Stadien zusammenfassen:

1. Einschwemmung von Keimen und Toxinen
2. Zytokinfreisetzung
3. Aktivierung sekundärer Mediatorsysteme und damit verbundene Mikrozirkulationsstörungen und Zellschädigung.

Monozyten spielen eine zentrale Rolle während der Sepsis, können sie auf die Stimulation durch frei werdende Bakterienprodukte wie Endotoxin, Exotoxine, Superantigene oder Lipoteichonsäure normalerweise protektive inflammatorische Mediatoren in einem solchen Umfang freisetzen, dass sie damit letztendlich Hyperinflammation und Schädigung des Wirtsorganismus initiieren (18).

In die inflammatorische Antwort sind polymorphkernige Neutrophile in doppeltem Sinne eng eingebunden: Sie repräsentieren die erste Linie der Verteidigung gegen eine mikrobielle Invasion und besitzen gleichzeitig das Potential, schwerste Gewebsdestruktionen herbeiführen zu können (14, 19).

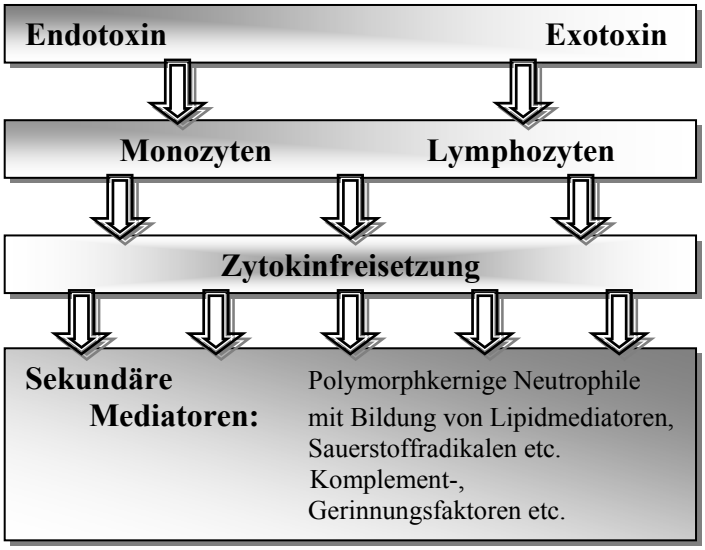


Abbildung 2: Übersicht der pathophysiologischen Sequenz der Sepsis

[Abb. verändert aus Grimminger, F., Mayer, K., und Seeger, W.. 1997. Gibt es eine gesicherte Immuntherapie bei der Sepsis? Internist 38:541-552.]

In zahlreichen Arbeiten konnte dokumentiert werden, dass parallel zur inflammatorischen Antwort auf ein auslösendes Ereignis eine antiinflammatorische Reaktion initiiert wird, die von Bone et al. unter dem Begriff „compensatory anti-inflammatory response syndrome" (CARS) subsumiert wird (20). Die Hochregulation der antiinflammatorischen Zytokine, die Beeinträchtigung der Neutrophilenfunktionen und die Inaktivierung der Monozyten führen zu einer verminderten Abwehr des Organismus und einer erhöhten Anfälligkeit gegenüber Sekundärinfektionen (21-26). Für den Übergang von der überschießenden Hyperinflammation der Sepsis in das Stadium der Immunparalyse gibt es klinische Zeichen: So kommt es im Verlauf der Sepsis zu Pilzinfektionen, die ein immunkompetenter Organismus ohne Schwierigkeiten eliminieren könnte. Es treten rezidivierende und persistierende bakterielle Infektionen auf, die den Verlauf der Erkrankung protrahieren. Des Weiteren werden eine Tuberkulinanergie bei vorbestehender positiver Tuberkulinreaktion sowie eine verminderte kutane zelluläre Immunreaktion gefunden. Als Hinweis auf eine gestörte Immunkompetenz kann auch gewertet werden, dass es bei Patienten, die Transplantatträger sind, trotz Unterbrechung der medikamentösen Immunsuppression in der Regel zu keiner Abstoßungsreaktion kommt.

Das Verständnis der Sepsis wird insbesondere dadurch erschwert, dass es sich bei dieser systemischen Hyperinflammation nicht um ein uniformes Geschehen handelt. Die zahlreichen beteiligten zellulären und humoralen Effektoren stehen zwar in vielfachen Wechselwirkungen, jedoch kommt es keinesfalls zu einer immer gleichförmigen Aktivierung. Vielmehr stehen je nach Erreger, Eintrittspforte und Grunderkrankung des Organismus unterschiedliche Mediatoren im Vordergrund. Hier sei das Beispiel der Granulozyten und ihrer Rolle im Rahmen der Auslösung pulmonalvaskulärer Läsionen genannt: Ihr „Sticking" in der Endstrombahn der Lunge zählt zu den frühsten Phänomenen, die dem Intensivmediziner im Rahmen der Sepsis begegnen und das Bild eines ARDS (adult respiratory distress syndrome) begleiten. Andererseits wird das Vollbild der „septischen Lunge" auch im Rahmen schwerer Infektionen bei Patienten mit Agranulozytose gefunden. Ebenso konnte in experimentellen Untersuchungen am Beispiel der Lunge gezeigt werden, dass das Vollbild eines septischen Organversagens durch bakterielle Toxine selbst unter Umgehung der zirkulierenden körpereigenen Mediatoren ausgelöst werden kann (27).

An dieser Stelle möchte ich zwei Komplikationen im Vollbild der Sepsis vorstellen, die den Verlauf und die Mortalität entscheidend bestimmen:

Septischer Schock

Der septische Schock ist durch eine eintretende arterielle Hypotonie gekennzeichnet. Dieser Kreislaufstörung liegen zahlreiche, in der Sepsis gebildete Mediatoren zugrunde. Eine besondere Rolle spielen die synthetisierten Kinine und das Stickstoffmonoxid (NO), letzteres stellt möglicherweise den Hauptmediator der Endotoxin-mediierten Hypotension dar. Während die Expression der cNOS, einer NO-Synthase, die der Mikrozirkulationssteuerung und Aggregationshemmung dient, konstitutiv erfolgt, ist die Expression von iNOS induzierbar: Auf die Stimulation mit Endotoxin und Tumor-Nekrose-Faktor (TNF) erfolgt eine gesteigerte Expression dieser Synthase und damit eine verstärkte Vasodilatation und gesteigerte Gefäßpermeabilität. Daraus resultiert ein Mismatch mit Perfusionsfehlverteilung und Shuntperfusion (28). Diese äußert sich in der Lunge als „Perfusions-Ventilations-Verteilungsstörung“ mit schwerwiegenden Folgen für den Gasaustausch. In zahlreichen peripheren Organen führt die Fehlverteilung der Perfusion zu einer vermehrten Durchblutung einzelner Kapillarstrecken bei Minderdurchblutung anderer Kapillaren und damit zu einer Fehlversorgung der Peripherie. Die Veränderung der Vasomotion äußert sich in der pulmonalen Strombahn als prä- und postkapilläre Widerstandserhöhung mit Anstieg des pulmonalvaskulären Widerstands und Erhöhung des mikrovaskulären Filtrationsdrucks. In den Endstrombahngebieten der anderen Organe kann der Gesamtwiderstand sowohl ansteigen als auch abfallen. Bei bevorzugter postkapillärer Vasokonstriktion resultiert ein „Pooling“ des Bluts in der Peripherie: Eine vermehrte Ödembildung aufgrund einer Erhöhung des mikrovaskulären Drucks im vorgeschalteten Kapillarbett ist die Folge.

Organversagen im Rahmen einer gestörten Mikrozirkulation

Eine systemische inflammatorische Reaktion des Organismus induziert eine Vielzahl von pathophysiologischen Antworten in verschiedenen Geweben und Organsystemen. In der Entwicklung des Organversagens spielen zirkulatorische Dysfunktion, Leukozyten-induzierte Gewebsverletzung und Aktivierung der Koagulation mit der möglichen Entstehung einer disseminierten intravasalen Gerinnung (DIC = disseminated intravascular coagulation) eine entscheidende Rolle.

Der Schock, gleichgültig welcher Genese, führt letztendlich immer zu einer Störung der Mikrozirkulation, welche die verschiedenen Organe gleichzeitig betrifft (29). Aufgrund der

inadäquaten Durchblutung der Kapillaren werden dem Gewebe nur unzureichend Sauerstoff und Substrate angeboten und anfallende Metabolite nur unvollkommen abtransportiert. So kommt es zur Hypoxie mit metabolischer Azidose und Laktatanstieg sowie zum Abfall der Sauerstoffaufnahme des Gesamtorganismus. Folge ist eine schwere Funktionsstörung der betroffenen Organe mit Ausbildung von Zellnekrosen. Diese schweren Organfunktionsstörungen können letztendlich in ein MOF münden, das in 30 % der Sepsisfälle eintritt (3).

Demnach stellt das Bild der Sepsis ein sehr komplexes systemisches Krankheitsgeschehen dar, in das neben einem infektiösen Agens zahlreiche humorale und zelluläre Systeme der körpereigenen Abwehr und nahezu alle Organsysteme involviert sein können.

2.2. Wirkung bakterieller Toxine und anderer bakterieller Produkte

Die Einschwemmung von Keimen und Toxinen – wie bereits beschrieben - steht am Beginn der Sepsis. Im Gegensatz zu Bakterien initiieren Viren, Pilze und Parasiten deutlich seltener eine Sepsis. Während dem Endotoxin der gramnegativen Bakterien als häufigster Auslöser von Bakteriämien besonderes Interesse galt, zeigte sich in den vergangenen Jahren eine zunehmende Inzidenz grampositiver Bakteriämien sowie Fungämien (30, 31). Der Anstieg der Sepsisrate auf dem Boden einer Pilzinfektion wird in den USA für den Zeitraum von 1979 bis 2000 auf 207 % beziffert. Eine retrospektive Studie in den USA hob eine Zunahme der grampositiven Infektionen seit 1987 hervor (5). Eine Studie von Bone et al. dokumentierte einen letalen Ausgang in 67 % der grampositiven, in 46 % der gramnegativen Septikämien. Ein Schockereignis trat in 33 % der grampositiven, in 21 % der gramnegativen Sepsisfälle auf (32, 33).
Da grampositive Erreger kein Endotoxin in ihrer Zellwand aufweisen, jedoch das typische Bild der Sepsis hervorrufen können, ist von einer dem Endotoxin ähnlichen Wirkung der Exotoxine und weiterer bakterieller Produkte, wie der Lipoteichonsäure, auszugehen.

Infektion ist dadurch gekennzeichnet, dass Bakterien die endo-epithelialen Schranken des Wirtsorganismus überwinden. Die Entwicklung und das Ausmaß der resultierenden Erkrankung ist von der Immunkompetenz und Abwehrbereitschaft des infizierten Makroorganismus sowie der Vermehrungsfähigkeit und Virulenz des eingedrungenen

Mikroorganismus abhängig. Eine entscheidende Rolle spielen die sog. Virulenzfaktoren, die in zwei Hauptgruppen eingeteilt werden: Die zellwandständigen Oberflächenmoleküle, welche die Adhäsion des Bakteriums, dessen Kolonisation und dessen Resistenz ermöglichen, und die toxischen Sekretionsprodukte, die zur Schädigung des Wirtsgewebes oder zur Irritation der zellulären Komponenten des Immunsystems führen. Letztere können über den primären Infektionsherd hinaus in andere Zirkulationsbereiche gestreut werden und dort auch noch nach Ausschaltung der Mikrobe Symptome verursachen.

Der eukaryonte Wirtsorganismus hat an immunkompetenten Zellen Rezeptorstrukturen ausgebildet, mit deren Hilfe er die prokaryonte Invasion frühzeitig erfassen und mit einer Immunaktivierung beantworten kann. Damit wirkt das Bakterium einerseits über eine unmittelbare Kontaktaufnahme mit der Wirtszelle und setzt durch die Bildung von Stoffwechsel- und Zerfallsprodukten eine protektive Entzündungsreaktion in Gang. Andererseits kann die Sekretion destruktiver Faktoren zur Schädigung des Wirtsorganismus führen.

Es werden unterschiedliche Substanzklassen der inflammatorisch relevanten Bakterienprodukte unterschieden. *Formylpeptide*, zu welchen fmlp (N-Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin) gerechnet wird, entstehen im Rahmen der Synthese und dem Zerfall von Zellwandkomponenten der Bakterien (35). Sie sind chemotaktisch wirksam und führen am Ort ihrer Freisetzung zu einer raschen Granulozytenansammlung. Degranulierungsreaktion, Sauerstoffradikalen-Bildung und Synthese von Lipidmediatoren sind die Folge. Die gebildeten Mediatoren können eine Perpetuierung der inflammatorischen Entzündungsreaktion induzieren (36). Nach Bindung an den entsprechenden Rezeptor auf den Granulozyten und Makrophagen lösen die Formylpeptide über die G-Protein-vermittelte Aktivierung einer membranständigen Phospholipase C dieser Zellen eine Signaltransduktion aus (37).

Exotoxine sind ein weiterer elementarer Faktor der bakteriellen Pathogenität (9). Zu ihnen zählen die *porenbildenden Exotoxine* (Streptolysin O, Staphylokokkus α-Toxin, Zytotoxin von Pseudomonas aeruginosa, Hämolysin von Escherichia coli) (39, 40). Durch die ausgelöste Porenbildung kommt es zu einer gestörten Membranintegrität mit Permeabilitätserhöhung und einem anschließenden ungesteuerten Kalziumeinstrom in die Zelle, wodurch über eine Aktivierung intrazellulärer Transduktionsmechanismen die Zellantwort initiiert wird. Das *Hämolysin* von *Escherichia coli* bettet sich bei Auftreffen auf die Zielzelle - PMN und Endothelzellen sind bevorzugte Angriffsziele - in deren Lipiddoppelschicht ein und verursacht so eine Membranpermeabilisierung (41). Zu erwähnen sind die erst seit einigen

Jahren identifizierten *Superantigene*, die von invasiven Staphylokokken, den Hauptverursachern der grampositiven Sepsis, sezerniert werden (42). Sie vermitteln eine bakteriell-lymphozytäre Interaktion und schließen das Kontrollsystem der Lymphozyten kurz, indem sie die HLA-Klasse II-Moleküle der Antigen-präsentierenden Monozyten mit dem Antigen-Rezeptor der T-Lymphozyten überbrücken. Hierdurch kommt es zu einer Aktivierung von nahezu 25 % aller Lymphozyten und einer Überschwemmung der Zirkulation mit immunregulatorischen Zytokinen. Ein konventionelles Antigen aktiviert im Vergleich dazu nur etwa 0,01 % der T-Lymphozyten.

Eine entscheidende Rolle in der gramnegativen Bakteriämie wie auch in der experimentellen Forschung spielt das *Endotoxin*, auch *Lipopolysaccharid (LPS)* genannt, das aus Zellwandbestandteilen gramnegativer Bakterien bei deren Zellteilung und Zerfall hervorgeht. Endotoxin wurde erstmals 1892 von Richard Pfeiffer als hitzestabiler Bestandteil von Vibrio cholerae beschrieben (43). Es besteht aus einem variablen Polysaccharidteil und einer Lipidkomponente, dem Lipid A, der eigentlich biologisch aktiven Komponente des Endotoxins. Das Lipid A löst bereits in geringer Menge eine Vielzahl relevanter Symptome aus: Fieber, Hypotension, Tachykardie, Tachypnoe, disseminierte intravasale Koagulation und Multiorganversagen (44). Die Antwort des Wirtsorganismus auf das LPS wird unter anderem von Zytokinen und Lipidmediatoren vermittelt, die von Granulozyten, Endothelzellen, Monozyten/Makrophagen und T-Zellen auf Stimulation freigesetzt werden (45-51).

LPS reagiert über den membrangebundenen, Phosphoinositol-verankerten CD14-Rezeptor, der von Zellen der myeloiden Zellreihe exprimiert wird (52). Nach der Bindung von LPS an CD14 erfolgt die durch den Toll-like-Receptor (TLR) mediierte Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-κB (nuclear factor κB) und damit die Transkription inflammatorischer Mediatoren (53). Die Wirkung des LPS wird durch das LPS-bindende Protein (LBP) und die lösliche Form des CD14-Rezeptors (sCD14) modifiziert. LBP steigert die Bindung an den CD14-Rezeptor (54), sCD14 besitzt eine Endotoxin neutralisierende Funktion, seine Anwesenheit ermöglicht aber auch die Stimulation von CD14-negativen Zellen (z. B. Endothelzellen) (55). LPS wird eine Induktion der TNF (Tumor-Nekrose-Faktor)- und IL (Interleukin)-1-Expression und Expression weiterer Mediatoren durch Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-κB zugeschrieben (53).

2.3. Zirkulierende humorale Effektoren der Immunantwort in der Sepsis

2.3.1. Das Komplement-System

Unter inflammatorischen Bedingungen spielen einzelne Komplementfaktoren eine bedeutende Rolle. Das aktivierte C5a agiert als granulozytäres Chemotaxin und als Induktor der Neutrophilenadhäsion, der Sauerstoffradikalen-Bildung und der Lysozymfreisetzung (56). Es konnte ein Zusammenhang zwischen einem Anstieg der Plasmakonzentration des C5-C9-Komplexes - einem stabilen Endprodukt der Komplementaktivierung - und der Entwicklung eines ARDS in Sepsispatienten aufgezeigt werden (57, 58).
In zahlreichen inflammatorischen Geweben finden sich Ablagerungen des C5b-C9-Komplexes, der durch die Synthese von extrazellulärer Matrix und Aktivierung von Kollagenasen in die Bildung von Narbengewebe und in Gewebsdestruktion involviert ist. C5b-C9-Mangelzustände münden in eine reduzierte inflammatorische Antwort oder in einen abgewandelten Zeitablauf der Inflammation (59). Es konnte gezeigt werden, dass C5b-C9 ein Mediator der Zytokinkaskade ist (60-62) und, ebenso wie C5b-C8, die Eicosanoidfreisetzung aus einer Vielzahl von Zellen triggert (63). Der Mechanismus ist bislang nicht vollständig geklärt. Nachgewiesen werden konnte eine Initiierung des Phospholipid-Umsatzes, ein Anstieg des intrazellulären Kalziums (64), eine Aktivierung von Proteinkinase C und G-Proteinen (65), eine Synthese von Sauerstoffradikalen (60) und Kollagen IV sowie Kollagenase (66, 67), eine gesteigerte Expression der Komplement-Regulatorproteine DAF (decay-accelerating factor) und C8bp (C8 binding protein) im Sinne einer negativen Rückkopplung durch Limitierung der weiteren Komplement-gesteuerten Zellstimulation (60, 64-70). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Komplementkomplexe potente Stimulatoren zahlreicher Zellfunktionen sind, dass der C5b-C9-Komplex an der Induktion einer inflammtorischen Antwort sowie an ihrer Perpetuierung und Progression zu einem chronischen Geschehen beteiligt ist.

2.3.2. Die Gerinnungskaskade

Einen wichtigen Schutzmechanismus bei Gewebsverletzung oder bei Schädigung eines Blutgefäßes stellt die Balance zwischen Koagulase- und Fibrinolyse-System dar. Während einer Infektion können inflammatorische Mediatoren der Mikroben und des Wirtsorganismus

zu einer Modulation und damit zu einem Ungleichgewicht beider Systeme führen, was letztendlich in eine disseminierte intravasale Gerinnung (DIC) münden kann (71, 72).

Die Antwort auf eine Endotoxinämie besteht in einer Hyperkoagulabilität und wird durch den extrinsischen Pfad der Koagulation verursacht, während das intrinsische System zwar durch das Kontaktsystem aktiviert wird, sich jedoch nicht an einer Steigerung der Koagulation beteiligt, sondern vielmehr durch Bildung der Kinine, insbesondere des Bradykinins, zur irreversiblen und letalen Hypotension in der Sepsis führt (73). Kinine sind potente Induktoren von Fieber, Schmerz und Hypotension (74, 75), ihnen werden auch inflammatorische Funktionen zugeschrieben (76). Bakterien triggern die Freisetzung dieser reaktiven Gewebshormone und besitzen damit eine Strategie, die ihnen eine Penetration und ein Streuen im Gewebe ermöglicht. Die Rolle des Kontaktsystems in der hämodynamischen Entgleisung während der Sepsis wird anhand von Tierexperimenten bestätigt, die zeigen, dass eine Blockierung dieses Weges die Tiere vor der Ausbildung einer irreversiblen Hypotension schützt und ihr Überleben verlängert (77).

In Tierexperimenten konnte dokumentiert werden, dass Infusionen mit Endotoxin oder lebenden Bakterien nicht nur die inflammatorischen Kaskaden, sondern auch die Koagulationsmechanismen aktivieren können (73, 78). Endotoxin und TNF-α können die Synthese des Tissue-Faktors (TF), einem entscheidenden Initiator der Aktivierung des extrinsischen Weges der Gerinnung, durch polymorphkernige Neutrophile (PMN) und Monozyten steigern (79-81). Auf dem Boden einer Bildung und Aktivierung von Koagulationsfaktoren werden zahlreiche inflammatorische Reaktionen ausgelöst: Leukozyten-Rekrutierung, Zytokin- und Stickstoffmonoxid (NO)-Freisetzung, Bildung von reaktiven Sauerstoffmetaboliten (82, 83). Thrombin wird neben seiner prokoagulatorischen Eigenschaft durch Bildung von Fibrin und Plättchenaggregaten eine proinflammatorische Funktion zugeschrieben: Es ist der Hauptmediator der Endothelzell- und Leukozyten-Aktivierung, bedingt durch eine gesteigerte Zytokinsynthese (84). Durch eine überschießende Bildung dieses Faktors kommt es neben einer Hyperkoagulabilität zu gesteigerter Leukozytenadhäsion und vaskulärer Dysfunktion.

Entscheidend für einen geordneten Ablauf der Gerinnung und ihre Begrenzung auf den Ort der Schädigung ist ein ausgeglichenes Verhältnis zwischen prokoagulatorischen Enzymen und ihren Inhibitoren, die gleichzeitig aktiviert werden. Bei Störung dieses Gleichgewichts -

entweder durch eine unkontrollierte Koagulation oder durch eine gestörte Fibrinolyse – ist eine effiziente Wundheilung aufgrund der Unfähigkeit der Fibrinbildung behindert oder eine Organischämie mit anschließendem Organversagen aufgrund einer überschießenden Fibrindeposition in den Gefäßen die Folge.

Eine positive Rückkopplung zwischen Gerinnungssystem und prokoagulatorischen Zytokinen sowie ein Mangel der im Plasma vorkommenden Koagulationsinhibitoren sind möglicherweise für die Entwicklung einer disseminierten intravasalen Koagulation während der Sepsis verantwortlich. Diese Gerinnungskomplikation ist gekennzeichnet durch eine weit verbreitete Deposition von Fibrin in den Gefäßsystemen (85). Folge sind thrombotische Verschlüsse kleiner und mittlerer Blutgefäße sowie die mögliche Entwicklung eines Multiorganversagens. Parallel dazu führt der Verbrauch und anschließende Mangel an Thrombozyten und Koagulationsproteinen zu schweren Blutungskomplikationen, dem dominierenden Symptom der Patienten mit DIC. Aufgrund des Nebeneinanders von Gerinnungsvorgängen und Blutungen ist die Wahl des therapeutischen Ansatzes erschwert.
Bakterielle Infektionen, insbesondere die Sepsis, stellen die häufigste Ursache der DIC dar. In 30-50 % der Sepsisfälle kommt es zu einem Auftreten dieser Komplikation (86). Eine Arbeit von Levi et al. konnte zeigen, dass die systemische Freisetzung von Zytokinen eine wichtige Rolle in der Entwicklung der DIC spielt (73). Abbauprodukte des Fibrinogens triggern die Freisetzung von Interleukin 1 (IL-1), Interleukin 6 (IL-6) und Plasminogen-Aktivator-Inhibitor (PAI-1) aus Monozyten und Makrophagen. Während IL-1 und IL-6 einen additiven Gefäßendothelschaden induzieren, inhibiert das entstehende PAI-1 die fibrinolytische Aktivität, die durch die Freisetzung von Plasminogen-Aktivatoren aus Endothelzellen bedingt ist. Dies hat eine verstärkte Thrombusbildung zur Folge (87-89).

In experimentellen Modellen konnte gezeigt werden, dass zum Zeitpunkt der maximalen Stimulation des Koagulationssystems das fibrinolytische System nahezu ausgeschaltet ist.
Ein entscheidendes Ziel zur Verbesserung der Prognose in der Sepsis ist die Inhibition der Entwicklung einer DIC.

2.4. Zirkulierende zelluläre Komponenten der Immunantwort und ihre Mediatoren in der Sepsis

Den zellulären Komponenten der inflammatorischen Antwort zuzuordnen sind in erster Linie Monozyten/Makrophagen, polymorphkernige neutrophile Granulozyten (PMN) sowie Lymphozyten, aber auch ortsständige Zellen wie Endothelzellen. Durch ihre Aktivierung im Rahmen einer systemischen inflammatorischen Reaktion werden sie in unterschiedlicher Intensität und zu unterschiedlichen Zeitpunkten stimuliert. Diese Zellen können sich, je nach Art des stimulierenden Agens und „Primings" (das Induzieren eines voraktivierten Zustandes), durch eine Vielzahl von Mediatoren variierend in das inflammatorische Geschehen einbringen. Aufgrund ihrer Fähigkeit, vasoaktive Mediatoren zu bilden, sind ebenfalls Thrombozyten in diesem Zusammenhang zu nennen.
Nach dem Frühstadium, gekennzeichnet durch die systemische Freisetzung von Endotoxin oder Exotoxin durch invasive Mikroorganismen und die dadurch bedingte Störung der Immunantwort im Wirtsorganismus, kann die Sepsis in ein protrahiertes Stadium - das chronische Sepsissyndrom - münden, in dem ein definitiver Erregernachweis meist nicht mehr gelingt. Vielmehr diktieren nun sekundäre Faktoren das Geschehen. Eine Schlüsselrolle wird hier den Zytokinen zugeschrieben.

2.4.1. Mononukleäre Zellen

In dieser Gruppe werden Monozyten, Makrophagen und Lymphozyten sowie Vorläuferzellen zusammengefasst, welche die wichtigste Quelle für ein breites Spektrum an Zytokinen sind: Interleukine, Interferon (IFN)-α, IFN-β, IFN-γ, TNF-α, TNF-β, Wachstumsfaktoren, Kolonie-stimulierende Faktoren (CSF = colony stimulating factor, wie G-CSF, GM-CSF etc.) und Chemokine.
Zytokine werden ebenso in einer Reihe weiterer Zellen synthetisiert: in Neutrophilen, Fibroblasten, Endothelzellen u. a..

Zytokine sind niedermolekulare Glykoproteine, die als interzelluläre Botenstoffe (messenger) agieren und im Rahmen ihrer pleiotropen Wirkung (auto-, para- und endokrin) der Regulation des zellulären und humoralen Zusammenspiels dienen. Nach Rezeptorokkupation durch das Zytokin wird eine Signaltransduktion in der Effektorzelle mit Bildung von intrazellulären

Botenstoffen, sog. „Second messenger", induziert. Die Sensitivität einer Effektorzelle gegenüber einem bestimmten Zytokin hängt unter anderem von der Anzahl der zur Verfügung stehenden Zytokinrezeptoren ab (90).

Anhand ihrer Wirkungen werden proinflammatorische von antiinflammatorischen Zytokinen unterschieden. Erkennt der Organismus, dass aufgrund eines infektiösen oder traumatischen Ereignisses eine Immunantwort notwendig ist, leitet er die Bildung proinflammatorischer Mediatoren ein, die zelluläre Antwortmechanismen anstoßen. Während lediglich geringe Konzentrationen erforderlich sind, um pathogene Organismen zu bekämpfen und einen Heilungsprozess zu fördern, kommt es in der Sepsis zu einer überschießenden Produktion inflammatorischer Zytokine. Tumor-Nekrose-Faktor alpha (TNF-α) und Interleukin 1 beta (IL-1β) werden den primären, die inflammatorische Kaskade initiierenden Zytokinen zugeordnet (91). Im weiteren Verlauf schließt sich die Bildung antiinflammatorischer Zytokine an, zu denen Interleukin 10, TGF-β (tissue growth factor beta), Interleukin 4 und Interleukin 13 gehören.

2.4.1.1. Proinflammatorische Zytokine

TNF-α

In experimentellen Modellen kann durch die Gabe von TNF-α ein sepsisähnliches Bild induziert werden und durch den Einsatz bei gesunden Probanden waren der Sepsis ähnliche Änderungen in Hämodynamik und Gerinnung zu dokumentieren (92-94). Ist die Konzentration von TNF-α und der von ihm induzierten proinflammatorischen Zytokine groß genug, können sie in der Zirkulation gefunden werden, wo sie die Aktivierung von Zellen - wie Lymphozyten und Monozyten - auslösen. Diese lassen letztendlich durch die Bildung weiterer Mediatoren das Geschehen zu einer systemischen Reaktion anwachsen. Die Höhe des TNF-Plasmaspiegels zeigte in der Studie von Cannon et al. eine deutliche Korrelation mit der Schwere der Erkrankung (95).

Eine generalisierte Wirkung von TNF-α beruht auf der Hemmung der Lipoproteinlipase-Aktivität, was über einen längeren Zeitraum zur Kachexie führt, daher das verwendete Synonym „Cachectin". TNF-α aktiviert die Synthese weiterer proinflammatorischer Zytokine wie IL-1, IL-6 und IL-8 und die Expression von Oberflächen- und Adäsionsmolekülen (96). Es steigert die Adhäsion der PMN auf Endothelzellen und trägt damit zum entscheidenden Schritt einer generalisierten endothelialen Inflammation in der Sepsis bei, die in eine zunehmende vaskuläre Hyperpermeabilität und in einen Schaden von Organsystemen mündet

(97). TNF-α erhöht die prokoagulatorische Aktivität des Endothels und induziert die Entstehung weiterer inflammatorischer Mediatoren, die das Inflammationsgeschehen perpetuieren: Prostaglandine, Thromboxane, Leukotriene, Plättchen-aktivierender Faktor, Stickstoffmonoxid und reaktive Sauerstoffspezies (98-100). Die Wirkung von TNF-α bleibt nicht nur auf die Zellen des Abwehr- und Gefäßsystems begrenzt, denn es werden in zahlreichen Organen TNF-α-Effekte gefunden (101-103).

Interleukin 1β

IL-1β hat ein dem TNF-α sehr ähnliches Wirkungsspektrum, des Weiteren induziert es die Freisetzung von Zytokinen wie TNF-α, IL-6 und IL-8.

IL-1β und TNF-α stimulieren die Synthese der Eicosanoide über eine gesteigerte Transkription der sekretorischen Form der Phospholipase A_2 ($sPLA_2$) sowie über eine Hochregulation der Cyclooxygenase (COX)-Expression. Ebenso bewirken sie die Freisetzung von Arachidonsäure (AA) aus dem Phospholipidpool. Durch eine Gabe von TNF-α im experimentellen Ansatz wird eine Potenzierung der IL-1β-Effekte erzielt (104-106).

Interleukin 6

IL-6 spielt im septischen Krankheitsgeschehen ebenfalls eine entscheidende Rolle. Von Fibroblasten, Monozyten, Endothelzellen, T- und B-Lymphozyten auf die Stimulation mit LPS, TNF-α, IL-1β und Interferon γ gebildet (107, 108) führt es in Hepatozyten zur Freisetzung von Akute-Phase-Proteinen. Zusätzlich beeinflusst es die Zellproliferation und die Differenzierung zytotoxischer T-Zellen und induziert die negative Rückkopplung auf die TNF-α- und IL-1-Freisetzung (109).

Interleukin 8 und *Interferon γ (IFN-γ)* werden ebenfalls wichtige inflammatorische Eigenschaften zugeschrieben: IL-8 gehört zur Familie der Chemokine und führt zu einer Steigerung der Chemotaxis, Degranulierung und Sauerstoffradikalen-Bildung in neutrophilen Granulozyten sowie zur Hochregulation endothelialer Adhäsionsmoleküle und damit der transendothelialen Migration (110). IFN-γ ist in die Regulation der Makrophagen-Differenzierung und das Priming humaner Monozyten, die in Folge ein gesteigertes Antwortverhalten auf eine LPS-Stimulation zeigen, involviert (111, 112).

Um das Ausmaß der Entzündungsreaktion quantitativ und zeitlich zu begrenzen und regenerative Prozesse zu ermöglichen, kommt es im Anschluss an die hyperinflammatorische Primärphase zu einer kompensatorischen hypoinflammatorischen Spätphase, die im Krankheitsgeschehen der Sepsis durch eine ausgeprägte Hyporeaktivität des Immunsystems - die Immunparalyse - gekennzeichnet ist und in welche die antiinflammatorischen Zytokine eng eingebunden sind (Abbildung 3). Nach Bone et al. wird dieser Zustand als CARS bezeichnet (13).

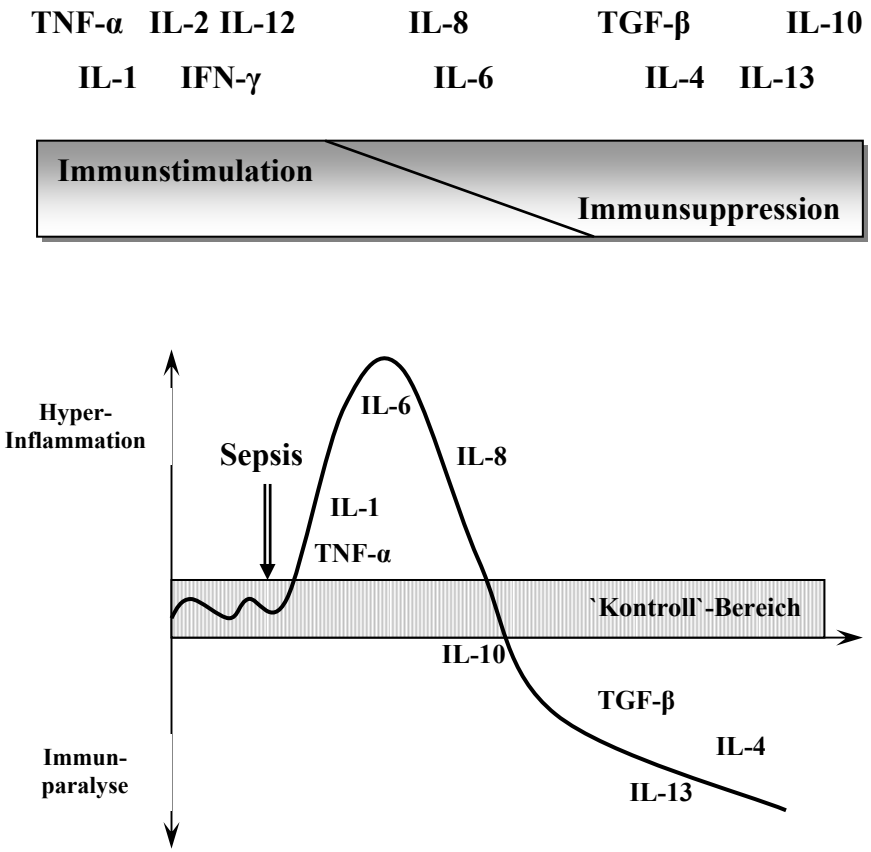


Abbildung 3: Postulierter biphasischer Verlauf des inflammatorischen Sepsisgeschehens

Unter der zeitlich versetzten Synthese pro- und antiinflammatorischer Zytokine kommt es als Folge einer infektiösen Stimulation zu einem biphasischen Sepsisverlauf: Die initiale hyperinflammatorische Immunantwort wird durch eine Immunparalyse mit ausgeprägter Hyporeaktivität der Abwehrmechanismen des Organismus abgelöst [Abbildung verändert aus Grimminger, F., Mayer, K., und Seeger, W.. Internist 1997].

2.4.1.2. Antiinflammatorische Zytokine

Die zwei wichtigsten antiinflammatorisch wirksamen Zytokine sind Interleukin 10 (IL-10) und Interleukin 13 (IL-13). Weitere antiinflammatorische Mediatoren auf Zytokinebene sind in Zytokinrezeptor-Antagonisten (z. B. IL-1ra) und löslichen Zytokinrezeptoren (z. B. sTNFR) vertreten.

IL-10 hemmt die Freisetzung der proinflammatorischen Zytokine aus Monozyten und Makrophagen, reguliert den löslichen IL-1-Rezeptor-Antagonisten hoch und hemmt die Bildung der induzierbaren NO-Synthetase (iNOS) und damit in Folge die NO-Produktion (113). Vergleichbares gilt für IL-13 (114-116).

2.4.2. Neutrophile Granulozyten

Die neutrophilen Granulozyten, auch polymorphkernige Neutrophile (PMN) genannt, machen etwa 55-65 % der zirkulierenden Leukozyten aus.

Neutrophile sind sehr stoffwechselaktiv und sowohl zur aeroben als auch zur anaeroben Glykolyse befähigt. Ihre Energiegewinnung erfolgt hauptsächlich durch anaerobe Glykolyse. Damit besitzen sie die Fähigkeit, auch in anaerober Umgebung, wie zum Beispiel in nekrotischem Gewebe, zu überleben, um dort an der Abwehr von Bakterien teilzunehmen.

Neutrophile Granulozyten stehen als mobile Effektorzellen in vorderster Linie der unspezifischen Immunabwehr und dienen im Besonderen der primären Abwehr von in den Organismus eingedrungenen Mikroorganismen. Als antimikrobielle granulozytäre Mechanismen sind vor allem Phagozytose der Mikroben mit Phagosomenbildung und die anschließende intrazelluläre Abtötung zu nennen. Hierbei wirken sauerstoffabhängige und sauerstoffunabhängige Mechanismen synergistisch (117). Entscheidend ist eine zuvor erfolgte Aktivierung der Granulozyten durch die unterschiedlichsten Stimuli sowie ein Erreichen des Ortes der Inflammation durch Transmigration und Chemotaxis. Für das „Spreading", eine Verformung der Granulozyten bei Adhäsion, die Transmigration, die Chemotaxis und die Phagozytose sind die kontraktilen Strukturen des Zytoskeletts der Zelle von Bedeutung.

Die durch einen Stimulus ausgelöste Kaskade granulozytärer Reaktionen ist einerseits essentiell für die Abwehr pathogener Mikroorganismen, andererseits kann eine inadäquate Form der Neutrophilenaktivierung zur Gewebsschädigung des Organismus führen (118).

2.4.2.1. Chemotaxis und Transmigration

Im Rahmen des inflammatorischen Prozesses erfolgt durch Mediatorenbildung oder durch die direkte Einwirkung eines mikrobiellen Stimulus (Exo- oder Endotoxin) die Aktivierung der Granulozyten, die zunächst am Endothel des betroffenen Kapillarbettes adhärent werden. In zahlreichen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass der PMN-Endothelzellen-Adhäsion ein sog. „Rolling" der PMN auf den Endothelzellen (EC) vorausgeht. Dabei handelt es sich um einen intermittierenden adhäsiven Kontakt der Neutrophilen mit der endothelialen Oberfläche. Hierbei spielen Adhäsionsmoleküle aus der Gruppe der Selektine eine entscheidende Rolle (119). Das „Rolling" der PMN wird durch Interaktion zwischen P-Selektin, das auf aktivierten Endothelzellen exprimiert wird, und dem PSGL-1 (P-selectin glycoprotein ligand-1), dem entsprechenden Gegenspieler auf der granulozytären Zelloberfläche, möglich (120, 121). E-Selektin wird auf der Membran aktivierter Endothelzellen exprimiert und reguliert die Adhäsion zwischen Blutzellen und dem Endothel (122).

Um eine vollständige Adhäsion und anschließende Transmigration der PMN zu erreichen, ist eine zweite Gruppe von Adhäsionsmolekülen notwendig. In den Granulozyten übernimmt die Familie der β_2-Integrine diese Rolle (123). Diese Integrine sind auf der Membran der neutrophilen Granula verankert und bilden die Liganden des interzellulären Adhäsionsmoleküls 1 (ICAM-1), lokalisiert auf der endothelialen Zelloberfläche (124).

Durch eine Aktivierung der Neutrophilen kommt es zur Fusion der Granulamembran mit der Zelloberfläche, so dass eine zunehmende Expression der β_2-Integrine auf der Zelloberfläche resultiert. Parallel kommt es zu einer Aktivierung der Integrine, die nun mit einer hohen Affinität an ICAM-1 binden können (125). Die Expression der Adhäsionsmoleküle ist durch Zytokine wie Interleukin 1, TNF-α und Interleukin 8 modulierbar (126).

Aufgrund der sich ausbildenden reversiblen interendothelialen Lücken können die Granulozyten den Intravasalraum verlassen (Transmigration) und entlang eines Konzentrationsgradienten chemotaktisch aktiver Substanzen, die am Inflammationsort gebildet werden, in Form gerichteter Bewegungen aktiv zum Infektionsherd wandern. Dieser Vorgang wird als Chemotaxis bezeichnet (127). Chemotaktisch wirkende Metabolite sind C5a, eine aktivierte Komponente des Komplement-Systems, und LTB_4, die beide im Rahmen der Antwort des Organismus auf Inflammation entstehen. Am Ende der Reaktionssequenz, die in Abbildung 4 zusammengefasst ist, steht die Ingestion der infektiösen Partikel.

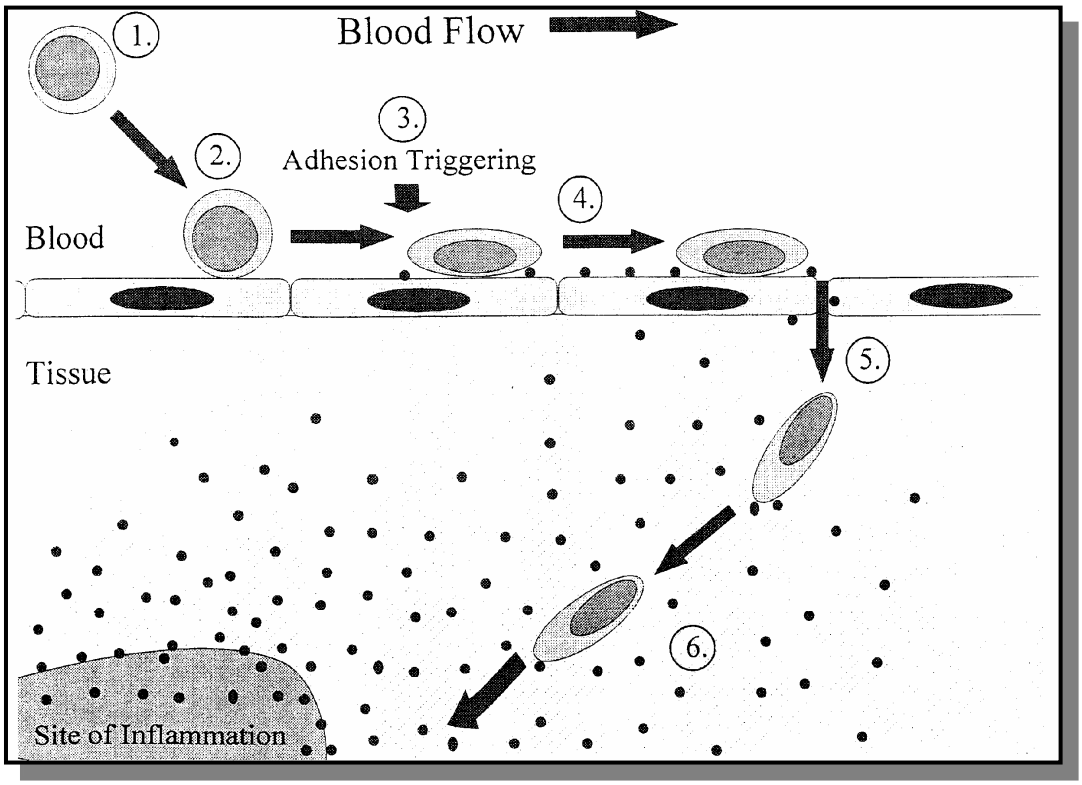


Abbildung 4: Modell der leukozytären Transmigration in inflammatorisches Gewebe

Dieses angenommene Modell basiert auf mindestens drei molekularen Interaktionen: Selektin, Chemokinrezeptor und Integrin-CAM. Die im Blut und der Lymphflüssigkeit zirkulierenden Leukozyten inspizieren die umgebende Endothelbarriere bezüglich spezifischer Signale, die auf einen inflammatorischen Fokus hinweisen (Schritt 1). Ist ein solcher Fokus identifiziert, bedarf es einer Reihe von Signalen, um ein Übertritt der Leukozyten in das extravaskuläre Gewebe zu ermöglichen. Mit der Freisetzung von inflammatorischen Mediatoren, wie Interleukin 1, TNF, LPS, Thrombin oder Histamin, werden verschiedene Selektin-Liganden rasch zur Plasmamembran der aktivierten Endothelzellbarriere verschoben. Selektine mediieren das „Rolling" der aktivierten Leukozyten auf der Blutgefäßwand, ihre Geschwindigkeit verlangsamend (Schritt 2). Durch die Interaktion mit proadhäsiven Signalen (Schritt 3), wie Proteoglycan- oder extrazellulär gebundenen Chemokinen, werden die Integrin-Moleküle auf der Leukozytenoberfläche von einem inaktiven in ein hochaktives Stadium gebracht, welches die Bindung der Leukozyten an verschiedene Zelladhäsionsmoleküle, die auf der Oberfläche der inflammatorischen Endothelzellen exprimiert werden (wie ICAM-1, VCAM-1 u. a.), ermöglicht (Schritt 4). Zu diesem Zeitpunkt wird das Leukozyten-Rolling unterbrochen – die stabile Adhäsion beginnt. Die adhärenten Leukozyten verteilen sich auf der aktivierten Endothelfläche und migrieren mit Hilfe von Metalloproteasen und zahlreichen weiteren Agentien in das extravaskuläre Gewebe (Schritt 5). Die sich nun anschließende gerichtete Migration der Leukozyten vom Ort der niedrigeren Chemokin-Konzentration zum Ort der Chemokin-Bildung wird von einem Konzentrationsgradienten der löslichen sowie Matrix-gebundenen Chemokine initiiert (Schritt 6) [Abbildung verändert aus Taub, D. D.. 1996. Chemokine-Leukocyte interactions. In: Cytokine & Growth Factor Reviews. Vol.7, No. 4, pp. 335-376].

2.4.2.2. Phagozytose

Die Ingestion von Mikroorganismen bzw. deren Bestandteilen wird als Phagozytose bezeichnet. Sie wird durch eine Opsonierung der bakteriellen Oberfläche mittels spezifischer Immunglobuline oder Komplementfaktoren erleichtert.

Solange die Granulozyten im Blut zirkulieren, sind sie rund. Bei Kontakt mit einem Partikel oder einer Oberfläche verändern sie ihre Form: Sie beginnen sich auszubreiten (sog. „Spreading") und Zytoplasmafortsätze (Pseudopodien) in verschiedene Richtungen auszubilden. Die Pseudopodien umgeben dann den Fremdkörper und verschmelzen miteinander. Die entstandene Vakuole, auch Phagosom genannt, enthält den Fremdkörper. Sobald das Phagosom in das Zellinnere gewandert ist, treten in der Zelle enthaltene abgeschlossene sekretorische Kompartimente, sog. Granula, heran: Die Membranen der Kompartimente verschmelzen miteinander und ihr Inhalt vermischt sich. Die Abtötung und Verdauung der Mikrobe durch hydrolytische und bakterizide Substanzen sowie toxische Sauerstoffspezies sind die Folge. Dabei bleibt stets eine Membran gegenüber dem umgebenden Zytoplasma erhalten, das auf diese Weise vor den degradierenden Enzymen der Granula geschützt bleibt (128, 129).

2.4.2.3. Degranulierung

Proteolytische Enzyme der unterschiedlichsten Funktionen sind in den Granula der Granulozyten enthalten. Die Freisetzung der Enzyme erfolgt entweder während der Phagozytose und Mikrobenabwehr durch Fusion der Granulamembran mit dem Phagosom oder durch Fusion mit der Zellmembran, woraus eine Enzymfreisetzung in das umgebende Gewebe resultiert. Dies kann im Rahmen einer gesteuerten Chemotaxis von Bedeutung sein, aber auch bei mangelnder Kontrolle zu einer konsekutiven Degeneration von extrazellulärer Matrix und zur Ausbildung einer Nekrose führen, wie es in überschießenden inflammatorischen Prozessen beobachtet wird (130-132).

Während der Granulopoese bilden sich die für diese Zellen typischen Granula aus. Basierend auf der Abfolge ihres Erscheinens während der Zellreifung und auf den biochemischen Unterschieden ihrer Substanzen wird zwischen drei Klassen von Granula differenziert:

Primäre oder azurophile Granula entstehen bereits im Promyelozytenstadium, ihre Zahl nimmt mit jeder folgenden Zellteilung ab. Sie enthalten in erster Linie neutrale Proteasen (Elastase, Cathepsin G, Proteinase, Cathepsin D), Myeloperoxidase, saure Hydrolasen (saure

Phosphatase, α-Mannosidase, β-Glucuronidase, N-Acetyl-β-Glucosaminidase) sowie verschiedene bakterizide kationische Proteine (wie das bactericidal/permeability-increasing protein = BPI), die Endotoxin neutralisieren und gramnegative Bakterien abtöten. Die Inhaltsstoffe der primären Granula dienen insbesondere der Inaktivierung von phagozytierten Mikroorganismen, werden jedoch auch mit der Pathogenese von Gewebeschäden und der Degeneration extrazellulärer Matrix im Rahmen überschießender inflammatorischer Prozesse in Zusammenhang gebracht (133-136).

Sekundäre oder spezifische Granula, welche zu einem späteren Zeitpunkt der Granulopoese im Myelozyten entstehen, beinhalten Stoffe, die bevorzugt in den Extrazellularraum freigesetzt werden und damit einen Beitrag zur extrazellulären Bakterizidie gegenüber nicht phagozytierbaren Keimen leisten (132). Neben Lysozym enthalten sie Kollagenase, der im Rahmen der gerichteten Bewegung des Granulozyten zum Infektionsort eine wichtige Bedeutung zukommt. Durch eine gerichtete Degranulation am Vorderpol der Zelle kommt es aufgrund der gewebedegradierenden Funktion der Kollagenase zur Auflockerung der Bindegewebsfasern, welche die interstitielle Mobilität aktivierter PMN behindern. Des Weiteren speichern diese Granula Lactoferrin und Vitamin B_{12}-bindendes Protein und können damit Mikroorganismen einen Teil der essentiellen Nährstoffe entziehen (137). In der Wand der Granula sind Rezeptor- und Oberflächenmoleküle (fmlp-Rezeptor, Fibrinogen-Rezeptor, Adhäsionsmoleküle) lokalisiert, die nach adäquater Stimulation durch Membranfusion der Granula an die Zelloberfläche transloziert werden und damit entsprechenden Liganden zur Verfügung stehen (137, 138).

Tertiäre Granula erscheinen gegen Ende der Zellreifung im Zytosol und sind bislang nur unvollständig charakterisiert. Ein spezifischer Bestandteil ist die Gelatinase, die eine der Kollagenase sehr ähnliche, Matrix-degradierende enzymatische Funktion besitzt (139, 140).

2.4.2.4. Produktion reaktiver Sauerstoffspezies - „respiratorischer Burst“

Eine Zunahme des granulozytären Sauerstoffverbrauchs bis zu einem Faktor von 50-100 des Basalwertes nach Stimulation der Granulozyten konnte bereits in Arbeiten von Baldrige et al. 1933 dokumentiert werden (141). Dieser „respiratorische Burst“ mündet in die Bildung reaktiver Sauerstoffmetabolite (ROS = reactive oxygen species), die der Abtötung ingestierter Mikroben dienen (142).

Die Synthese dieser Substanzen beruht auf einer Aktivierung der an die Zellmembran gebundenen NADPH-Oxidase. Hierbei handelt es sich um einen auf mehreren Ebenen regulierbaren Multienzymkomplex, welcher einerseits aus einer Cytochrom b-abhängigen membranständigen Komponente ($gp91^{phox}$, $p22^{phox}$, rap1a), die als Elektronenakzeptor fungiert, andererseits aus mehreren zytosolischen Proteinen ($p47^{phox}$, $p67^{phox}$ und $p21_{rac}$) besteht (143). Während diese einzelnen Komponenten in unstimulierten Granulozyten dissoziiert und damit inaktiv vorliegen, findet nach adäquater Stimulation der Zelle eine Translokation der zytosolischen Proteine an die Plasmamembran und eine Assoziation mit der membranständigen Komponente statt. Hierbei werden kontraktile Elemente des Zytoskeletts sowie die Proteinkinase C-abhängige Phosphorylierung einbezogen. Folge ist die Aktivierung der NADPH-Oxidase (144), die den Transfer eines Elektrons zum Sauerstoff katalysiert, wodurch unter Verwendung von im Pentosephosphatweg gebildetem NADPH Superoxidanionen (O_2^-) entstehen:

$$\mathbf{NADPH + H^+ + 2O_2 \rightarrow NADP^+ + 2H^+ + 2O_2^-}$$

Diese primären Produkte des „respiratorischen Burst“ besitzen selbst nur sehr geringe mikrobizide Eigenschaften und dienen als Vorstufe wesentlich reaktiverer Sauerstoffspezies.

So findet im weiteren Verlauf die spontante Dismutation zu Hydrogenperoxid (H_2O_2) statt:

$$\mathbf{2O_2^- + 2H^+ \rightarrow O_2 + H_2O_2}$$

Das Hydrogenperoxid weist ebenfalls nur eine geringe antimikrobielle Potenz auf und stellt die molekulare Vorstufe des hochtoxischen Hydroxylradikals (OH•) dar, das in Gegenwart von Fe^{2+}-haltigem Lactoferrin, einem Inhaltsstoff der sekundären Granula, generiert wird. Ebenso erfolgt in Gegenwart von Hydrogenperoxid und mit Myeloperoxidase als Katalysator die Oxidation von Chlorid und damit die Bildung von Hypochlorsäure (HOCl):

$$\mathbf{H_2O_2 + Cl^- + H^+ \rightarrow HOCl + H_2O}$$

Hypochlorsäure ist ein starkes Oxidationsmittel, das mit Ammonium oder Aminen reagieren kann und damit zur Entstehung von reaktionsfähigen Chloraminen führt.

Die Bildung von HOCl ist nur durch die gleichzeitige Anwesenheit von Sauerstoffradikalen – entstanden durch den „respiratorischen Burst“ – und Granulaenzymen – im Rahmen der

Degranulation freigesetzt – möglich, was die synergistische Wirkung beider Systeme veranschaulicht.
Die über diesen Reaktionsweg entstandenen reaktiven Komponenten zeigen ihre destruktiven Potentiale auf unterschiedliche Weise: Einerseits reagieren sie direkt mit den Proteinen, Nukleinsäuren oder Membranlipiden; andererseits inaktivieren sie endogene Proteaseinhibitoren wie α_1-Antitrypsin und ermöglichen damit die maximale Wirkung granulozytärer Proteasen.
Den reaktiven Sauerstoffspezies und den granulozytären Proteasen wird eine Schlüsselrolle in der Pathogenese von Gewebsdestruktionen bei entgleisten Entzündungsreaktionen zugeschrieben (145).

Um die Reaktionen der Granulozyten nach Aktivierung in einer koordinierten zeitlichen und räumlichen Sequenz ablaufen zu lassen, sind regulierende Mechanismen, systemisch und lokal wirkend, erforderlich. Der Granulozyt trägt auf seiner Oberfläche ein je nach Aktivierungszustand variierendes Sortiment von Rezeptorstrukturen. Bei adäquater Stimulation durch Mediatoren wird das spezifische Reaktionsmuster der Granulozyten initiiert (141, 146). Solche inflammatorische Mediatoren sind Produkte der Prokaryonten (Formylpeptide, Endo-, Exotoxine), Plasmabestandteile (Komplement-System, Produkte der Gerinnungskaskade) sowie von stimuliertem Wirtsgewebe und Leukozyten synthetisierte Substanzen (Zytokine, Lipidmediatoren). Die Entzündungsmediatoren führen über eine Okkupation des entsprechenden Rezeptors zur Induktion der Signaltransduktion in der Zielzelle mit Entstehung der sekundären Botenstoffe Diacylglycerol (DAG) und Inositoltriphosphat (IP_3).
Eine besondere Stellung nehmen Zytokine und Lipidmediatoren ein, welche die inflammatorische Granulozytenantwort auch durch autokrine und parakrine Mechanismen regulieren (147).

2.4.2.5. Lipidmediatoren

Eine zentrale Rolle in der auto- und parakrinen Regulation des inflammatorischen Granulozytenverhaltens spielen biologisch aktive Lipide: die Lipidmediatoren. Zu ihnen zählen in erster Linie die Oxygenierungsprodukte der Arachidonsäure (Eicosanoide = Lipoxygenase-, Cytochrom P_{450}- und Cyclooxygenase-Metabolite) sowie acetylierte Derivate des Membranphospholipids Phosphatidylcholin, wie Plättchen-aktivierender Faktor (PAF).

Voraussetzung für die Generation von Lipidmediatoren ist der Präkursor Arachidonsäure (AA), eine vierfach ungesättigte ω-6-Fettsäure mit 20 Kohlenstoffatomen, deren letzte Doppelbindung sechs Kohlenstoffatome vom Methyl-Ende entfernt ist (C20:4ω-6). Sie liegt in den Membranphosphoglyzeriden an der sn-2-Position in veresterter Form vor (148). Für die Synthese der Oxygenationsprodukte ist die Freisetzung der AA aus dem Membrankompartiment notwendig, die durch kalziumabhängige Aktivierung einer oder mehrerer Phospholipasen erfolgt (149-151).

Freie Arachidonsäure kann über verschiedene Oxygenasen sowie einen Cytochrom P_{450}-abhängigen Metabolismus zu bioaktiven Metaboliten verstoffwechselt werden: Nach dem Enzym, das die erste Oxygenation der AA einleitet, unterscheiden sich die Cyclooxygenase-, die Lipoxygenase- und die Cytochrom P_{450}-Produkte. Die Gruppe der Cyclooxygenase-Metabolite wird nachfolgend im Zusammenhang mit der thrombozytären Komponente der Immunantwort beschrieben.

2.4.2.5.1. Oxygenierungsprodukte der Arachidonsäure - Lipoxygenase-Metabolite

Zu Beginn dieses Metabolismus erfolgt der durch Lipoxygenase (LO) katalysierte Einbau eines Sauerstoffmoleküls in die Arachidonsäure. Es werden, je nachdem an welchem C-Atom die O_2-Addition erfolgt, 5-, 12- und 15-Lipoxygenase sowie weitere Enzymformen unterschieden. Die verschiedenen Zelltypen zeigen eine differente Ausstattung mit diesen Enzymen: So besitzen Leukozyten und Makrophagen hauptsächlich 5- und 15-LO, Thrombozyten, Mast- und Epidermiszellen insbesondere 12-LO.

Von besonderem Interesse sind die Metabolite des 5-Lipoxygenase-Weges: die biologisch aktiven Leukotriene (LT) und Hydroxyeicosatetraensäuren (HETE). Dieser Metabolismus wird in Abbildung 5 zusammengefasst.

5-Lipoxygenase-Metabolismus

Den initialen Schritt der Synthese der 5-Lipoxygenase-Metabolite bildet die enzymatisch katalysierte Dioxygenierung der freien Arachidonsäure am 5. Kohlenstoffatom. Die hierfür benötigte 5-LO ist ein ATP-stimuliertes Enzym, dessen Aktivität durch einen Anstieg des intrazellulären Ca^{2+} getriggert wird und an die Translokation des Enzyms vom Zytosol zur Membran gebunden ist (152-154). In diese Ca^{2+}-abhängige 5-LO-Membranassoziation ist das „Five-Lipoxygenase-Activating-Protein" (FLAP) involviert. Experimentelle Untersuchungen konnten zeigen, dass dieses Protein für die Eicosanoidsynthese aus endogener AA, nicht jedoch aus exogener AA, notwendig ist (155).

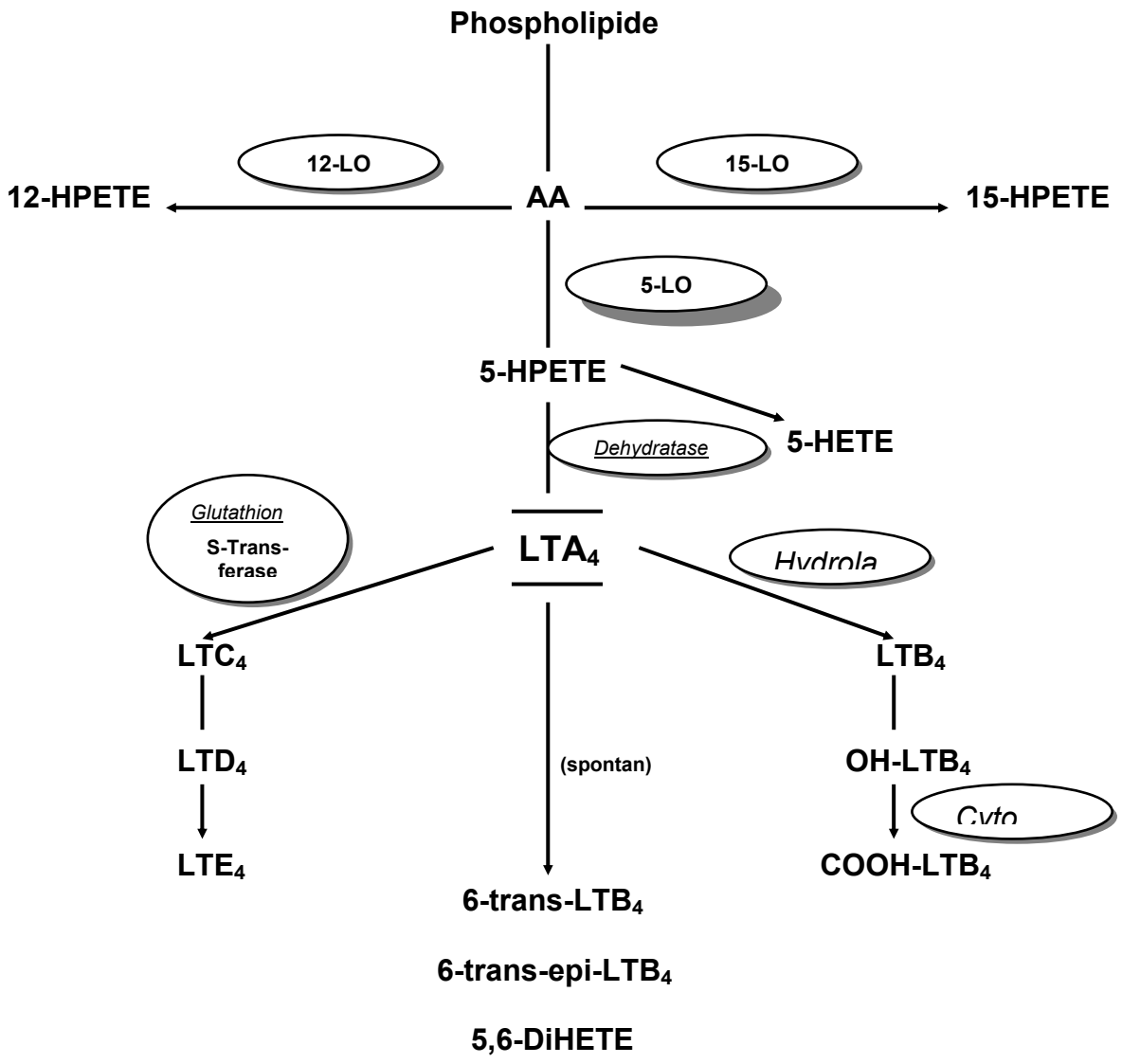


Abbildung 5: Schematische Darstellung des 5-Lipoxygenase-Metabolismus der AA

Dargestellt ist die Synthese des LTB_4 und der Cysteinylleukotriene LTC_4, LTD_4, LTE_4 aus dem instabilen Intermediaten LTA_4. Der mit der enzymatischen Umsetzung konkurrierende Spontanzerfall des LTA_4 zu den diastereomeren Paaren des 5,6-DiHETE und des 6-trans-LTB_4 ist in der Bildmitte skizziert. Die initialen Metabolismuswege dieser biologisch aktiven Eicosanoide sind ebenfalls angedeutet. Das Schlüsselenzym dieses AA-Metabolismus – die 5-Lipoxygenase – wird bei Zellaktivierung vom Zytosol zur Zellmembran transloziert und kann hier mit der aus den Phospholipiden freigesetzten AA interagieren.
Die verantwortlichen Enzyme für die Umwandlung von LTC_4 in LTD_4 und LTE_4 sind Peptidasen, für die ω-Oxidation von LTB_4 ist ein NADPH-abhängiges Cytochrom P_{450}-Enzym (Cyto P_{450}) zuständig.
Angedeutet sind die Stoffwechselwege der 12-Lipoxygenase in Thrombozyten sowie der 15-Lipoxygenase. Zellen, die sowohl 5-LO wie auch 15-LO enthalten, können AA in das Doppel-Lipoxygenase-Produkt 5,15-DiHETE umwandeln.
(HPETE = Hydroperoxyeicosatetraensäure, HETE = Hydroxyeicosatetraensäure)

Als Folge der 5-LO-Aktivierung entsteht das instabile Hydroperoxid 5-HPETE, das einerseits durch eine Peroxidase in die Monohydroxyfettsäure 5-HETE umgewandelt werden kann; andererseits mit Hilfe einer Dehydratase zum instabilen Epoxid Leukotrien A_4 (LTA_4) metabolisiert wird (156). 5-HETE besitzt durch die Möglichkeit seines Einbaus in die freie Position eines Membranlipids eine membranmodifizierende Eigenschaft (157). Weiterhin weist diese Monohydroxyfettsäure auch direkte biologische Effekte auf, wie eine chemotaktische Wirkung auf humane Granulozyten und eine dramatische Amplifikation der PAF-induzierten Leukozytendegranulation (158, 159).

LTA_4 ist ein extrem instabiles Epoxid mit einer Halbwertszeit von 2-5 sec und kann je nach zellspezifischer Enzymausstattung über zwei Stoffwechselwege metabolisiert werden:

- Makrophagen und Granulozyten verfügen über die hohe Aktivität einer zytoplasmatischen LTA_4-Hydrolase, die die Epoxidspaltung zum biologisch hochaktiven LTB_4 katalysiert (160, 161). Dieser Lipidmediator spielt eine entscheidende Rolle in einer Reihe von zellulären und molekularen Antworten, die inflammatorische Abläufe koordinieren und amplifizieren. LTB_4 besitzt im Vergleich zu 5-, 12- und 15-HETE den stärksten chemotaktischen Effekt auf neutrophile Zellen. Es aktiviert die PMN-Chemotaxis bereits in Konzentrationen im picomolaren Bereich (162). Ebenso induziert es eine gesteigerte PMN-Adhäsion an Endothelzellen (163, 164). Im Rahmen der PMN-Aktivierung wird diesem Metaboliten eine Steuerung der Degranulation und der Bildung von toxischen Sauerstoffradikalen zugeschrieben. So konnte in zahlreichen Versuchen gezeigt werden, dass Granulozytenaktivatoren, wie A23187 und fmlp, ihre Effekte auf Granulozyten indirekt über endogen gebildetes LTB_4 ausüben (165-168). Hinzu kommt eine direkte immunmodulatorische Eigenschaft dieses Leukotriens: Es stimuliert *in vitro* die monozytäre Zytokinsynthese und wirkt proliferativ auf T-Lymphozyten (169-172). Der Abbau von LTB_4 erfolgt intrazellulär über eine Cytochrom P_{450}-abhängige ω-Oxidation. Es entstehen die inaktiven Metabolite ω-Hydroxy- und ω-Carboxy-LTB_4 (173).
- In Eosinophilen, Mastzellen und Endothelzellen überwiegt dagegen eine für LTA_4 spezifische Glutathion-S-Transferase-Aktivität, die die Bildung der Cysteinylleukotriene LTC_4, LTD_4 und LTE_4 bewirkt (174). Während sämtliche Schritte der LTB_4- und LTC_4-Synthese zytoplasmatisch ablaufen, ist die Synthese von LTD_4 und LTE_4 funktionell mit der Zellmembran und den Sekretgranula assoziiert (175). Cysteinylleukotriene, deren biologische Aktivität als „slow reacting substance of anaphylaxis" charakterisiert wurde, entfalten ihre Wirkung vor allem an glatten Muskelzellen und besitzen schon in niedriger

Konzentration eine ausgeprägte vaso- und bronchokonstriktive Aktivität. Durch eine postkapilläre Betonung der Vasokonstriktion kommt es zu Plasmaexsudation und Ödembildung. Darüber hinaus können die Cysteinylleukotriene in einigen Mikrozirkulationsgebieten direkt eine Erhöhung der endothelialen Permeabilität induzieren (176, 177). Die Elimination der Cysteinylleukotriene erfolgt vor allem biliär über ein spezifisches Transportsystem nach vorausgegangener N-Acetylierung und ω-Oxidation zu den inaktiven Sulfoxiden (178).

Erfolgt kein LTA_4-Metabolismus über einen dieser beiden Wege, wird LTA_4 über eine nichtenzymatische Hydrolyse zu den biologisch inaktiven diastereomeren Paaren des 6-trans-LTB_4 und des 5,6-diHETE metabolisiert (179).

Wesentliche Funktionen der Leukotriene in der Inflammation sind in der Tabelle 2 zusammengefasst:

Lipidmediator	**Biologische Funktion**
5-HETE	- PMN-Aktivierung - Aktivierung der $cPLA_2$ (zytosolische PLA_2) - Chemotaxis
12-HETE	- Chemotaxis - Cyclooxygenase-Inhibition - Mukussekretion
15-HETE	- Inhibition der 5-, 12-LO sowie der Cyclooxygenase - Mukussekretion
Leuktotrien A_4	- instabiler Intermediat der Synthese des LTB_4 und der Cysteinylleukotriene
Leukotrien B_4	- PMN-Aktivierung als autokriner Mechanismus - Aktivierung der $cPLA_2$ und der PAF-Synthese - Chemotaxis - Steuerung der Degranulation und des respir. Burst - Stimulation der monozytären Zytokinsynthese - Stimulation der T-Lymphozyten-Proliferation
Cysteinylleukotriene LTC_4, D_4, E_4	- Mukussekretion - Vasokonstriktion - Bronchospasmus - Plasmaexsudation

2.4.2.5.2. Plättchen-aktivierender Faktor

Anfang der 70er Jahre wurde eine Substanz beschrieben, die nach ihrer Freisetzung aus Leukozyten, welche mit einem spezifischen Antigen stimuliert wurden, dazu in der Lage war, eine Thrombozytenaggregation auszulösen (180). Die chemische Struktur des Plättchen-aktivierenden Faktors (PAF) wurde 1979 erstmals der Lipidklasse 1-0-alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholin zugeordnet (181). Der über eine Etherbindung mit der C_1-Position des Glyceringrundgerüsts verbundene Alkylrest ist prinzipiell variabel, am häufigsten ist jedoch eine Kohlenstoffkette von 16 oder 18 C-Atomen vertreten. Weiterhin charakteristisch ist das Vorhandensein einer Acetylgruppe in C_2-Position.

Die Struktur des PAF-Moleküls ist in Abbildung 6 skizziert.

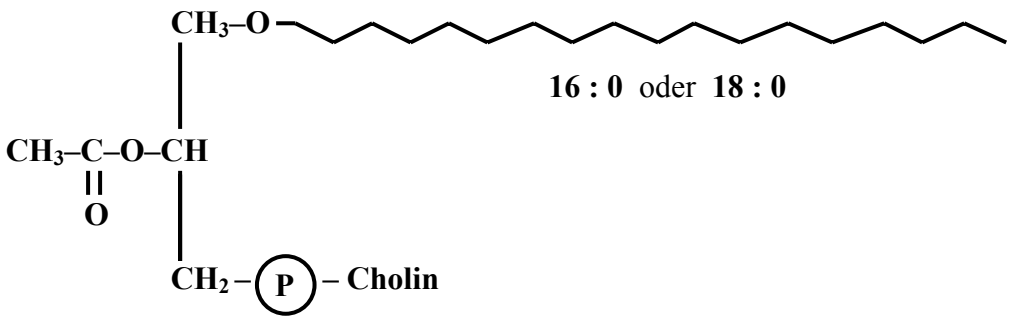


Abbildung 6: Struktur des Plättchen-aktivierenden Faktors (PAF)

Die vereinfachte Strukturformel hebt die im Text angesprochenen Charakteristika von PAF hervor, wobei die Zick-Zack-Linie in Position 1 des Glyceringrundgerüsts den aliphatischen Alkylrest mit variabler Kettenlänge von 16 oder 18 C-Atomen darstellt. (P)-Cholin symbolisiert die über eine Phosphorsäurediesterbrücke mit dem Glycerin verbundene Phosphorylcholin-Gruppe.

Plättchen-aktivierender Faktor ist ein potenter Phospholipidmediator der Inflammation und wird von stimulierten Leukozyten, Plättchen sowie Makrophagen intrazellulär gebildet (182-184).

Das Ausgangssubstrat der PAF-Synthese stellt das Membranphospholipid 1-0-alkyl-2-acyl-glycerol-3-phosphocholin dar. Die Einleitung der PAF-Synthese erfolgt über die kalziumabhängige Aktivierung der zytosolischen Phospholipase A_2 ($cPLA_2$), indem die Esterbindung in der C_2-Position des PAF-Präkursors hydrolysiert wird. Neben dem entstehenden instabilen Zwischenprodukt Lyso-PAF wird zu einem gewissen Prozentsatz Arachidonsäure frei, die nun als Präkursor der Eicosanoidsynthese zur Verfügung steht. Unter der Katalyse der membrangebundenen Acetyltransferase wird Lyso-PAF an der C_2-Position acetyliert, wobei Acetyl-CoA als Essigsäuredonator fungiert. Die Acetyltransferase stellt das Schlüsselenzym der PAF-Synthese dar und unterliegt der Regulation durch Proteinkinase C (PKC). Im phosphorylierten Zustand besitzt sie die maximale Aktivität.

Die Inaktivierung von PAF erfolgt durch enzymatische Rekonversion zu seinem Präkursor. Die dabei beteiligten Enzyme Acetylhydrolase und Acyltransferase zeigen, im Gegensatz zu den kalziumabhängigen Enzymen der PAF-Synthese, eine antiproportionale Beziehung zum zytoplasmatischen Kalziumspiegel. Dieser gegenläufige Effekt des Ca^{2+} auf Synthese und Abbau bewirkt, dass im Falle der Zellaktivierung der Metabolismus in Richtung der PAF-Synthese läuft (182). Das bizyklische System des PAF-Metabolismus ist in Abbildung 7 wiedergegeben.

PAF besitzt eine Vielzahl von biologischen Wirkungen. Seine proinflammatorischen Eigenschaften bestehen insbesondere in Leukozytenaktivierung, Chemotaxis sowie Induktion von Degranulierung, Sauerstoffradikalen-Bildung und Aktivierung der Eicosanoidsynthese in Granulozyten (185-188). Der Plättchen-aktivierende Faktor spielt eine Schlüsselrolle in der Aktivierung der Leukozytenadhäsion und der darauf folgenden Diapedese durch das Gefäßendothel (189). Hinzu kommt die Induktion der Plättchenaggregation und die Funktion als Vasodilatator und potenter Bronchokonstriktor (190, 191). Neben den Thrombozyten exprimieren auch andere Zelltypen (Monozyten, Makrophagen, Granulozyten) PAF-Rezeptoren und besitzen damit die Fähigkeit, auf exogenes PAF zu reagieren.

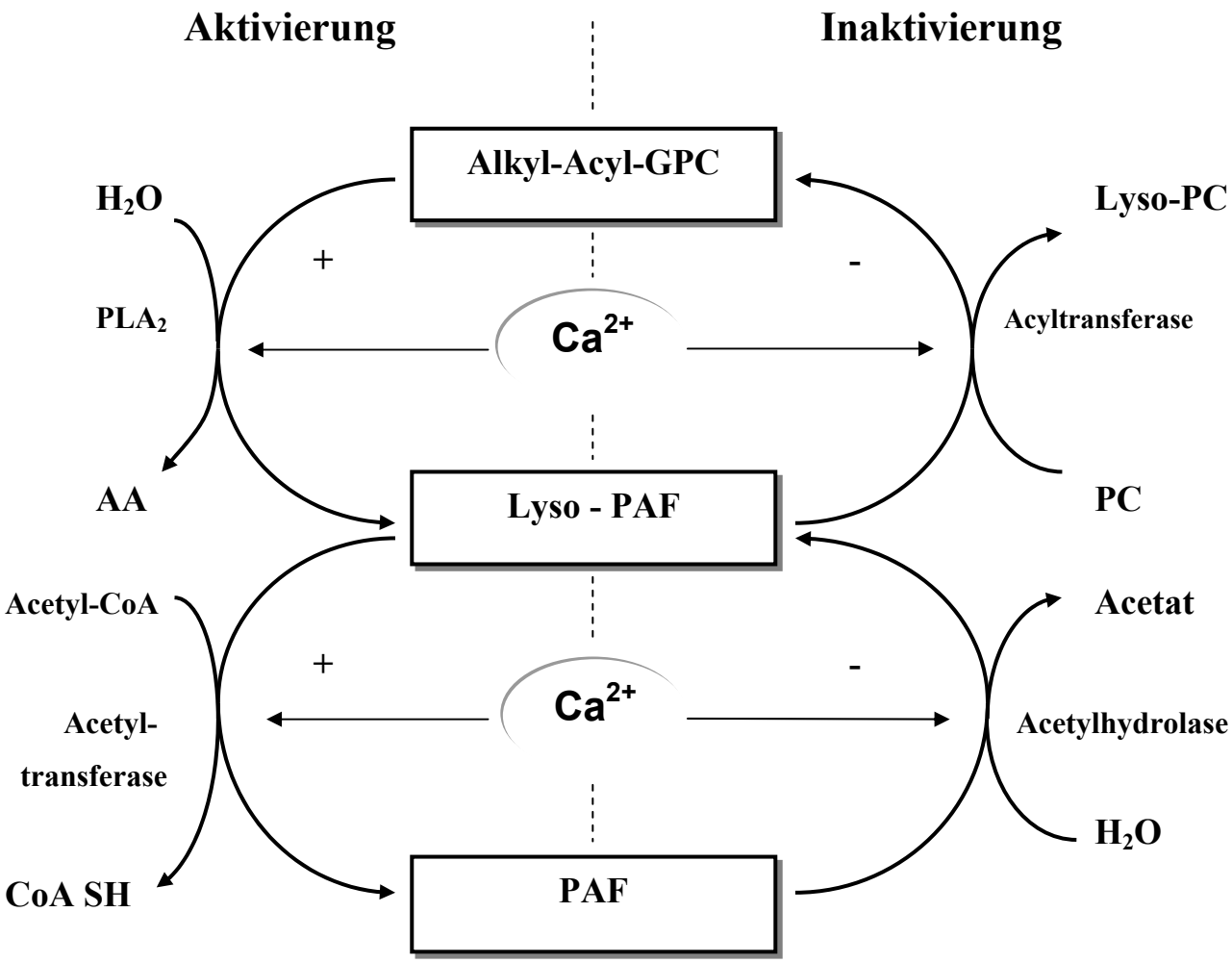


Abbildung 7: Deacylierungs-Reacylierungs-Zyklus des PAF-Metabolismus

In der linken Bildhälfte ist die stimulusinduzierte Sequenz der PAF-Synthese dargestellt. Ein Anstieg des intrazellulären Kalziumspiegels führt über die Aktivierung der Phospholipase A_2 zur Freisetzung von Arachidonsäure aus dem Membranphospholipid 1-alkyl-2-acyl-GPC. Der dabei entstehende Intermediat Lyso-PAF wird über den Einbau einer Acetylgruppe zum Lipidmediator PAF. In der rechten Bildhälfte ist die Inaktivierung über die enzymatische Rekonversion zu Lyso-PC gezeigt.
(AA = Arachidonsäure; CoA = Coenzym A; GPC = Glycerophosphorylcholin; PAF = Plättchen-aktivierender Faktor; PC = Phosphorylcholin; PLA_2 = Phospholipase A_2)

2.4.2.6. Zellaktivierung und „second messenger-generation": Bildung von Inositolphosphaten

Kalziumionen sind wesentliche Faktoren der sekretorischen Reaktion aktivierter Granulozyten in der Inflammation. Sie sind eingebunden in eine Sequenz von Transduktionsmechanismen – so konnte gezeigt werden, dass die alleinige Anhebung der intrazellulären Ca^{2+}-Konzentration für die Auslösung bestimmter Verhaltensmuster nicht ausreichend ist (192). Vielmehr ist die exakte Koordination des Ca^{2+}-Effektes mit anderen Faktoren des Inositolphosphat-Syntheseweges eine wichtige Voraussetzung für die effiziente Aktivierung des Granulozyten. Es wird ein synergistisches Prinzip zwischen zytoplasmatischen Ca^{2+}-Verschiebungen, Aktivität der Proteinkinase C und zytoskelettalen Elementen angenommen (146).

G-Proteine

Durch Bindung von Entzündungsmediatoren an entsprechende Rezeptoren kommt es zu deren Konformationsänderung, was eine Sequenz von Transduktionsmechanismen induziert. Ziel ist nicht nur die Weiterleitung des Signals an spezifische intrazelluläre Effektorsysteme, sondern auch die Signalverstärkung, was dadurch gewährleistet ist, dass aktivierte Rezeptoren mehrere verschiedene Transduktionskomponenten stimulieren können.

Im Falle einer Stimulation des Granulozyten durch Bindung von fmlp, PAF, LTB_4 und C5a an den spezifischen Rezeptor erfolgt die Aktivierung eines zwischengeschalteten Proteins, des sog. G-Proteins, das zur Familie der GTP-bindenden Proteine zählt (146, 192). Dieses Protein besitzt eine hochaffine Bindungsstelle für GTP, an der nach Rezeptorokkupation GDP durch GTP ersetzt wird, was eine Aktivierung des zellulären Effektors Phospholipase C (PLC) zur Folge hat (193). Durch eine endogene GTPase wird über Hydrolyse GTP zu GDP umgewandelt, wodurch die Interaktion mit dem Effektor terminiert ist (194).

„Second messenger-generation"

Die über den geschilderten Mechanismus aktivierte PLC ist für die Bildung der „second messenger" aus den inositolhaltigen Phospholipiden der Zellmembran notwendig. In der als „PI-response" bezeichneten Reaktion entstehen mit Hilfe spezifischer Phospholipasen C aus Inositiden korrespondierende Inositolphosphate unter Bildung von Diacylglycerol (DAG). Es wird die Übertragung des Reizsignals vom aktivierten Rezeptor auf die Phospholipase C durch ein G-Protein vermutet (195).

Im Mittelpunkt des Signaltransduktionsmechanismus der „PI-response" steht die durch Phospholipase C katalysierte Hydrolyse von Phosphatidylinositol-4,5-diphosphat (PIP_2) zu DAG und Inositol-1,4,5-triphosphat (IP_3). Weitere Substrate stellen die Inositide Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat (PIP_3), Phosphatidylinositol-4-monophosphat (PIP) und verzögert Phosphatidylinositol (PI) dar. Es wird die Katalyse der Inositide durch PLC unterschiedlicher Spezifität angenommen. Resultat ist die Bildung der korrespondierenden Inositolphosphate und DAG.

Bislang konnte nur für Inositol-1,4,5-triphosphat (IP_3) und DAG eine Funktion als zytoplasmatische „second messenger" nachgewiesen werden. Inositide machen quantitativ ungefähr 5-6 % der granulozytären Membranlipide aus, wovon Phosphatidylinositol (PI) 95 % repräsentiert und Phosphatidylinositol-4,5-diphosphat (PIP_2) als zentrales Signallipid einen Anteil von 1,5 % stellt (196).

Die Inaktivierung der beiden „second messenger" DAG und IP_3 erfolgt über jeweils zwei Alternativwege: DAG kann einerseits durch DAG-Kinase zu Phosphatidsäure phosphoryliert werden, wodurch die Resynthese des Membraninositids eingeleitet wird. Andererseits wird DAG durch DAG-Lipase zu Monoacylglycerol hydrolysiert, wodurch es zur Freisetzung des Eicosanoidpräkursors Arachidonsäure kommt, welche in über 70 % der Inositollipide in der sn-2-Position enthalten ist (197, 198). Damit können durch diese Hydrolyse Substrate für verschiedene Mediatorsysteme entstehen.

IP_3 kann durch das Kinase C-aktivierbare Schlüsselenzym seiner Inaktivierung, die IP_3-Phosphatase, zu IP_2 umgewandelt und in weiteren Phosphatasereaktionen sequentiell bis zu Inositol dephosphoryliert werden (199). Das letzte Enzym dieser Sequenz, die IP_1-Phosphatase, ist durch Lithiumionen hemmbar, was zu einer Akkumulation der freigesetzten Inositolphosphate in der Zelle führt - eine Tatsache, die in dieser Arbeit zum quantitativen Nachweis einer abgelaufenen „PI-response" verwendet wird (200). Alternativ kann IP_3 über eine IP_3-Kinasereaktion, aktivierbar durch erhöhte zytoplasmatische Ca^{2+}-Spiegel, zu IP_4 metabolisiert werden (201). Dieses Molekül ist das Substrat für eine IP_4–Phosphatase, die die Bildung von Inositol-1,3,4-trisphosphat, einer strukturisomeren Form des IP_3, katalysiert (202). Dieser Metabolit besitzt gegenüber dem primären IP_3-Isomeren eine verlängerte Halbwertszeit und einen protrahierten Effekt auf die zelluläre Ca^{2+}-Homöostase in einer zweiten Phase der Zellantwort (192, 203).

Diese beschriebene Sequenz der Signaltransduktion ist in Abbildung 8 zusammengefasst.

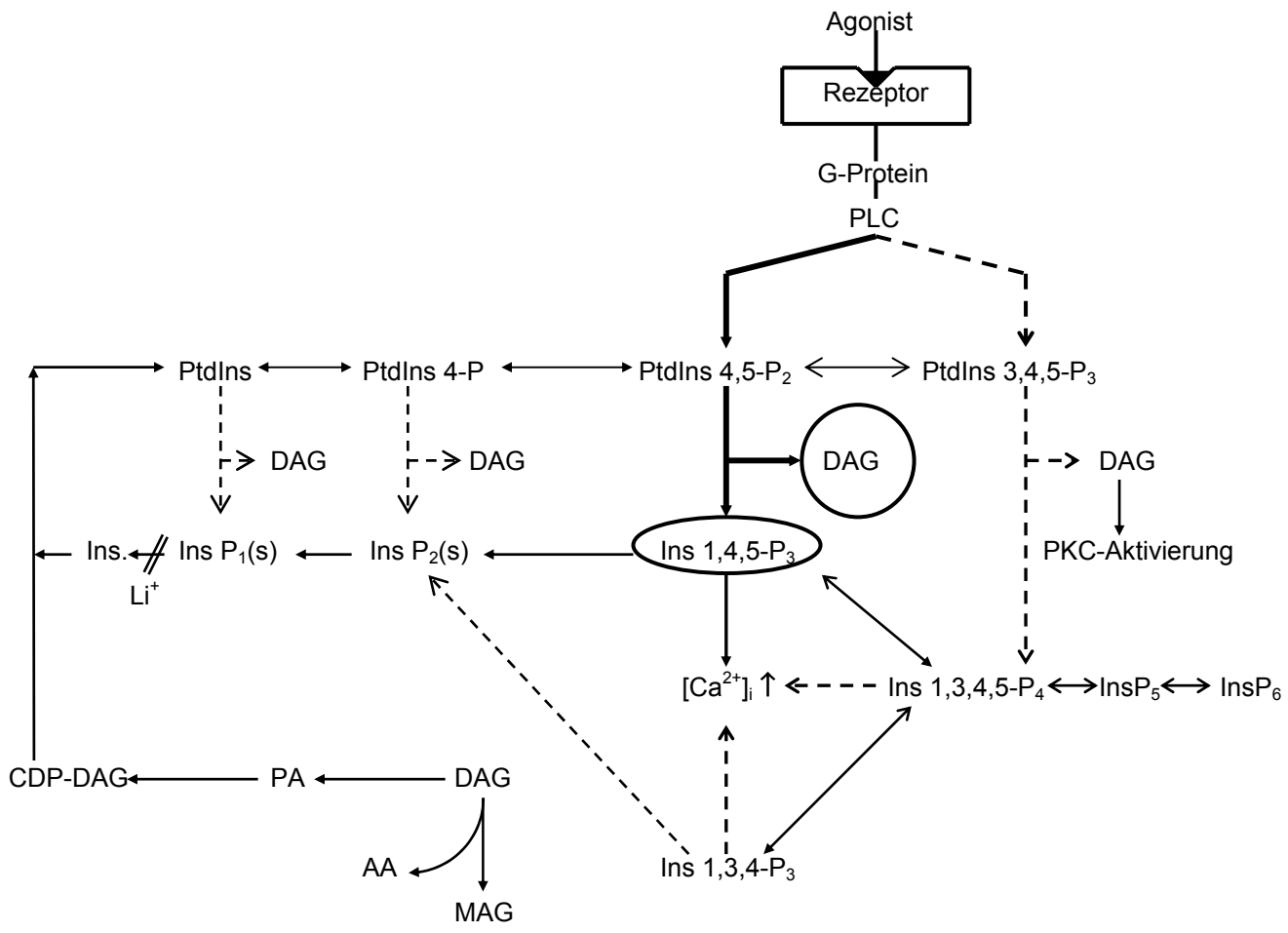


Abbildung 8: Schematische Darstellung der Signaltransduktion durch die Zellmembran nach Rezeptorokkupation durch einen Agonisten

Durch Anlagerung eines Agonisten an den spezifischen Rezeptor in der Membran der Zielzelle erfolgt die Aktivierung einer Phospholipase C (PLC) unter Vermittlung eines GTP-bindenden Proteins. Eine konsekutive Hydrolyse des Membranphospholipids PtdIns 4,5-P_2 mit Bildung der beiden intrazellulären „second messenger" DAG und IP_3 ist die Folge. Diese Reaktion stellt die sogenannte „PI-response" dar. DAG leitet über die Aktivierung der Proteinkinase C (PKC), IP_3 über die Induktion eines initialen zytoplasmatischen Ca^{2+}-Anstiegs die Zellreaktionen ein.
Ins 1,4,5-P_3-Metabolite, für welche ein zum Teil protrahierter Effekt auf die zelluläre Kalziumhomöostase angenommen wird, sind das Ins 1,3,4,5-P_4 und das Ins 1,3,4-P_3.
Über eine vielstufige Reaktionssequenz wird das Membranlipid aus Hydrolyseprodukten regeneriert. Die Möglichkeit der Bildung von DAG und Inositolphosphaten aus höher oder niedriger phosphorylierten Inositiden ist ebenfalls angedeutet. Lithiumionen sind experimentell in der Lage, in der angedeuteten Weise die Signaltransduktion zu beeinträchtigen.
(AA = Arachidonsäure; CDP = Cytosindiphosphat; DAG = Diacylglycerol; Ins = Inositol-; MAG = Monoacylglycerol; P = Phosphat; PA = Phosphatidsäure; PKC = Proteinkinase C; PLC = Phospholipase C; Ptd = Phosphatidyl-)

Folge der Synthese von DAG und IP_3 auf dem beschriebenen Weg der „PI-response" ist eine Modulation des intrazellulären Ca^{2+}-Spiegels sowie der PKC-Aktivität. Bedingt durch eine IP_3-vermittelte Mobilisation aus intrazellulären Speichern kommt es nach Rezeptorstimulation zu einem initialen schnellen Ca^{2+}-Anstieg, dem eine protrahierte Anhebung des Ca^{2+}-Spiegels folgt (204). DAG führt zur Aktivierung der Proteinkinase C und einer anschließenden konsekutiven Phosphorylierung von Serin- und Thyreoninresten vieler zellulärer Targetproteine. Phosphatidylserin und Ca^{2+} dienen als Kofaktoren der PKC-Aktivierung, indem sie die Affinität des Enzyms gegenüber dem DAG-Molekül erhöhen (205). Die PKC-Aktivierung, reguliert durch Ca^{2+}-Ionen, führt zu einer Translokation des Enzyms aus dem zytoplasmatischen Pool an die Zellmembran (206). Die Dauer und Konzentration des initialen Ca^{2+}-Signals bestimmt das Ausmaß der PKC-Rekrutierung in der Membran und damit den in der protrahierten zweiten Ca^{2+}-Phase auslösbaren PKC-Gesamteffekt. Targetproteine der aktivierten Proteinkinase C sind die membranständige NADPH-Oxidase, deren Phosphorylierung die Produktion von Sauerstoffspezies initiiert, sowie verschiedene Actin-bindende Proteine, die in die Zellmorphologie und –motilität involviert sind. Ebenfalls ist die Beteiligung während der Phagozytose sowie Genexpression beschrieben (146, 205, 207).
Während der DAG-Kinase C-Signalweg in längerfristige Modulationen der Zellaktivierung involviert zu sein scheint (Chemotaxis, Genexpression, Zellproliferation) ist der IP_3-Ca^{2+}-Weg auf das akute Reiz-Antwort-Verhalten ausgerichtet, wie z. B. der Mediatorbildung und der Degranulation (130). Es besteht eine teils synergistische, teils antagonistische Verknüpfung zwischen beiden Systemen.
Über die DAG-Kinase C-abhängige Phosphorylierung des G-Proteins wird die Signaltransduktion in der stimulierten Zelle terminiert, über die PKC-vermittelte Aktivierung der IP_3-Phosphatase erfolgt die rasche hydrolytische Neutralisation des IP_3. Parallel dazu stimuliert PKC die membranständigen Ca^{2+}-Pumpen und antagonisiert damit den IP_3-induzierten Ca^{2+}-Anstieg (208).

2.4.3. Thrombozytäre Reaktion und die Auswirkung der Cyclooxygenase-Produkte auf die Mikrozirkulation in der Sepsis

Bereits Anfang der 30er Jahre beschrieben Kurzrok, Lieb, Goldblatt und von Euler Substanzen des Prostatagewebes, die eine Kontraktion der glatten Muskulatur auslösten (209-211). Von Euler gab diesen Faktoren den Namen „Prostaglandine". Ungefähr dreißig Jahre

später wiesen Bergstrom et al. und van Drop et al. einen Arachidonsäure-abhängigen Metabolismus der Prostaglandine nach (212-214).

Die Stimulation der Cyclooxygenase erfolgt durch verschiedene Agenzien, zu welchen unter anderem Zytokine, Wachstumsfaktoren, Endotoxin, freie Sauerstoffradikale, Antigen-Antikörper-Komplexe, Bradykinin, Kollagen und Thrombin zählen (215). Die Cyclooxygenase (COX), ein an die Membran des Zellkerns und des endoplasmatischen Retikulums gebundenes Enzym, katalysiert eine Bis-Dioxygenierungsreaktion des Substrates AA über den Intermediaten PGG_2 zu dem Endoperoxid PGH_2 (216). Dieses Produkt nimmt eine zentrale Stellung in der Prostaglandin (PG)- und Thromboxan (Tx)-Synthese ein, indem es als gemeinsamer Präkursor verschiedener Isomerasen, Reduktasen und Synthetasen dient. Die Verteilung dieser Enzyme weist organ- und zellspezifische Muster auf. So findet sich z. B. PGE_2 als dominierendes Produkt im Nierenmark, TxA_2 als Hauptmetabolit der Thrombozyten und Makrophagen, während die PGI_2-Synthese in stimulierten Gefäßendothelien überwiegt (217). Der COX-Metabolismus ist in Abbildung 9 dargestellt.

Das Wirkprofil der verschiedenen Prostanoide ist breit und zum Teil antagonistisch. So weisen PGE_2 und PGI_2 vasodilatierende Eigenschaften in zahlreichen Gefäßgebieten auf, während $PGF_{2\alpha}$ als vasokonstriktiver Effektor gilt. Thromboxan A_2 ist neben Endothelin der potenteste bekannte Vasokonstriktor der pulmonalen Gefäßstrombahn (218).

Bezüglich der glatten Muskulatur des Bronchialsystems zeigen ebenfalls verschiedene Prostanoide antagonistische Effekte: PGE_2 und PGI_2 führen zu einer Relaxation der bronchialen und trachealen Muskulatur, während $PGF_{2\alpha}$ und TxA_2 eine Bronchokonstriktion induzieren. Eine weitere und in der Sepsis ebenfalls sehr entscheidende Wirkung zeigt sich in der Antagonisierung der Thrombozytenfunktion: TxA_2 wirkt aggregationsfördernd, PGI_2 und PGE_2 inhibieren hingegen die Plättchenaggregation (217). PGE_2 und PGI_2 supprimieren die LPS-stimulierte TNF-α-Produktion in humanen Monozyten. Dieser Funktion liegt eine zunehmende intrazelluläre cAMP-Bildung mit direkter transkriptionaler Kontrolle der TNF-α-Genexpression zugrunde (219). Einen Überblick über die Funktionen der Prostanoide soll Tabelle 3 geben.

Prostazyklin (PGI_2) und Thromboxan werden innerhalb weniger Minuten spontan hydrolysiert, während der Abbau der anderen Prostanoide über 2 Stufen erfolgt: Zu Beginn entstehen unter Katalyse der PG-spezifischen Enzyme PG-15-OH-Dehydrogenase und PG-13-Reduktase Metabolite mit nur noch geringer biologischer Aktivität. Im Weiteren werden diese durch α-, β-Oxidation sowie durch die Cytochrom P_{450}-abhängige aliphatische Hydroxylierung am 20. Kohlenstoffatom – die ω-Oxidation - verstoffwechselt (220).

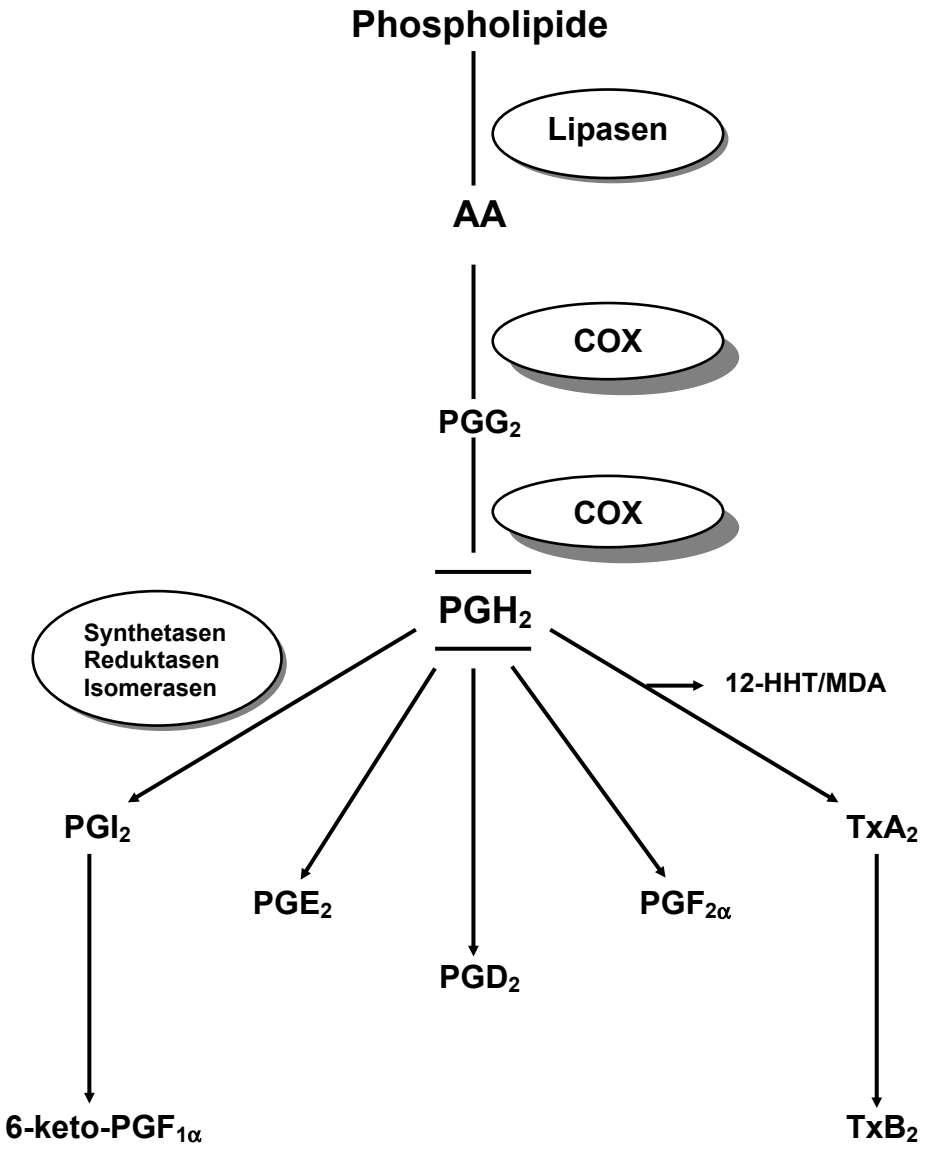


Abbildung 9: Schematische Übersicht des Cyclooxygenase-Metabolismus der AA

Dargestellt ist die Entstehung der Thromboxane (Tx) und Prostaglandine (PG) über die instabilen Endoperoxide PGG_2 und PGH_2. Die meisten Stoffwechselschritte werden enzymatisch katalysiert. Lediglich die Umwandlung von PGH_2 in 12-L-Hydroxy-5,8,10-heptadecatrienoic acid (12-HHT) und Malondialdehyd (MDA), von PGI_2 in 6-keto-$PGF_{2\alpha}$ sowie von TxA_2 in TxB_2 findet nichtenzymatisch, d. h., spontan, statt.
Im ersten Schritt agiert Cyclooxygenase (COX) mit einer Dioxygenase-Funktion, was die PGG_2-Synthese zur Folge hat. Im zweiten Schritt besitzt COX eine Hydroperoxidase-Aktivität – PGH_2 entsteht.
(Prostanoide = Prostaglandine und Thromboxane)

Lipidmediator	Biologische Funktion
Thromboxan A_2 (TxA_2)	- Vasokontriktion - PMN- und Thrombozyten-Aktivierung - Bronchokonstriktion - Mukussekretion
Prostaglandin D_2 (PGD_2)	- Vasokonstriktion - PMN-Inaktivierung - Bronchokonstriktion
Prostaglandin $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$)	- Vasokonstriktion - Bronchokonstriktion
Prostaglandin E_2 (PGE_2)	- Vasodilatation - PMN-und Thrombozyten-Inhibition - Bronchorelaxation - antiproliferativer Effekt - Suppression der TNF-α-Synthese
Prostacyclin (PGI_2)	- Vasodilatation - PMN- und Thrombozyten-Inhibition - Bronchorelaxation - Zunahme der Gefäßpermeabilität - Suppression der TNF-α-Synthese

Tabelle 3: Übersicht über die Funktionen wichtiger Cyclooxygenase-Produkte der AA

2.5. Ortsständige zelluläre Komponenten der Immunantwort in der Sepsis

Als ortsständige Zellen, die in das systemische inflammatorische Geschehen der Sepsis involviert sind, sind insbesondere Makrophagen und Endothelzellen sowie in zweiter Linie Mastzellen und organspezifische Zellen, so z. B. Pneumozyten Typ II der Lunge, zu nennen.

2.5.1. Die Rolle der Endothelzellen

Der Fähigkeit von Endothelzellen (EC), auf Stimulation durch einen invasiven Mikroorganismus oder durch die gebildeten inflammatorischen Mediatoren ihr Antwortverhalten zu verändern, ist ebenfalls die Möglichkeit einer kooperativen Eicosanoidsynthese zuzuordnen. So konnten in verschiedenen in vitro-Modellen Hinweise für eine kooperative Leukotriensynthese mit interzellulärem Austausch des instabilen LTA_4,

Vorläufermolekül der Leukotriene, erbracht werden und deren biologische Relevanz in situ anhand von Voruntersuchungen an der intakten Lunge konstatiert werden (221-224). Eine Schlüsselrolle spielt in diesem Zusammenhang der auf dem Endothel adhärente Granulozyt, der nicht nur das LTB_4, sondern darüber hinaus auch LTA_4 (HWZ 1-3 sec) in den Extrazellularraum bzw. in den interzellulären Spalt sezerniert. Die benachbarte Endothelzelle (Akzeptor), die keine 5-Lipoxygenase und damit keine Fähigkeit zur LTA_4-Synthese besitzt, ist aufgrund einer entsprechenden enzymatischen Ausstattung nun in der Lage, diesen Intermediaten zum vasoaktiven LTC_4 umzusetzen. Zu dieser Syntheseleistung sind isoliert weder Granulozyten noch Endothelzellen im Stande (225). In der PMN-EC-Kooperation der Leukotriensynthese spielt außer dem „LTA_4-Shift" von den PMN zu den Endothelzellen auch die Freisetzung von Arachidonsäure aus aktivierten Endothelzellen und die Aufnahme dieses Präkursors durch benachbarte PMN eine Rolle (226). Hierdurch wird ebenfalls eine Amplifikation der inflammatorischen Antwort erzielt.

2.5.2. Die Rolle der Makrophagen

Makrophagen entstehen aus peripheren Blutmonozyten und spielen eine zentrale Rolle in der Eliminierung infektiöser und toxischer Agenzien. So stellen Alveolarmakrophagen die erste Abwehr gegenüber inhalierten Partikeln dar und antworten mit Ingestion und Abtötung, Antigen-Präsentation gegenüber Lymphozyten und/oder durch Rekrutierung inflammatorischer Zellen in der Lunge, wobei ihre Fähigkeit, proinflammatorische und chemotaktische Mediatoren zu bilden, zum Einsatz kommt (227). Auch für sie konnte eine transzelluläre Synthese inflammatorischer Metabolite nachgewiesen werden, die eine wichtige Verstärkung der Leukotrienbildung im Rahmen eines ARDS und eines MOF darstellt (228).

Einen Überblick über die bislang beschriebenen pathophysiologischen Grundlagen und Zusammenhänge der Sepsis bis hin zur Entwicklung des Multiorganversagens gibt Abbildung 10.

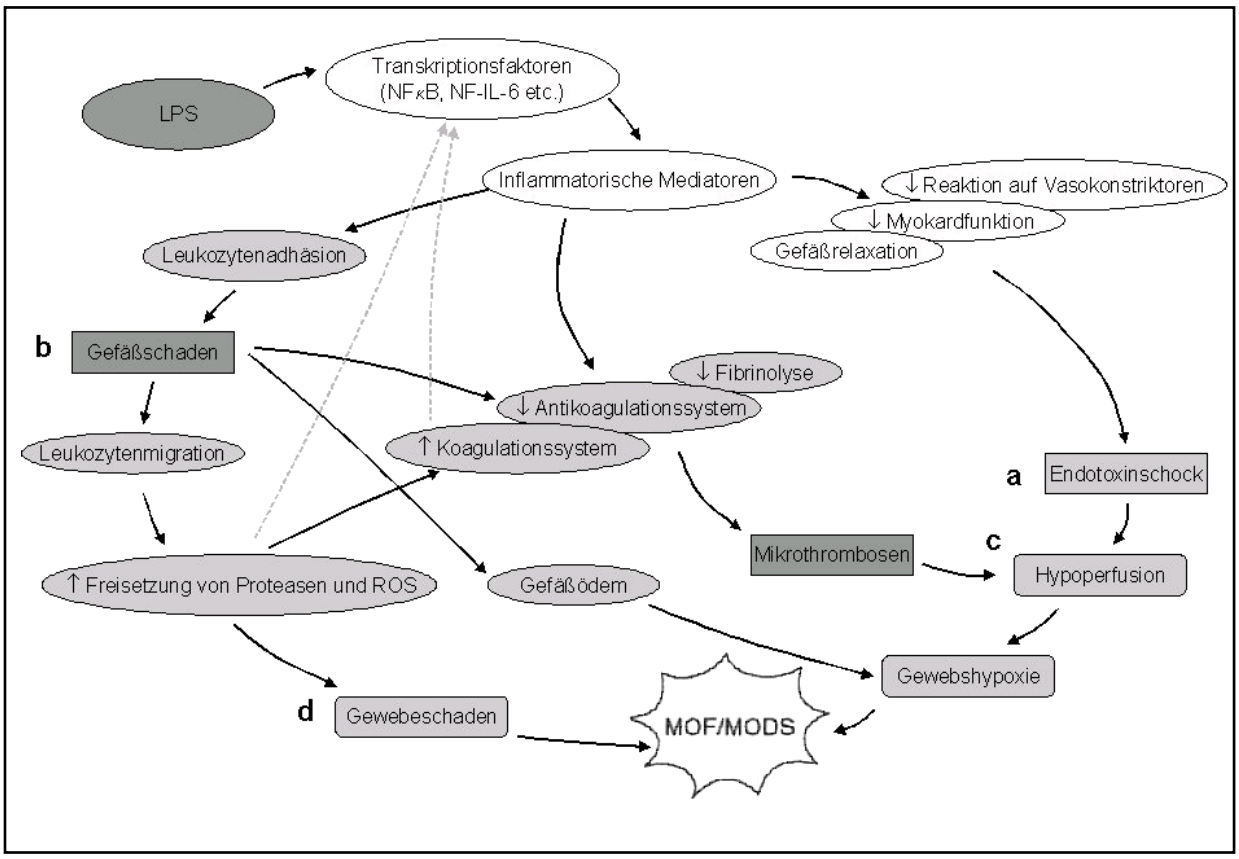


Abbildung 10: ***Die Entwicklung des Multiorganversagens (MOF) als systemische inflammatorische Antwort auf das Endotoxin LPS***

(a) Endotoxinschock und (b) Gefäßschaden, bedingt durch die Aktivierung des Koagulasesystems, münden (c) in eine Hypoperfusion des Gewebes und anschließend (d) in die Entwicklung von Gewebeschäden. Als Folge eines Leukozyten-induzierten Gefäßschadens mit nachfolgender Leukozytentransmigration durch die Gefäßwand werden gewebeschädigende Proteasen und reaktive Sauerstoffspezies aus den Leukozyten freigesetzt [Abbildung verändert aus Karima et al.. 1999. The molecular pathogenesis of endotoxic shock and organ failure. Mol. Med. Today].

2.6. ω-6- und ω–3-Fettsäuren und ihre Beeinflussung der inflammatorischen Antwort

2.6.1. Übersicht

Die westliche Ernährung sowie das gegenwärtige Ernährungsregime der Intensivstationen enthalten vor allem mehrfach ungesättigte Fettsäuren der Familie der ω-6-Fettsäuren (ω-6-FS), einschließlich Arachidonsäure. Untersuchungen haben gezeigt, dass sich in den vergangenen Jahrzehnten die westliche Ernährung zunehmend zu einem ω-6:ω-3-Verhältnis von 20-30:1 anstelle der traditionellen 1-2:1 entwickelt hat. Die Ursachen sind insbesondere in dem gesteigerten Konsum von vegetarischen Ölen, im abnehmenden Fischkonsum sowie in der Zunahme des ω-6-FS-Anteils kommerzieller Futtermittel zu finden (229). Untersuchungen an unterschiedlichen Bevölkerungsgruppen zeigen, dass ein vermehrter ω-6-FS-Konsum das Gleichgewicht zwischen Pro- und Antikoagulation zur prothrombotischen und proaggregatorischen Seite verschiebt mit Zunahme der Inzidenz von Herzkreislauferkrankungen (230).

Im Gegensatz dazu machen ω-3-Fettsäuren (ω-3-FS), deren letzte Doppelbindung vom Methylende aus gesehen zwischen dem dritten und vierten Kohlenstoffatom lokalisiert ist, einen Großteil der Lipide des Kaltwasserfischs und der marinen Organismen aus. So führen zahlreiche Meerespflanzen Kettenelongationen und weitere Desaturierungen von α-Linolensäure durch, um Eicosapentaensäure (EPA; C20:5ω-3) und Docosahexaensäure (DHA; C22:6ω-3) zu erhalten. Diese Syntheseleistung der Meeresalgen und der Transfer dieser durch die Nahrungskette zum Fisch führt zu reichem Vorkommen der ω-3-Fettsäuren im Fisch (231).
Linolsäure (LA; C18:2ω-6), eine zweifach ungesättigte Fettsäure, deren erste Doppelbindung vom Methylende aus gesehen am 6. Kohlenstoffatom lokalisiert ist, und α-Linolensäure (ALA; C18:3ω-3), eine dreifach ungesättigte Fettsäure mit erster Doppelbindung am 3. Kohlenstoffatom, und die langkettigen Derivate beider sind wichtige Bestandteile der Säugetier- und Pflanzenzellmembran. LA ist der Präkursor der ω-6-Lipide, ALA der Präkursor von ω-3-Fetten. Säugetiere sind nicht dazu in der Lage, LA und ALA mittels de novo-Synthese herzustellen und daher auf eine exogene Zufuhr angewiesen (215). Durch Prozesse der Elongation und Desaturierung können beide essentiellen Fettsäuren in die

biologisch aktiveren Verbindungen der längerkettigen PUFA (**p**oly**u**nsaturated **f**atty **a**cid) umgewandelt werden. Die Metabolisierung der PUFA ist in Abbildung 11 zusammengefasst.

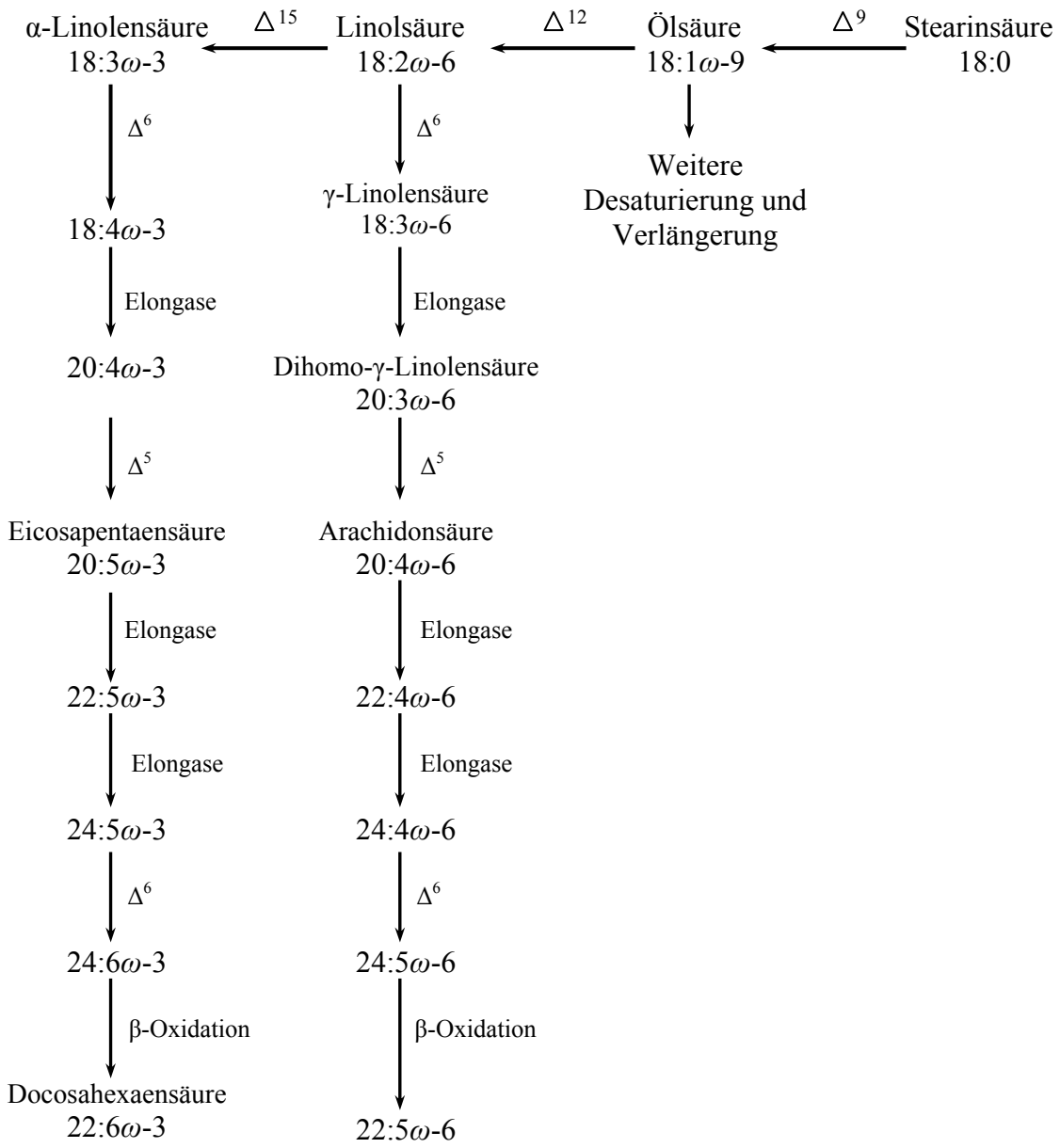


Abbildung 11: Metabolismus der mehrfach ungesättigten Fettsäuren (PUFA)

Säugetiere und Pflanzen sind dazu in der Lage, aus der gesättigten Stearinsäure die einfach ungesättigte Ölsäure zu synthetisieren, ein Vorgang, bei welchem unter Katalyse des Enzyms Δ^9-Desaturase eine Doppelbindung zwischen dem 9. und 10. Kohlenstoffatom eingebaut wird. Lediglich Pflanzen besitzen die Fähigkeit, durch das Einfügen weiterer Doppelbindungen Linolsäure und α-Linolensäure herzustellen. Säugetiere sind auf die Zufuhr mittels Nahrung angewiesen, können dann in weiterer Folge durch Desaturierung, Elongation und β-Oxidation eine Reihe weiterer PUFA metabolisieren. Eine metabolische Interkonvertierung von ω-3-, ω-6- und ω-9-PUFA ist bei Säugetieren nicht möglich. Δ^6, Δ^9, Δ^{12} und Δ^{15} stehen für Desaturasen.

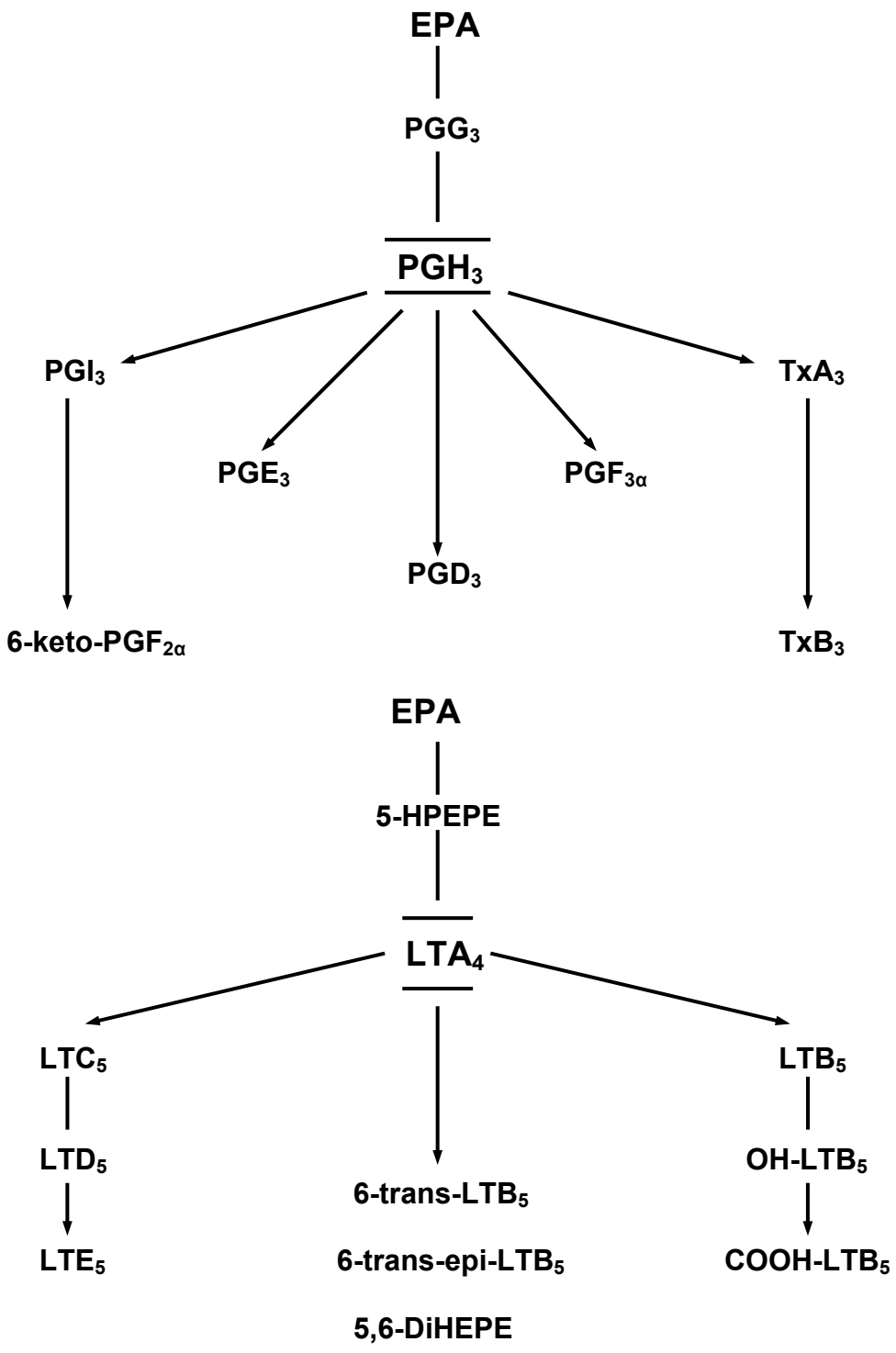
Studien von Dyerberg und Bang Mitte der 70er Jahren an der grönländischen Bevölkerung dokumentierten, dass die Prävalenz der Atherosklerose und des Myokardinfarkts in dieser Bevölkerung deutlich erniedrigt war, und die Grönländer ein etwa 10fach niedrigeres kardiovaskuläres Risiko im Vergleich zur Bevölkerung Dänemarks und Nordamerikas boten (232, 233). Hieraus schlossen sie auf eine Assoziation bestimmter pathophysiologischer Prozesse und der Zusammensetzung der Nahrungslipide und sahen darin eine neue Perspektive zur Krankheitsprävention (215, 234, 235). Zahlreiche Arbeiten heben die antiinflammatorischen, antithrombotischen, antiarrhythmischen, hypolipidämischen und vasodilatatorischen Fähigkeiten dieser Lipidgruppe hervor.
Die ω-3-Fettsäuren greifen in zahlreiche pathophysiologische Vorgänge ein und führen zu einem modifizierten inflammatorischen Antwortverhalten.
Eine ω-3-reiche Ernährung induziert nach einigen Wochen eine Suppression der Zytokinkaskade durch Verminderung der leukozytären Synthese proinflammatorischer Zytokine, inbesondere von TNF-α, IL-1 und IL-6 (236-238). Während anfangs eine direkte Regulation der Genexpression durch die exogen angebotene FS angenommen wurde, wird derzeit von einer Beeinflussung auf der Ebene des Transkriptionsfaktors NF-κB ausgegangen: EPA inhibiert PKC, welche die Aktivierung von NF-κB katalysiert (239), ω-6-FS hingegen aktiviert PKC und damit die Genexpression (240).

Die Emigration von Leukozyten aus dem intravaskulären Kompartiment in das entzündete Gewebe ist ein fundamentaler Prozess in vielen akuten und chronischen Entzündungsvorgängen, einschließlich ARDS und Sepsis. Sie ist sowohl für die Heilung als auch für die Perpetuierung eines chronischen Zustandes ursächlich. In diesen Prozess der Transmigration sind zahlreiche Adhäsionsmoleküle involviert, wie bereits zuvor beschrieben. Die Expression dieser Oberflächenmoleküle wird durch Zytokine wie TNF-α und IL-1, welche vermehrt im Entzündungsgewebe gebildet werden, gesteigert (241). ω-3-FS reduzieren die TNF-α-induzierte Expression von Adhäsionsmolekülen auf dem Endothel, was zu einer verminderten Adhäsion von Leukozyten auf den Gefäßzellen führt. Folge ist die Abnahme der Transmigration in das entzündete Gewebe. Diesbezüglich konnte gezeigt werden, dass mit zunehmender Zahl der ungesättigten Bindungen bei gleicher C-Kettenlänge der verwendeten FS deren Inhibition der endothelialen Aktivierung ansteigt. Die Position der Doppelbindung spielt dabei keine Rolle (242).
Lymphozyten sind extrem sensitiv in ihrer Reaktion auf freie PUFA. So konnte das Angebot von freier PUFA in vitro eine Verminderung der IL-2-Produktion, der Antigen-Präsentation,

der Lymphozyten-Proliferation und der NK-Zell (natural killer cell)-Aktivität hervorrufen (231).

Die in der Sepsis eine wichtige Rolle spielenden Eicosanoide werden, wie bereits im Vorfeld beschrieben, von Arachidonsäure über zahlreiche metabolische Mechanismen synthetisiert und sind sowohl in pro- als auch antiinflammatorische Prozesse der Sepsis involviert (243, 244). EPA dient als alternativer Lipidpräkursor des Lipoxygenase- und Cyclooxygenase-Metabolismus und möglicherweise des Cytochrom P_{450}-Stoffwechsels: Es resultiert die Bildung von Leukotrienen der 5er-Serie anstelle der 4er-Serie sowie von 3er-Prostanoiden anstelle der von der AA abstammenden 2er-Serie (231). Hierüber gibt Abbildung 12 einen Überblick.

In Experimenten mit simultanem Angebot von freier AA und freier EPA konnte gezeigt werden, dass EPA das bevorzugte Substrat des LO-Metabolismus im Vergleich zu AA darstellt und dass es zu einer gesteigerten Bildung der von EPA abstammenden Produkte auf Kosten der AA-Metabolite kommt (245).
Viele der von der ω-3-Fettsäure abgeleiteten Metabolite, einschließlich LTB_5, TxA_3 und die 5er-Serie der Cysteinyl-LT, besitzen eine deutlich geringere inflammatorische und vasomotorische Wirkung im Vergleich zu den Lipidmediatoren der AA. So ist LTB_5 ca. 10fach weniger chemotaktisch wirksam als LTB_4 (246). Weiterhin können die LT der 5er-Serie die Wirkung von LT der 4er-Serie inhibieren (247). In Thrombozyten kommt es zu einer kompetitiven Inhibition der TxA_2-Synthese unter EPA-Gabe und zu einer verzögerten Metabolisierung von EPA zu TxA_3 im Vergleich zu AA (248). Das gebildete PGI_3 besitzt die gleiche antiaggregatorische Aktivität wie das PGI_2. Eine ω-3-FS-reiche Ernährung führt zu einem verminderten aggregatorischen Verhalten der Blutplättchen bzw. es wird eine höhere Stimuluskonzentration benötigt, um die Thrombozytenaggregation auszulösen (249). Für DHA, die in ungefähr gleicher Menge wie EPA in Fischöl enthalten ist, konnte keine nennenswerte Metabolisierung über den 5-LO- und COX-Weg dokumentiert werden. Jedoch kann DHA zu EPA rekonvertiert werden und trägt so zur Amplifizierung des EPA-Metabolismus bei (250). Ebenfalls zeigen die Leukozyten von mit Fischöl vorbehandelten Probanden eine reduzierte Chemotaxis auf eine Vielzahl von chemotaktisch aktiven Stoffen (251). Ein Verlust der Phagozytosefähigkeit und damit verbundene Reduktion der Bakterieninternalisation konnte für EPA und DHA nicht gezeigt werden (252). Mit EPA vorbehandelte Zellen besitzen eine signifikant verringerte Fähigkeit, Superoxidanionen zu bilden (250).



Abbildungen 12: Metabolisierung der Eicosapentaensäure auf dem Cyclooxygenase- (oben) und Lipoxygenase-Weg (unten)

Diese fünffach ungesättigte ω-3-FS kann ebenfalls durch die Enzyme des Eicosanoidstoffwechsels umgesetzt werden. Die Metabolisierung der EPA auf dem COX-Weg führt zur Bildung der 3er-Prostaglandine und des antiaggregatorischen Thromboxan A_3. Auf dem 5-LO-Weg entstehen aus EPA die Leukotriene der 5er-Reihe.

In Phosphatidylcholin, Präkursor der PAF-Synthese, kann das AA-Molekül in der sn-2-Position durch EPA ersetzt werden, woraus eine verminderte PAF-Synthese resultiert. Des Weiteren ist die Aktivität der PLA_2, das den ersten Schritt des PAF-Metabolismus katalysiert, durch 5-LO-Metabolite beeinflusst und durch EPA direkt herunterreguliert (250).
Fettsäuren beeinflussen ebenfalls die Ebene der intrazellulären „second messenger"-Systeme. Phosphatidylinositol, das vor allem 1-stearoyl-2-arachidonoyl-Spezies enthält, ist in die Struktur biologischer Membranen und die Regulation der Aktivität von membrangebundenen Enzymen involviert. Anstelle von AA kann EPA in das Phosphatidylinositol eingebaut werden. Das durch Rezeptorstimulation gebildete IP_x ist durch die Fettsäurezusammensetzung in der Weise beeinflusst, dass ein zunehmender Anteil an ω-3-FS im PI-Pool zu einer reduzierten IP_x- und DAG-Bildung führt und damit eine Abnahme des leukozytären Antwortverhaltens auf einen inflammatorischen Stimulus zur Folge hat (251). Die DAG-abhängige Aktivierung der PKC ist ebenfalls von der FS-Komposition bestimmt: Trägt DAG in der sn-2-Position eine ω-3-FS, so ist es in der PKC-Aktivierung weniger effektiv als DAG mit einer ω-6-FS. Zur vollständigen Aktivierung wird PKC vom Zytosol an die Membran transloziert und bindet hier an das Phospholipid Phosphatidylserin (PS). Dieser Prozess wird durch die Fettsäurezusammensetzung des PS bestimmt und zwar in dem Maß, dass ein höherer Gehalt an ω-3-Fetten die Bindungsfähigkeit von PKC und damit dessen Aktivierung verringert (253, 254). Folge der Summe der Effekte von ω-3-FS auf die „second messenger"-Systeme ist eine Reduktion des Stimulus-Antwort-Verhaltens.

Alle diese genannten Mechanismen bewirken eine supprimierte inflammatorische Zellaktivierung und damit den immunmodulatorischen Effekt der ω-3-Fettsäuren, insbesondere von EPA und DHA.

2.6.2. Freisetzung von Fettsäuren

Freie Fettsäuren im Plasma stammen entweder aus einer Freisetzung aus dem Membranphospholipidpool der Körperzellen oder aus der Zufuhr über eine parenterale Ernährung mit Lipiden. Entscheidend für die Synthese der Lipidmediatoren und die Beeinflussung zahlreicher immunologischer und inflammatorischer Prozesse ist die freie Fettsäure im Plasma.

2.6.2.1. Freisetzung aus Membranfettsäuren

Essentielle Fettsäuren sind im Plasma sowie in den Geweben vorwiegend in Phospholipiden verestert und bilden insbesondere Bausteine der Lipoproteine und Zellmembranen. Zugeführte essentielle Fettsäuren werden durch Desaturasen in Folgeprodukte umgewandelt, die wiederum als Präkursoren der Eicosanoidsynthese in die Phosphatide der Zellmembranen eingebaut und bei Bedarf durch Phospholipasen mobilisiert werden:

- im Rahmen der „PI-response" Freisetzung aus dem Membranlipid Phosphatidylinositol-1,4,5-Triphosphat nach agonistischer Rezeptorokkupation (sequentielle Reaktion der Phosphatidylinositol-1,4,5-Triphosphat-spezifischen Phospholipase C und einer DAG-spezifischen Phospholipase A_2)
- direkt aus dem Präkursorlipid der PAF-Biosynthese unter Bildung von Lyso-PAF im Rahmen einer Ca^{2+}-vermittelten Zellstimulation (PAF-Precursor-spezifische PLA_2)
- aus den Membranlipiden Phosphatidylethanolamin und Phosphatidylcholin (PLA_2-Aktivitäten unterschiedlicher Spezifität).

2.6.2.2. Freisetzung aus Infusionen

Im Gegensatz zur enteralen Verabreichung führt die parenterale Gabe von synthetischen Lipidaggregaten zu einer Aktivierung der endothelialen Lipoproteinlipase mittels Translokation des Enzyms von seiner zellulären Bindung in das Gefäßkompartiment mit einem daraus resultierenden sofortigen Anstieg der plasmatischen freien FS aufgrund der Hemmung sowie Überlastung von lokalen zellulären Aufnahmemechanismen (255, 256).

2.6.3. Rolle der extrazellulären freien Fettsäuren

Freie Fettsäuren spielen in den pathophysiologischen Abläufen der Inflammation eine entscheidende Rolle, konnte doch in Zellexperimenten gezeigt werden, dass die Aktivierung von Granulozyten durch natürlich vorkommende und pathophysiologisch relevante rezeptorabhängige Stimuli in vitro zu keiner nennenswerten Bildung von AA-Metaboliten führt, sondern dies erst durch die gleichzeitige Gabe von AA der Fall ist. Hier zeigt sich eine Abhängigkeit der granulozytären 5-LO von exogener AA-Zufuhr – ein pathophysiologisch sinnvolles Prinzip zur Synchronisation aktivierter Granulozyten und Zielgewebe.

2.6.4. Grundlagen einer immunmodulatorischen Therapie mit ω-3-Lipiden

Die Tatsache der Abhängigkeit der granulozytären 5-LO von exogener AA sowie die nachgewiesene Beeinflussung des Zytokinprofils sowie der Zytokin-mediierten pathophysiologischen Sequenzen eröffnet die Möglichkeit einer pharmakologischen Intervention durch die parenterale Einschleusung einer AA-antagonisierenden Fettsäure in die Synthesewege der Lipidmediatoren. Vor dem Hintergrund der Modulation von inflammatorischen und immunologischen Antworten sowie der von Dyerberg und Bang dokumentierten Beobachtungen war die Verwendung von Ernährungen mit spezifischen Fettzusammensetzungen, insbesondere mit den ω-3-FS EPA und DHA, schon seit längerem von großem Interesse. Es entstand der Begriff der "Immunnutrition".

Die anstelle von AA intravaskulär verabreichte EPA erzeugte in einem Modell des septischen Lungenversagens ein verringertes Lungenödem sowie einen geringeren pulmonalarteriellen Druck (257-259). Ebenso konnte anhand der enteralen Gabe von EPA eine Verbesserung der Symptomatik von ARDS-Patienten erzielt werden (260). Da in dem verwendeten enteralen Ernährungsregime jedoch ebenfalls andere immunmodulatorische Komponenten, wie γ-Linolensäure und Antioxidantien, enthalten waren, lässt sich letztendlich keine Aussage darüber machen, ob die Kombination oder eine einzelne Komponente daraus wirksam war.

Vor dem geschilderten Hintergrund der Beeinflussung zahlreicher inflammatorischer Reaktionen des Organismus durch ω-3-Fettsäuren und der unkontrollierten systemischen Ausschüttung einer Vielfalt (hyper-)inflammatorischer Mediatoren in der Sepsis mit Einbindung zahlreicher Organsysteme bis hin zum Multiorganversagen stellt sich die Frage nach der Möglichkeit einer Intervention durch die parenterale Anwendung von ω-3-Lipidemulsionen. Derzeit liegen noch keine Arbeiten bezüglich einer parenteralen Gabe während der Sepsis vor.

2.7. Fragestellung

Vor dem Hintergrund der beschriebenen Zusammenhänge wurden folgende Fragen anhand einer Studie an Sepsispatienten bearbeitet:

1. Unterscheiden sich Profil sowie Plasmaspiegel freier Fettsäuren von septischen Patienten vor Beginn einer parenteralen Substitutionstherapie von denen gesunder Probanden?

2. Welchen Einfluss hat die exogene Zufuhr von ω-6- und ω–3-Lipidemulsionen auf das Fettsäureprofil im Plasma? Lassen sich mittels ω-6- und ω–3-Fettinfusionen quantitative und qualitative Veränderungen der freien Plasmafettsäuren erzielen?

3. Ist eine ω–3-Lipidzufuhr dazu in der Lage, den granulozytären und thrombozytären Entzündungsmetabolismus in der Sepsis zu modifizieren? Wird unter ω–3-Infusionen EPA anstelle von AA in den LO- und COX-Metabolismus eingeschleust?

4. Welchen Einfluss übt die Art der parenteralen Lipidzufuhr auf den klinischen Verlauf septischer Patienten aus?

5. Worin besteht der Unterschied zwischen einer enteralen und einer parenteralen Darreichungsform der ω-6- und ω-3-Ernährungen vor dem Hintergrund der Studienergebnisse?

6. Werden inflammatorische Parameter und zelluläre Funktionen in der Sepsis durch ω–3-Lipide in der Weise verändert, dass ein künftiger therapeutischer Ansatz in der Gabe von ω-3-Lipidemulsionen bestehen könnte?

3. METHODIK

3.1. Studienprotokoll

In die Pilotstudie wurden 10 Patienten eingeschlossen, welche die Kriterien der Sepsis und des septischen Schocks erfüllten und eine enterale Ernährung nicht tolerierten. Alle Patienten wurden auf der internistischen Intensivstation der Medizinischen Klinik II der Justus-Liebig-Universität Gießen betreut.

Die Genehmigung der Studie erfolgte durch die Ethikkommission des Fachbereichs Humanmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen. Sie entsprach den Richtlinien der Deklaration von Helsinki. Vor Eintritt in die Studie wurde nach vorherigem ausführlichen Aufklärungsgespräch über das Studienvorhaben von jedem Patienten bzw. dessen nächsten Angehörigen oder gesetzlichem Betreuer eine schriftliche Einverständniserklärung unterzeichnet.

Die Studie wurde als offene, randomisierte Untersuchung durchgeführt. Die Patienten, die die Einschlusskriterien erfüllten und keine Ausschlusskriterien aufwiesen, wurden nach dem Zufallsprinzip den zwei Gruppen zugeordnet, welche sich im Rahmen ihrer parenteralen Ernährung lediglich durch die verabreichte Lipidemulsion unterschieden.

3.1.1. Patientenpopulation

Sepsis und septischer Schock wurden nach den von Bone et al. entwickelten Kriterien definiert (9).

3.1.1.1. Einschlusskriterien

Die an der Studie teilnehmenden Patienten erfüllten folgende Kriterien:

A. Klinischer Verdacht einer Infektion <u>und</u> Einleitung oder Wechsel einer systemischen antimikrobiellen Therapie innerhalb der vorausgegangenen 72 Stunden.

<u>und</u>

B. Systemische inflammatorische Antwort, basierend auf zwei oder mehreren der folgenden Reaktionen (jede innerhalb einer 24-stündigen Periode dokumentiert):

   1. Fieber oder Hypothermie (Körperkerntemperatur ≥ 38.0 °C oder ≤ 36.0 °C).

2. Tachykardie (Herzfrequenz von ≥ 90 Schlägen/min).
3. Tachypnoe (Atemfrequenz von ≥ 20/min) oder $PaCO_2$ ≤ 32 mmHg (4.3 kPa) unter Spontanventilation oder unter Notwendigkeit einer maschinellen Beatmung.
4. Leukozytenzahl > 12 x 10^9/l oder < 4 x 10^9/l oder 10 % Vorläuferzellen.

und

C. Akuter Beginn einer Organdysfunktion, die einen oder mehrere der folgenden Aspekte erfüllt, unabhängig vom primären Fokus des septischen Geschehens und einer eventuell bestehenden chronischen Begleiterkrankung:

1. Akute Deterioration des mentalen Status des Patienten, nicht bedingt durch Sedation oder eine zugrunde liegende Primärerkrankung des zentralen Nervensystems.
2. Hypoxämie, definiert durch PaO_2/FiO_2 < 300 mmHg (40 kPa), bei Fehlen einer zugrunde liegenden primären Lungenerkrankung.
3. Oligurie, definiert durch eine renale Ausfuhr von < 0.5 ml/(kg x h) für mindestens zwei aufeinanderfolgende Stunden oder ein Anstieg des Serumkreatininwertes auf ≥ 2.0 mg/dl (177 µmol/l) innerhalb der vorausgegangenen 48 Stunden, bei Fehlen einer renalen Erkrankung.
4. Thrombozytopenie, definiert durch eine Blutplättchenzahl von < 75 x 10^9/l oder einen akuten Abfall um ≥ 50 % innerhalb der vorausgegangenen 24 Stunden, bei Fehlen einer primären Erkrankung des Knochenmarks.
5. Akute hepatische Dysfunktion, definiert durch mindestens zwei der folgenden laborchemischen Parameter, bei Fehlen einer zugrunde liegenden hepatischen Erkrankung:
   i) eine Bilirubinkonzentration im Serum von > 2.5 mg/dl (43 µmol/l),
   ii) eine Alaninaminotransferase (ALT)-Konzentration im Serum von mehr als das Doppelte des Normalwertes,
   iii) INR < 1.5 oder PT > 1.5fache des Kontrollwertes oder PT > 1.5fache des Mittelwertes des Referenzbereichs, in Abwesenheit einer systemischen Antikoagulation.
6. Disseminierte intravasale Gerinnung (DIC), definiert durch mindestens zwei der folgenden Faktoren:

i) Plättchenzahl < 75 x 10^9/l oder ein akuter Abfall um ≥ 50 % innerhalb der vorausgegangenen 24 Stunden, bei Fehlen einer primären Erkrankung des Knochenmarks.

ii) INR < 1.5 oder PT > 1.5fache des Kontrollwertes oder PT > 1.5fache des Mittelwertes des Referenzbereiches, in Abwesenheit einer systemischen Antikoagulation.

iii) D-Dimer-Titer von > 0,5 µg/ml oder Fibrin-Spaltprodukte von > 10 µg/ml.

7. Ein Plasmalaktat von > obere Grenze des Normalbereiches oder ein Basendefizit von > 5 mmol/l, nicht bedingt durch eine vom schweren septischen Geschehen abweichende metabolische Entgleisung, wie z. B. durch ein akutes Nierenversagen.

Septischer Schock wurde definiert als ein Syndrom der schweren Sepsis, assoziiert mit einem der beiden folgenden Punkte:

- ein MAP < 70 mmHg für mindestens 30 aufeinander folgende Minuten trotz Volumensubstitution,
- die Notwendigkeit der Gabe von Vasokonstriktoren mit einer konstanten Dosis von entweder Adrenalin > 0.05 µg/(kg x min) und/oder Noradrenalin > 0.05 µg/(kg x min) und/oder Dopamin > 5.0 µg/(kg x min) oder die äquivalente Dosis eines anderen Vasokonstriktors über mindestens 30 zusammenhängende Minuten, um einen MAP von über 90 mmHg aufrechtzuerhalten.

3.1.1.2. Ausschlusskriterien

Ausgeschlossen wurden Patienten im Alter von unter 18 Jahren oder mit einer bestehenden oder vermuteten Schwangerschaft. Weitere Ausschlussfaktoren waren:

- eine Behandlung mit Kortikosteroiden (in einem Äquivalent von ≥ 1mg Prednison/kg Körpergewicht) innerhalb der vorausgegangenen 48 Stunden
- eine Behandlung mit Immunsuppressiva
- eine bestehende HIV-Infektion
- eine Neutropenie anderer Genese
- Teilnahme an einer laufenden klinischen Studie
- eine bestehende irreversible Begleiterkrankung, bei welcher ein möglicherweise letaler Verlauf abzusehen war.

Physiologische Variable	hoch abnormale Werte						tief abnormale Werte				
	+4	**+3**	**+2**	**+1**	**0**	**+1**	**+2**	**+3**	**+4**	gemessener Wert	*Score*
Temperatur, rektal [ºC]	≥ 41	39-40.9		38.5-38.9	36-38.4	34-35.9	32-33.9	30-31.9	≤ 29.9		
Arterieller Mitteldruck (mmHg)	≥ 160	130-159	110-129		70-109		50-69		≤ 49		
Herzfrequenz, ventrikulär (/min)	≥ 180	140-179	110-139		70-109		55-69	40-54	≤ 39		
Atemfrequenz, beatmet/spontan (/min)	≥ 50	35-49		25-34	12-24	10-11	6-9		≤ 5		
Oxygenierung $AaDO_2/PaO_2$ a) $FiO_2 \geq 0.5 \rightarrow AaDO_2$ (mmHg)	≥ 500	350-499	200-349		< 200						
b) $FiO_2 < 0.5 \rightarrow PaO_2$ (mmHg)					> 70	61-70		55-60	≤ 55		
pH, arteriell	≥ 7.7	7.6-7.69		7.5-7.59	7.33-7.49		7.25-7.32	7.15-7.24	< 7.15		
Natrium im Serum (mmol/l)	≥ 180	160-179	155-159	150-154	130-149		120-129	111-119	≤ 110		
Kalium im Serum (mmol/l)	≥ 7	6-6.9		5.5-5.9	3.5-5.4	3-3.4	2.5-2.9		< 2.5		
Kreatinin (mg/dl) verdoppelter Wert für *akutes* Nierenversagen	≥ 3.5	2-3.4	1.5-1.9		0.6-1.4		< 0.6				
Hämatokrit (%)	≥ 60		50-59.9	46-49.9	30-45.9		20-29.9		< 20		
Leukozyten (*1000/mm^3)	≥ 40		20-39.9	15-19.9	3-14.9		1-2.9		< 1		
Glasgow Coma Scale (GCS) Wert = 15 - GCS											
Acute Physiology Score Summe der einzelnen Werte											
HCO_3 im Serum (venös, mmol/l) *nur bei keinen arteriellen Blutgasen*	≥ 52	41-51.9		32-40.9	22-31.9		18-21.9	15-17.9	< 15		

Tabelle 4: Acute Physiology Score als Teil des APACHE II-Score

Nach diesem Muster wurden für die an jedem Studientag erhobenen klinischen und laborchemischen Parameter Punkte vergeben, die in der Summe mit den Punkten für Alter und für eine vorliegende chronische Erkrankung den totalen APACHE II-Score bildeten.

3.1.2. Dokumentation des klinischen Verlaufs

Zur Beurteilung des klinischen Zustandes fand der APACHE II-Score Verwendung (261). Die erforderlichen klinischen sowie laborchemischen Parameter wurden an jedem Studientag erhoben und dokumentiert, nach der vorliegenden Tabelle 4 wurden den einzelnen Parametern Punkte vergeben. Der auf den „Glasgow Coma Scale" (GCS) bezogene Wert, der sich nach der Gleichung: Wert = 15 – GCS ermittelt, wurde hinzugefügt.

Entsprechend dem vorliegenden Alter wurden folgende Punkte zugeordnet:

Alter (Jahre)	Punkte
≤ 44	0
45-54	2
55-64	3
65-74	5
≥ 75	6

Zusätzlich erfolgte die Zuteilung sogenannter „Chronic Health-Punkte" bei Vorliegen einer chronischen Erkrankung im Sinne einer schweren Organinsuffizienz oder einer Immunschwäche nach folgender Differenzierung:

- nicht-operierter Patient oder Patient nach einer Notfalloperation 5 Punkte
- Patient nach elektivem operativen Eingriff 2 Punkte.

Eine schwere Organinsuffizienz bzw. Immunsuppression lag vor, wenn einer oder mehrere der folgenden Gesichtspunkte erfüllt waren:

<u>Leber:</u>

- mittels Biopsie gesicherte Leberzirrhose
- dokumentierte portale Hypertension
- Episoden einer oberen gastrointestinalen Blutung, verursacht durch portale Hypertension
- Episoden von Leberversagen, Enzephalopathie, Leberkoma.

<u>Kardiovaskuläres System:</u> NYHA IV.

<u>Respiratorische Einschränkung:</u>

- chronisch restriktive, obstruktive oder vaskuläre Erkrankung mit schwerer Einschränkung der Leistungsfähigkeit
- dokumentierte chronische Hypoxie, Hyperkapnie
- sekundäre Polyzythämie
- schwere pulmonale Hypertension (PAPmean > 40 mmHg)
- beatmungspflichtiger Patient.

Niere: chronisch dialysepflichtiger Patient.

Immunsuppression:

- Behandlung mit Immunsuppressiva
- Chemotherapie
- Bestrahlung
- kürzliche oder Langzeit-Steroidtherapie (hochdosiert)
- bestehende Diagnose einer HIV-Infektion, einer Leukämie oder eines Lymphoms.

Es wurde die Summe aus den 12 einzelnen Werten des „Acute Physiology Score" gebildet und dann mit den Alterspunkten sowie den „Chronic Health-Punkten" summiert. Die Summe wird als totaler APACHE (Acute Physiology and Chronic Health Evaluation) II-Score bezeichnet.

Der APACHE II-Score wurde aus den Daten vor Behandlungsbeginn sowie im weiteren Verlauf aus den aktuellen Daten der Studientage ermittelt. Der Wert des im APACHE II-Score beinhalteten „Glasgow Coma Scale" wurde bei sedierten Patienten mittels der klinischen Ausgangssituation vor Initiierung der Sedation bestimmt.

Die Definition von Blutkulturen als positiv erfolgte durch die Identifizierung von Bakterien- oder Pilzwachstum in normalerweise sterilen Körperflüssigkeiten bzw. Körpergeweben.

3.1.3. Studienmedikation

Die vollständige parenterale Ernährung der Studienpatienten beinhaltete entweder die standardisierte ω-6-Lipidinfusion (Lipoven®; Firma Fresenius, Bad Homburg, Deutschland) oder alternativ die ω-3-Lipidinfusion, basierend auf Fischöl (Omegaven®; Firma Fresenius, Bad Homburg, Deutschland). Die verwendeten Glucose-, Aminosäure- und Elektrolytlösungen waren in beiden Gruppen gleich. Die Lipidemulsionen waren steril in Glasflaschen verpackt und wurden bei 4-8 ºC aufbewahrt. Die Fettsäurezusammensetzung dieser Lipidemulsionen ist in Tabelle 5 angegeben.

Über einen zentralvenösen Katheter wurden an jedem Studientag 400 ml der 10 %igen ω-6- oder ω-3-Lipidemulsion mit Hilfe eines Injektomaten infundiert, verteilt auf drei Gaben:

200 ml wurden von 8.00 bis 12.00 Uhr, 100 ml von 16.00 bis 20.00 Uhr und 100 ml von Mitternacht bis 4.00 Uhr verabreicht. Dieses Infusionsregime wurde über insgesamt 10 Tage verfolgt. Keiner der Patienten hatte vor Studienbeginn eine Fettemulsion erhalten.

Fettsäure	Omega-6-Emulsion (Lipoven®) (g/l)	Omega-3-Emulsion (Omegaven®) (g/l)
C14:0	-	4.9
C16:0	12.4	10.7
C16:1ω-7	-	8.2
C18:0	5.0	2.4
C18:1ω-9	24.1	12.3
C18:2ω-6	52.2	3.7
C18:3ω-3	8.2	1.3
C20:4ω-6	-	2.6
C20:5ω-3	-	18.8
C22:5ω-3	-	2.8
C22:6ω-3	-	16.5
Andere	-	15.1

Tabelle 5: Fettsäurezusammensetzung der verwendeten ω–6- und ω–3-Lipidemulsionen

Angegeben sind die Einzelkomponenten in g/l.
Die ω–6 (Lipoven®)- und die ω–3 (Omegaven®)-Lipidemulsionen wurden mit identischen Techniken und Zusätzen von Firma Fresenius AG, Bad Homburg, Deutschland, hergestellt. Wiederholte gaschromatographische Kontrollen beider Emulsionen zeigten < 0.3 % freie AA oder EPA in Relation zur jeweiligen veresterten Fettsäure.

3.1.4. Blutentnahme

Das untersuchte Blut wurde mittels Venenpunktion am Tag 1, um 8.00 Uhr vor Beginn der Infusionstherapie und an den Tagen 3, 7 und 10, um 8.00 Uhr nach einem 4-stündigen lipidinfusionsfreien Intervall gewonnen.

3.1.5. Kontrollgruppe

8 gesunde Erwachsene im Alter zwischen 23 und 66 Jahren, davon 4 Frauen und 4 Männer, standen als Kontrollgruppe zur Verfügung. Alle Teilnehmer boten eine unauffällige medizinische Vorgeschichte sowie regelrechte körperliche und laborchemische Untersuchungsbefunde, sie nahmen keine Medikamente ein, insbesondere keine

nonsteroidalen antiinflammatorischen Präparate. Der Blutentnahme ging kein fieberhaftes Ereignis voraus. Nach einer 8-stündigen Nahrungskarenz wurde die Blutentnahme um 8.00 Uhr mittels antecubitaler Venenpunktion vorgenommen.

3.2. Isolation der Blutzellen und Gewinnung von Plasma

3.2.1. Granulozyten

Die Isolierung humaner neutrophiler Granulozyten wurde nach einer Modifikation der Methode von Hjorth durch Zentrifugation über einen Zwei-Stufen-Percoll®-Dichtegradienten vorgenommen (262). Die Zellisolation fand unter standardisierten Bedingungen bei Raumtemperatur (20-25 ºC) statt.

Es wurden 50 ml heparinisiertes venöses Blut verwendet. Hierzu wurde Heparin in einer Polyethyleneinmalspritze vorgelegt und das Blut anschließend mit Hilfe dieser Spritze aspiriert, so dass eine Konzentration von 50 IE Heparin/ml Blut vorlag.

Für den zweistufigen Dichtegradienten wurden 4 ml einer 55 %igen Percoll®-Lösung (hergestellt aus einer Mischung von 55 ml Percoll®, 10 ml einer 1.5 molaren NaCl-Lösung, 35 ml Aqua destillata) in 15 ml Polystyrolröhrchen pipettiert und mit 4 ml einer 69 %igen Percoll®-Lösung (69 ml Percoll®, 10 ml der 1.5 molaren Kochsalzlösung, 21 ml Aqua destillata) unterschichtet. Anschließend wurden ca. 5 ml heparinisiertes Blut vorsichtig auf das 55 %ige Percoll® aufgetragen. Die Zentrifugation erfolgte unmittelbar nach dem Aufschichten bei Raumtemperatur mit 350 g für 20 Minuten. Nach Absaugen der Thrombozyten- und Plasma-Banden wurde die Bande der gewünschten Zellpopulation, welche zwischen den beiden Percoll®-Schichten zum Liegen gekommen war, mit Hilfe einer Kanüle und einer 1 ml-Polyethylenspritze abgetragen und in einem 50 ml-Greiner-Röhrchen für die anschließenden Waschschritte mit Hanks/Hepes +/- Puffer suspendiert. Dieser Puffer beinhaltete eine verminderte Ca^{2+}-Konzentration (0.5 mM), um das spontane Aggregationsverhalten der Granulozyten zu inhibieren. Die Zellen, jeweils in frischem Puffer resuspendiert, wurden mit zwei identischen Zentrifugationsschritten (5 Minuten, 500 g, Raumtemperatur) von Percoll®-Rückständen gereinigt.

Bei starker Erythrozytenkontamination des Zellpellets wurde eine hypotone Hämolyse zwischengeschaltet: Dazu wurden die Zellen in 18 ml Aqua bidestillata resuspendiert und

nach einer Zeit von 20 Sekunden wurde die Lyse durch Zusatz von 2 ml 10fachem Hanks-Konzentrat (HBSS) beendet.
Vor Versuchsbeginn erfolgte eine Zwischenkultur für 30-60 min bei 37 ºC und 100 % Luftfeuchtigkeit unter einer Begasung mit 95 % Raumluft und 5 % CO_2, nachdem die Zellen zuvor im Nährmedium RPMI 1640 mit 10 % fetalem Kälberserum aufgenommen worden waren.
Die Reinheit der PMN-Fraktion – in regelmäßigen Abständen über Differentialblutbilder kontrolliert - lag im Mittel bei 97 %. Die restlichen Zellen wurden als mononukleäre Leukozyten und eosinophile Granulozyten identifiziert. Die Zellvitalität wurde nach der Isolation mit Hilfe der Trypan-Blau-Ausschlussmethode und der LDH-Freisetzung überprüft. Nach erster Methode waren ca. 96 % der isolierten Zellen vital. Die spontane Laktatdehydrogenase-Freisetzung der PMN, bezogen auf die durch das Bienengift Mellitin hervorgerufene absolute Enzymfreisetzung, lag in allen Testungen unter 3 %.

3.2.2. Thrombozyten

Das zur Thrombozytenisolation benötigte Blut wurde in 3 ml-Polyethylenröhrchen aspiriert, die 700 µl einer 7.5 %igen EDTA-Lösung enthielten. Nach einer Zentrifugation mit 200 g für 10 min wurde das Blutplättchen-reiche Plasma dekantiert und mit 1500 g für 10 min zentrifugiert. Das Thrombozytenpellet wurde in isotonischem PBS-Puffer (pH 7.4) resuspendiert, gewaschen und anschließend in Tris-Puffer (20 mM; pH 7.4; 132.8 mM NaCl, 4.3 mM KCl, 1.1 mM KH_2PO_4, 2.4 mM $CaCl_2$ und 1.3 mM $MgPO_4$; 240 mg/100 ml Glucose) aufgenommen, sodaß 1 x 10^8 Thrombozyten/ml vorlagen. Für die in vitro-Stimulation wurden 1000 µl-Aliquots verwendet.

3.2.3. Plasma

Zur Analytik freier Fettsäuren im Plasma wurden den Patienten und den Teilnehmern der Kontrollgruppe 5 ml Blut in ein mit 0.5 ml 3.13 %iger Citratlösung beschicktes Polyethylen-röhrchen entnommen und dieses unmittelbar bei einer Zentrifugentemperatur von 4 ºC und 2000 g für 10 Minuten zentrifugiert. Das Plasma wurde dekantiert und auf Eis gekühlt der weiteren Analytik zugeführt.

3.3. Granulozytäre Funktionsparameter

3.3.1. Versuchsprotokolle

Kurz vor Stimulusapplikation wurden die Granulozyten zweimal gewaschen, in einer lichtmikroskopischen Zählung mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer bei 400facher Vergrößerung quantifiziert und in Hanks/Hepes +/+ Puffer aufgenommen, so dass 10×10^6 PMN/ml vorlagen. Anschließend wurden sie den verschiedenen Stimulationsprotokollen zugeführt.

3.3.2. Degranulierung

Hat eine Degranulierungsreaktion stattgefunden, so lässt sich dies in einem Auftreten von Inhaltsstoffen der verschiedenen sekretorischen Kompartimente des Granulozyten nachweisen. Die Enzyme Elastase und N-Acetyl-β-Glucosaminidase dienen als Marker der primären Granula und das Vitamin B_{12}-bindende Protein als Indikator einer Degranulation sekundärer Vesikel. So kann bei entsprechender Wahl der untersuchten Parameter der Einzelanteil der primären, sekundären und tertiären Granula an der Degranulierung gemessen werden. Wir quantifizierten das Ausmaß der Degranulierungsreaktion der isolierten PMN anhand der Freisetzung des proteolytischen Enzyms Elastase im Zellüberstand nach Modifikation der Methode von Kramps (263). Die Enzymaktivität wurde kinetisch über die Entstehung eines photometrisch detektierbaren Reaktionsprodukts ermittelt.
Nach Zusatz des chromogenen Substrates L-Pyroglutamyl-L-Propyl-L-Valin-p-Nitroanilidin wurde die Geschwindigkeit der Extinktionszunahme bei 405 nm als Maß für die Elastase-Aktivität genommen.

Durchführung:
Zu Beginn wurden 200 µl Messpuffer und 100 µl Verdünnungspuffer, deren Zusammensetzung der Materialienliste zu entnehmen ist, in der Küvette vorgelegt und anschließend 100 µl Granulozytenüberstand hinzugefügt. Durch die Zugabe von 200 µl Substratlösung wurde die Reaktion gestartet und die Extinktionszunahme bei 405 nm im Uvikon-Photometer fortlaufend über 4 Minuten gemessen. Die Messung erfolgte standardmäßig bei 37 ºC. Die aus der Extinktionszunahme errechnete Aktivität wurde in

Relation zum zellulären Elastasegesamtgehalt gesetzt – ausgeschüttet durch die Ultrabeschallung (50 Watt für 3 x 15 sec) eines unstimulierten Parallelansatzes mit korrespondierender Zellzahl.

3.3.3. Bildung von reaktiven Sauerstoffradikalen - „respiratorischer Burst"

Die Aktivierung des respiratorischen Burst in stimulierten Granulozyten wurde anhand einer Quantifizierung des primären Reaktionsproduktes der granulozytären NADPH-Oxidase – des Sauerstoffsuperoxids (O^{2-}) - beurteilt. Hierzu wurde die Methode von Cohen verwendet (264), deren Prinzip die photometrisch ermittelte Reduktion von Cytochrom C durch das von den stimulierten PMN freigesetzte Sauerstoffsuperoxid ist.
Vor Stimulation wurde das Cytochrom C den Versuchsansätzen zugesetzt, während Parallelansätze zusätzlich Superoxiddismutase (SOD) enthielten, ein Enzym, das die rasche Disproportionierung des O^{2-} zu den weniger reaktiven Produkten O_2 und H_2O_2 katalysiert und damit selektiv die O^{2-}-abhängige Cytochrom-Reduktion inhibiert. Erst der aus der Differenz beider Ansätze erhaltene, SOD-hemmbare Anteil der Cytochrom C-Reduktion lässt einen Rückschluss auf die Menge des gebildeten O^{2-} zu.

Durchführung:
Es wurden paarweise Proben mit 5 x 10^6 PMN/ml angesetzt, die jeweils 75 µM Cytochrom C enthielten. Einem der beiden Ansätze wurde 10 µg/ml SOD zugesetzt. Aufgrund der Instabilität der reaktiven Sauerstoffspezies muss das Cytochrom C bereits im Stimulationsansatz enthalten sein, um sofort mit dem gebildeten O^{2-} reagieren zu können. Die Stimulation der Zellansätze mit 1 µmol/l fmlp erfolgte bei 37 ºC im Schüttelwasserbad und wurde durch Kühlung der Probengefäße in Eis und anschließende Zentrifugation bei 4 ºC mit 1200 g für 5 min gestoppt. Die abpipettierten Zellüberstände wurden bei 546 nm, dem Absorptionsspektrum des reduzierten Cytochrom C, photometrisch analysiert, wobei jeweils die Extinktion gegen den Parallelansatz, der das SOD enthielt, gemessen wurde. Unter Annahme eines Extinktionskoeffizienten von 21 mM^{-1} cm^{-1} wurde mittels 1:1-Stöchiometrie der Reaktion die granulozytäre O^{2-}-Bildung errechnet.

3.3.4. Phosphatidylinositol-Metabolismus

Nach der von Berridge beschriebenen Methode wurde zur Beurteilung der Aktivierung inflammatorischer Signaltransduktionsmechanismen die Phospholipase C-vermittelte Entstehung von Inositolphosphaten aus mit [^{3}H]Inositol vormarkierten Membraninositiden bestimmt (265).

Durchführung:

Zunächst wurden die PMN in Medium 199 (ohne Glutamin und Inositol-arm) mit 2 % fetalem Kälberserum, 40 mM Hepes-Puffer (pH 7.4) resuspendiert, so dass 1 x 10^7 Zellen/ml vorlagen. Nachdem myo-[^{3}H]Inositol (50 µCi/ml) zugesetzt worden war, fand die zweistündige Markierungsperiode bei 37 ºC in einem Schwenkwasserbad statt. Durch das Schwenken wurde einer Verklumpung der Granulozyten vorgebeugt. Vor dem experimentellen Einsatz der markierten Zellen erfolgte ein zweimaliges Waschen mit Hanks-Lösung, welche 20 mM Hepes und 10 mM Lithiumchlorid enthielt. Der Zusatz von LiCl diente der Inhibition der zellulären IP_1-Phosphatase. Zu unterschiedlichen Zeiten nach der Stimulation mit 1 µmol/l fmlp wurden die Reaktionen durch die Zugabe von eisgekühlter 15 %iger Trichloressigsäure in einem Verhältnis von 1:1 (v/v) zum Probenvolumen beendet und die Probengefäße für 15 min auf Eis gestellt. Die Lipidfraktion wurde anschließend durch viermaliges Ausschütteln mit wassergesättigtem Diethylether (4 ml pro ml Probenvolumen) und Abpipettieren extrahiert und die zurückbleibende wässrige Phase mit Na^+-Tetraborat auf pH 8 neutralisiert.

Im nächsten Schritt erfolgte die Separation der Inositolphosphate mittels Anionenaustausch-Chromatographie. Hierzu wurden die mit Dowex-Ionenaustauscherharz selbst gepackten Säulen vor Gebrauch jeweils mit 5 ml 1.0 M NH_4-Formiat/0.1 M Ameisensäure (pH 4.58) und 5 ml Aqua bidestillata konditioniert, um [^{3}H]Inositol-Reste von der Matrix zu entfernen. Nun wurde mit 3 ml 5 mM Inositollösung die Sättigung unspezifischer Bindungsstellen bewirkt, bevor die mit Diethylether extrahierte wässrige Phase der Proben (2 ml/ml Probenvolumen) aufgetragen werden konnte. Nach dem Aufpipettieren von 4 ml 60 mM Ameisensäure/5 mM Na^+-Tetraborat zur Elution von Glycerophospho-[^{3}H]Inositol wurden die gesamten Phosphoinositide mit 2 ml 1.0 M NH_4-Formiat/0.1 M Ameisensäure eluiert.

Zur Differentialeluierung von IP_1, IP_2 und IP_3 war die sequentielle Säulenspülung mit Phasen ansteigender Ionenstärke notwendig. IP_1 wurde mit 5 ml 0.1 M Ameisensäure/0.2 M NH_4-Formiat (pH 3.81) eluiert, IP_2 mit 5 ml 0.1 M Ameisensäure/0.4 M NH_4-Formiat (pH 4.12)

und IP_3 mit 5 ml 0.1 M Ameisensäure/1.0 M NH_4-Formiat (pH 4.9). Alle Inositolphosphate wurden als IP_x zusammengefasst.
Die separat aufgefangenen Eluatfraktionen wurden in einem Verhältnis von 1:10 mit Szintillatorflüssigkeit versetzt und anschließend im β-Counter gemessen. Parallel zu den Proben wurden authentische Standards zur Überprüfung der Trennleistung der einzelnen Säulen verwendet.

3.3.5. Analytik der Lipoxygenase-Produkte von AA und EPA

Um die von der Arachidonsäure und Eicosapentaensäure abgeleiteten Metabolite der Lipoxygenase zu reinigen, aufzutrennen, zu identifizieren und zu quantifizieren, kam eine Sequenz aus Festphasen-Extraktion, Reversed-Phase-HPLC mit zusätzlicher UV-Spektrenanalyse und Straight-Phase-HPLC der derivatisierten Komponenten zum Einsatz.
Die nach der Stimulation mit 1 µmol/l A23187 gewonnenen Zellüberstände wurden unmittelbar nach der Abnahme auf Eis gestellt und ohne Unterbrechung der Kühlung innerhalb der darauffolgenden Stunde der weiteren Analytik zugeführt.

3.3.5.1. Festphasen-Extraktion

Dieses Verfahren dient der Reinigung und Anreicherung der granulozytären AA- und EPA-Metabolite. Eingesetzt wurden hierzu 1 cm^3 Vorsäulen (Bond Elut) mit einer Silica-Gel-Matrix von 40 µm Partikelgröße, die kovalent mit gesättigten C18-Alkylresten verbunden war. Diese Matrix war durch eine hohe Affinität zu unpolaren Verbindungen gekennzeichnet, wodurch die Extraktion der Lipoxygenase-Metabolite aus dem wässrigen Zellüberstand und deren anschließende Eluierung durch Zugabe des unpolaren Lösungsmittels Methanol möglich wurde. Es wurden ausschließlich eisgekühlte Lösungen in diesem Verfahren verwendet. Weiterhin kam eine an eine Wasserstrahlpumpe angeschlossene Vakuumkammer zum Einsatz, um eine raschere Elution der eingesetzten Lösungen zu erreichen.
Zunächst wurde die Konditionierung der Vorsäulen mittels Zugabe von jeweils zweimal 1 ml Methanol und Aqua tridest. vorgenommen. Im Anschluss daran wurden die eisgekühlten Zellüberstände aufpipettiert und langsam durch die Matrix gesaugt. Um retinierte polare Metabolite von der Säule zu spülen, wurde die Säule zweimal mit Aqua tridest. gewaschen und die wässrige Phase durch rasches Durchsaugen von 100 µl Chloroform vollständig von der Säulenmatrix entfernt. Es schloss sich die Methanol-Elution der angereicherten unpolaren

Verbindungen an. Hierfür erfolgte das Aufgeben von 250 µl Methanol, das schrittweise nach einer Einwirkzeit in untergestellte 1.5 ml-Eppendorfgefäße gesaugt wurde. Die so gewonnenen Proben wurden bis zum vollständigen Eindampfen des Lösungsmittels einem kontinuierlichen Stickstoffstrom ausgesetzt und in dieser Form bis zur weiteren HPLC-Analytik bei –20 ºC gelagert.

Die mit dem beschriebenen Verfahren erreichte Recovery der einzelnen Metabolite wurde in acht separat durchgeführten Experimenten kontrolliert und wird in der nachfolgenden Tabelle zusammengefasst:

Recovery der AA-Derivate [%]		**Recovery der EPA-Derivate [%]**	
ω-COOH-LTB_4	78.6 ± 2.5	ω-COOH-LTB_5	73.5 ± 1.9
ω-OH-LTB_4	82.3 ± 2.0	ω-OH-LTB_5	79.4 ± 2.3
LTB_4	75.3 ± 1.5	LTB_5	76.8 ± 1.8
6-trans-LTB_4	80.4 ± 1.4	6-trans-LTB_5	76.4 ± 1.9
6-trans-epi-LTB_4	73.0 ± 1.9	6-trans-epi-LTB_5	70.6 ± 2.3
5, 6-DiHETE	67.2 ± 4.1	5, 6-DiHEPE	64.9 ± 3.4
5, 6-epi-DiHETE	64.4 ± 3.1	5, 6-epi-DiHEPE	67.4 ± 3.6
5s, 12s-DiHETE	66.0 ± 1.3		
LTC_4	45.7 ± 2.8	LTC_5	39.8 ± 3.5
LTD_4	58.9 ± 2.5	LTD_5	56.9 ± 2.7
LTE_4	54.8 ± 1.9	LTE_5	59.4 ± 2.0
5-HETE	60.8 ± 2.4	5-HEPE	64.6 ± 3.4
12-HETE	63.2 ± 3.0	12-HEPE	66.8 ± 2.4
15-HETE	65.8 ± 1.7	15-HEPE	69.7 ± 2.3

3.3.5.2. HPLC-Analytik

Herstellung und Konditionierung der HPLC-Säulen

Die verwendeten HPLC-Säulen wurden mit Hilfe einer Säulenpackvorrichtung hergestellt. Die Leersäulen waren 25 cm lange Edelstahlsäulen mit einem Innendurchmesser von 0.46 cm, die für die Reversed-Phase-HPLC mit Octadecylsilyl-Hypersil (5 µm Partikel), für die Straight-Phase-HPLC mit Silica-Gel (Partikelgröße von 5 µm) als Packungsmaterial bestückt wurden. Zuvor wurden 3.8 g der Trockensubstanz in 35 ml Isopropanol durch Schütteln in

einem geschlossenen Glasbehälter suspendiert und nach der 5-minütigen Ultraschallbad-behandlung in den Vorratsbehälter des Säulenpackungsgerätes eingefüllt. Dieses beschickte nun unter einem Druck von 440 bar und einem Methanolstrom die einseitig verschlossene Edelstahlsäule. Die so fertiggestellte Säule wurde verschlossen und an einer Seite mit einer 3.3 cm langen, mit 40 µm Silica-Gel handgepackten Vorsäule zum Schutz der Hauptsäule vor gröberen polaren Verunreinigungen verbunden. Die Konditionierung der Säule wurde mittels einer Lösung von Na_2EDTA (0,5 %ig) in Methanol/H_2O (Verhältnis 1:9) zur Reduktion des unspezifischen Bindungsverhalten der Cysteinylleukotriene in Gegenwart von Schwermetall-ionen vorgenommen (266).

Herstellung der mobilen Phase

Die verwendeten Lösungsmittelkomponenten lagen alle in hochreiner HPLC-Qualität vor.

Die *mobile Phase der Reversed-Phase-HPLC* bestand aus Methanol/H_2O/Acetat in einem Verhältnis von 72:18:0.16, der pH der Lösung wurde mit 10 %igem NH_4OH auf 4.9 eingestellt. Die *mobile Phase der Straight-Phase-HPLC* setzte sich aus Hexan und Isopropanol im Verhältnis 82:18 (v/v) zusammen. Zur Reinigung von partikulären Anteilen erfolgte jeweils die Filtration durch eine Teflonmembran mit Hilfe eines Ganzglas-Filtersystems (Firma Schott) und 700 mbar Unterdruck. Unverzüglich schloss sich eine Entgasung im Ultraschallbad an.

Reversed-Phase-HPLC-Analytik

Prinzip dieses Verfahrens der chromatographischen Auftrennung auf der Reversed-Phase-HPLC-Säule sind einerseits die apolaren Wechselwirkungen der Eicosanoid-Kohlenstoffketten mit den apolaren Kohlenstoffketten der stationären Phase (Packungs-material der Säule), andererseits die polaren Wechselwirkungen funktioneller Gruppen mit der polaren Flüssigphase. Die differenten Retentionszeiten der Substanzen sind durch deren unterschiedliche Polarität bedingt, die wiederum von der Anzahl dissoziierbarer Carboxyl-, Hydroxyl- und Aminogruppen abhängt. Durch Veresterung wird die molekulare Polarität reduziert und damit die Affinität gegenüber der apolaren stationären Phase gesteigert, was zu einer definierten Verlängerung der Retentionszeiten auf der HPLC-Säule führt. Die verschiedenen Eicosanoide konnten durch Koelution mit authentischen Standards identifiziert werden.

Für dieses Trennverfahren kam eine modifizierte Form des von Mathews et al. beschriebenen Verfahrens zum Einsatz (267).

Die für diese Methode verwendete Anlage setzte sich wie folgt zusammen:

- Gynkothek M600 Pumpe (Gynkothek; München, Deutschland)
- Rheodyne-Probenaufgabeventil Modell 7125 (Rheodyne über Latek; Eppelheim, Deutschland), syringe loading sample injector
- Reversed-Phase-HPLC-Säule
- Spektroflow 773 Detektor für eine variable Wellenlänge
- Integrator C-R6A (Shimadzu über Gynkothek; München, Deutschland)
- Photodiode Array Detector Model 990 (Waters; Eschborn, Deutschland).

Die im Anschluss der Festphasenextraktion eingedampften und gekühlten Proben wurden in 50 µl Methanol aufgenommen und gründlich gemischt, um an der Gefäßwand haftende Probenbestandteile zu resuspendieren. Nach einer Zentrifugation bei 1000 g für 2 min wurden 20 µl des Probenvolumens mit Hilfe einer Hamilton-Spritze über das Probenaufgabeventil auf die HPLC-Säule gegeben. Die Elution der Eicosanoide von der Säule erfolgte isokratisch bei einer konstanten Durchflußrate von 1.3 ml mobiler Phase/min und einem Druck von ungefähr 160 bar.

Dieses Verfahren eignete sich zur Darstellung sowohl der verschiedenen HET(P)E, der Cysteinylleukotriene der 4er- und 5er-Serie als auch der Trennung der 6-trans-diastereomeren Paare von $LTB_{4/5}$ und der 5,6-DiHET(P)E. Eine Trennung der polaren ω-Oxidationsprodukte OH-$LTB_{4/5}$ und COOH-$LTB_{4/5}$, Abbauprodukte von $LTB_{4/5}$, war mit dieser Methode nicht möglich, da diese Substanzen zusammen mit der Lösungsmittelfront und den polaren Verunreinigungen von der Säule eluiert wurden.

Für die Detektion der Leukotriene wurde der Spektroflowdetektor auf eine Wellenlänge von 270 nm für 20 min eingestellt, für die der HET(P)E anschließend auf 237 nm. Die sich in ihren Retentionszeiten unterscheidenden eluierten Eicosanoide wurden mittels Vergleich mit den Retentionszeiten isolierter Standards identifiziert. Eine Quantifizierung der einzelnen Verbindungen erfolgte anhand der mit Hilfe des Shimadzu-Integrators integrierten Peakflächen der aufgezeichneten Chromatogramme und anhand einer Standardeichkurve. In die Berechnung einbezogen wurde die Recovery der Festphasen-Extraktion.

Diazomethan-Methylierung

Um die Polarität der zu trennenden Komponenten für das nachfolgend beschriebene HPLC-Verfahren zu ändern, war eine Methylierung mit Diazomethan erforderlich.

Herstellung des Methylierungsreagenz Diazomethan

Das Diazomethan wurde aus dem Vorläufermolekül N-Methyl-N`-nitro-N-nitrosoguanidin gewonnen. Hierzu wurden 2.5 g des getrockneten Guanidinderivats in den inneren Behälter, 15 ml Diethylether in den äußeren Behälter des kommerziell von der Firma Chrompack erhältlichen Minigenerators vorgelegt. Das geschlossene Reaktionsgefäß befand sich während des gesamten Herstellungsvorgangs in einem Eisbad. Schrittweise und sehr vorsichtig wurden maximal 1.5-2 ml 5 N NaOH auf die Festsubstanz geträufelt. Das entstehende gasförmige Diazomethan entwich aus dem inneren Behälter und löste sich in dem Diethylether des äußeren Behälters. Die Herstellung erfolgte in bedarfsgerechten Mengen, die in eisgekühltem Zustand verwendet wurden.

Straight-Phase-HPLC der methylierten Komponenten

Hier fand das von Nadeau publizierte Verfahren in modifizierter Form Anwendung (268). Prinzip dieses Verfahrens ist das Verwenden einer polaren Straight-Phase-Säule und einer apolaren mobilen Phase. Damit entsteht ein chromatographisches System mit geänderten Retentionszeiten der zu trennenden Komponenten, die zusätzlich als Methylester vorliegen.

Das zur Methylierung eingesetzte Reagenz war Diazomethan. 800 µl des generierten Diazomethans in Ether, 200 µl Methanol und 60 µl der zu methylierenden Probe reagierten 20 Minuten unter ständigem Rütteln im Dunkeln zu Methylestern. Die Etherphase wurde abpipettiert, in ein Spitzboden-Chromacol-Vial gegeben und unter einem kontinuierlichen Stickstoffstrom getrocknet, anschließend in 50 µl Hexan/Isopropanol (80:20, v/v) aufgenommen, mit Argon überschichtet und bei –20 ºC gelagert.

Eine Anlage aus einer Gynkothek Pumpe M300, einem Rheodyne Probenaufgabeventil 7125 (syringe loading sample injector), einem Gynkothek UV-Detektor SP6 und einem Shimadzu Integrator C-R6A fand hier Verwendung. Die Herstellung der Säule und der mobilen Phase Hexan/Isopropanol (82:18, v/v) erfolgte wie oben beschrieben. Die Komponenten eluierten mit einem konstanten Fluss von 1.0 ml/min. Die Detektion der Leukotriene und HET(P)E wurde bei einer Wellenlänge von 270 bzw. 237 nm vorgenommen.

Hier gelang insbesondere die Auftrennung der ω-Oxidationsprodukte des $LTB_{4/5}$ und seiner 6-trans-Isomeren und der Diastereomerenpaare. Die Quantifizierung erfolgte ebenfalls anhand der integrierten Peakflächen der aufgezeichneten Chromatogramme mit Hilfe einer Standardeichkurve. In den Berechnungsfaktor wurde die Recovery der Vorsäulenextraktion einbezogen.

UV-Spektrenanalyse

Durch einen der HPLC-Anlage nachgeschalteten Photodiodenarray-Detektor war eine zusätzliche Identifizierung und Charakterisierung der einzelnen Lipoxygenase-Metabolite nach HPLC-Trennung mittels spektraler Analyse aller Peaks in einem Wellenlängenbereich zwischen 190 und 330 nm möglich. Mit Hilfe dieses Verfahrens konnten unspezifische Verunreinigungen innerhalb der Leukotrienfraktionen sensitiv erfasst werden. Im Folgenden sind die Haupt- und Nebenmaxima der untersuchten Mediatoren einschließlich der korrespondierenden Absorptionskoeffizienten zusammengefasst (269):

Verbindung		UV-Maximum [nm] (Absorptionskoeffizient)	
LTB_4	260	270 (51000)	281
LTC_4	270	280 (40000)	292
LTD_4	270	280 (40000)	292
LTE_4	270	280 (40000)	290
5-HETE		235 (30500)	
15-HETE		237 (30500)	

Da die Spektren der Eicosapentaensäuremetabolite mit den korrespondierenden Spektren der Arachidonsäurederivate übereinstimmten, wurden zur photometrischen Quantifizierung die Werte der entsprechenden 4er-Metabolite als molare Absorptionskoeffizienten angenommen.

3.3.6. Plättchen-aktivierender Faktor

Die Quantifizierung der granulozytären PAF-Synthese erfolgte nach einer radioaktiven Markierung mittels [^{3}H]Acetat, einer Auftrennung mittels Straight-Phase-HPLC und durch die sich daran anschließende Radioaktivitätsbestimmung im Granulozytenextrakt. Hier kam die von Tessner et al. beschriebene Methode (270) zum Einsatz.
Die einzelnen Schritte dieser Analytik werden im nun Folgenden beschrieben.

Lipidextraktion

Die Extraktion der Lipide aus den PMN-Proben wurde modifiziert nach der von Bligh und Dyer beschriebenen Methode durchgeführt, wobei sowohl Granulozyten als auch

Zellüberstände in einem Schritt aufgearbeitet wurden. Damit erfolgte die Bestimmung der Gesamtproduktion von PAF ohne Differenzierung in zellständige und freigesetzte PAF-Moleküle (271).

1 x 10^7 PMN wurden in der Anwesenheit von 50 µCi [^{3}H]Acetat mit 1 µmol/l A23187 stimuliert, ein Gesamtvolumen von 1 ml erhaltend. Nach Beendigung der Inkubation in Hanks-Puffer mit 20 mM Hepes und 0.25 % BSA wurde die Reaktion durch Zugabe von 2 ml eisgekühlter 50 mM Essigsäure in Methanol und von 500 µl eisgekühltem Methanol gestoppt. Diese zellhaltige Lösung wurde daraufhin in ein 15 ml-Polyethylenröhrchen der Firma Falcon gegeben und unter Zugabe von zweimal 750 µl Chloroform aufgeschüttelt. Die Trennung in eine wässrige und eine lipophile Phase wurde durch das Hinzufügen von 750 µl 0.1 mM Natriumacetat erreicht. Nach einer Zentrifugation bei 350 g für 3 min wurde der wässrige Überstand abpipettiert und verworfen. Es folgten drei Waschschritte mittels Zugabe von jeweils 1 ml eines Gemischs aus Methanol/0.1 M Natriumacetat in einem Verhältnis von 10:9, letzteres wurde nach gründlichem Aufrütteln wieder entfernt. Die untere, lipidhaltige Chloroformphase wurde abpipettiert, in ein Eppendorfgefäß gegeben und konnte so bei -20 °C bis zur weiteren Analytik mittels Chromatographie gelagert werden. Kurz vor Einsatz in der HPLC-Analytik erfolgte die Evaporation des Chloroforms unter einem kontinuierlichen Stickstoffstrom und die erneute Dissolution in 60 µl mobiler Phase.

Straight-Phase-HPLC-Analytik

Die zur Auftrennung der Phospholipidklassen verwendeten Geräte waren

- HPLC M600 Pumpe (Gynkothek; München, Deutschland)
- Szintillatorzähler und Monitor der Firma Raytest, Modell Ramona 5LS
- Rheodyne-Probenaufgabeventil Modell 7125 (syringe loading sample injector)
- HPLC-Integrator Modell C-R6A (Gynkothek; München, Deutschland).

Wie bereits beschrieben, wurde die Säule der Straight-Phase-HPLC-Methode mit Silica-Gel bestückt. Die Elution erfolgte isokratisch mittels Acetonitril/Methanol/Phosphorsäure (Verhältnis 95.5:3.5:1) bei einem konstanten Durchfluß von 1.8 ml/min und einem Druck von ca. 80 bar.

Diese Radioaktivitätschromatographie eignete sich zur Darstellung der einzelnen Hauptklassen der zellulären Phospholipide: Es fand eine Separation von Phosphatidyl-Inositol, Phosphatidyl-Serin, Phosphatidyl-Ethanolamin, Phosphatidyl-Cholin, Sphingomyelin sowie von PAF und Lyso-PAF statt. Diacylglycerol und Phosphatidsäure koeluierten mit der Chromatogrammfront und konnten daher nicht getrennt werden.

Bis zu 0.6 % des exogen angebotenen [^{3}H]Acetat wurde innerhalb der 15-minütigen Inkubationsmethode in die zelluläre Lipidfraktion inkorporiert.

3.4. Thrombozytäre Funktionsparameter: Analytik der Cyclooxygenase-Produkte von AA und EPA

Die Prostanoide der 2er- und 3er-Serie, vorliegend im Zellüberstand der isolierten und stimulierten Blutplättchen, konnten durch Festphasen-Extraktion gewonnen werden. Es schloss sich die Auftrennung durch ein Reversed-Phase-HPLC-Verfahren an sowie eine Quantifizierung der Substanzen durch einen Post-HPLC-ELISA. Hier war es erforderlich, mit Ionenpaar-Reagenzien, Antioxidanzien und hoher Pufferkonzentration zu arbeiten, um den chemischen Umbau und Zerfall der Komponenten zu verhindern. Zum Einsatz kam die von Krämer et al. beschriebene Analytik (272).

3.4.1. Standardprotokoll der Thrombozytenstimulation

Die in Tris-Puffer in einer Zahl von 1 x 10^8/ml vorliegenden Thrombozyten wurden mit 5 U Thrombin/ml PBS-Puffer bei einer Temperatur von 37 °C stimuliert und nach einer Inkubationszeit von 15 min wurde die Reaktion durch die Zugabe von 500 µl 1 M Tetrabutylammoniumdihydrogenphosphat (TBA; pH 7.0) und 4 ml eisgekühltem Tris-Puffer abgestoppt. Nach Zentrifugation bei 1500 g für 10 min wurden TxA_2 und TxA_3 aus dem Zellüberstand anhand ihrer stabileren Hydrolyseprodukte TxB_2 und TxB_3 gemessen. Sie wurden mittels Festphasen-Extraktion aus dem Zellüberstand gewonnen.

3.4.2. Festphasen-Extraktion

Sowohl die gewonnenen und stimulierten Proben als auch Leerwertkontrollen und Kontrollen mit einem definierten Thromboxan-Zusatz wurden mit 1 ml des Ionenpaar-Reagenz TBA versetzt und zur Festphasen-Extraktion auf die mit 25 ml Aceton/Acetonitril (1:1, v/v) und 25 ml Aqua dest. vorkonditionierten C18-Säulen in einem Volumen von 10 ml aufgetragen. Die Elution erfolgte unter leichtem Sog einer Wasserstrahlpumpe mit 2 x 500 µl einer

Aceton/Acetonitril-Lösung (50:50; v/v) in 2 ml-Eppendorfgefäße. Nach Zugabe von 20 µl eines 10fach konzentrierten PBS (pH 7.4) und 100 µl einer 1 %igen α-Tocopherol-Lösung in Acetonitril wurde das Eluat in flüssigem Stickstoff schockgefroren und darauf in einer Vakuumzentrifuge gefriergetrocknet. Vor der HPLC-Analytik wurden die Proben bei –20 °C aufbewahrt.

3.4.3. Reversed-Phase-HPLC-Analytik

Die hierzu verwendete Anlage bestand aus zwei gekoppelten 0.46 x 15 cm HPLC-Edelstahlsäulen, die ODS-Hypersil-Partikel, wie oben beschrieben, als stationäre Phase enthielten, aus einer Gynkothek Pumpe M300, einem Rheodyne-Probenaufgabeventil und einem UV-Detektor UV 160 (Gynkothek; München, Deutschland). Eine Mischung aus Acetonitril/Aqua destillata in einem Verhältnis von 28:72 (v/v), mit einem Zusatz von 0.5 mM TBA und mit 10 %iger Ammoniak-Lösung auf pH 7.3 eingestellt, diente in diesem Verfahren als mobile Phase. Die Flussrate betrug 1 ml/min.
Dieses Verfahren ermöglichte eine Basislinientrennung folgender Prostanoide innerhalb von 14 min: 6-keto-$PGF_{2\alpha}$, $PGF_{3\alpha}$, PGE_3, TxB_2, $PGF_{2\alpha}$ und PGE_2. Lediglich TxB_3 und 6-keto-$PGF_{1\alpha}$ koeluierten.
Die gefriergetrockneten Thrombozytenextrakte wurden durch zweimaliges Aufnehmen in 20 µl Acetonitril und Beschallung mit Ultraschall gelöst, anschließend zentrifugiert und der gesamte Überstand auf die HPLC-Säule aufgetragen. Zwischen Minute 4 und 14 nach der Probeninjektion, in Korrespondenz zu den bekannten Retentionzeiten der Einzelsubstanzen, schloss sich eine Sammlung der mobilen Phase mit dem Eluat der Säule in 300 µl-Portionen an. Zuvor waren bereits 20 µl einer 1 %igen α-Tocopherol-Lösung, in Acetonitril vorliegend, und 20 µl 10fach konzentriertes PBS (pH 7.0) in die Sammelgefäße vorgelegt worden. Die fraktionierten Post-HPLC-Proben wurden erneut schockgefroren, gefriergetrocknet, dann in 300 µl Aqua destillata aufgenommen und so dem ELISA-Verfahren zugeführt.

3.4.4. Post-HPLC-ELISA

Hier fand der Ansatz von Dray et al. Verwendung (273).
Zur Beschichtung der 96-Well-ELISA-Platten dienten 200 µl Kupplungspuffer aus 46 mM $Na_2CO_3/NaHCO_3$ (pH 9.6), in welchem die Aliquots der nach der Methode von Dray et al.

hergestellten Konjugate ebenfalls aufgelöst waren. Es schloss sich eine Inkubationsphase bei 4 ºC über Nacht an.

Anschließend wurden die Platten dreimal mit PBS/0.1 %igem Tween 20 gewaschen und mit PBS/1 %igem BSA beladen, um die unspezifische Absorption zu reduzieren. Nach einer zweistündigen Zwischenphase bei 20 ºC wurden die Platten erneut dreimal gewaschen und dann jedes Probenwell mit 100 µl Probe sowie 100 µl der Antikörper-Lösung (monoklonaler Mausantikörper gegen TxB_2 mit einer Kreuzreaktivität von 90 % gegenüber TxB_3) in PBS/2 %igem BSA bestückt. Nach einer Reaktion über Nacht bei 4 ºC und erneutem dreimaligen Waschen mit der Tween-Lösung wurde jedes Plattenwell mit je 200 µl biotinyliertem anti-Maus-Antikörper, 1:1000 verdünnt in PBS/1 %igem BSA, beladen und für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem Entfernen des ungebundenen Antikörpers folgte die Inkubation mit 200 µl Avidin-Biotin-Meerrettich-Peroxidase über zwei Stunden bei 20 ºC, gefolgt von einem weiteren Waschschritt.

Am Ende stand die enzymatische Farbkonversion. Dafür wurde eine Inkubation mit 200 µl 2,2`-Azino-di-[3-ethylbenzthiazolinsulfonat(6)]-Lösung (ABTS-Lösung; 20 mg ABTS in 30 ml Puffer, gemischt mit 10 µl 30 %iger H_2O_2) bei 4 ºC über Nacht durchgeführt. Mittels Detektor wurden die Platten anschließend bei einer Wellenlänge von 405 nm gemessen.

Im Hinblick auf die gemessenen Prostanoide sind in der nachfolgenden Tabelle die Gesamtwiederfindungsraten über mehrere Konzentrationsbereiche aufgelistet (hierbei handelt es sich jeweils um den Mittelwert aus 6 unabhängigen Experimenten):

Prostanoid	**Recovery**
6-keto-$PGF_{1\alpha}$	90 %
6-keto-$PGF_{2\alpha}$	87 %
TxB_2	90 %
TxB_3	68 %

Unter Berücksichtigung dieser Recoverydaten erfolgte anhand einer Standardeichkurve die Quantifizierung der Prostanoide aus dem Thrombozytenüberstand.

3.5. Charakterisierung von freien Fettsäuren im Plasma

Die nicht-veresterten, d. h., freien Plasmafettsäuren wurden in einem einstufigen Extraktions-Methylierungs-Verfahren und anschließender gaschromatographischer Analytik quantifiziert. Hier kam das von Pace-Asciak beschriebene Verfahren zum Einsatz (274).

3.5.1. Extraktion und Methylierung

200 µl des gewonnenen Plasmas wurden in ein 1.5 ml-Glasvial (Firma Zinsser) mit Teflonschraubverschluss pipettiert und mit 16 µg der als internen Standard verwendeten Margarinensäure (C 17:0), vorliegend in einem Volumen von 4 µl, und 200 µl Methanol unter kräftigem Aufrütteln vermischt.
Die Methylierung der freien Fettsäuren erfolgte mittels Zugabe von 1 ml etherischem Diazomethan als Methylierungsreagenz, dessen Herstellung bereits beschrieben wurde.
Nach Starten der Veresterungsreaktion und ausführlichem Vortexen folgte eine 10-minütige Inkubation abgedunkelt bei Raumtemperatur. Anschließend wurden 800 µl der oberen Diethylether-Phase mit Hilfe von Glaspasteurpipetten abgenommen, in ein Spitzbodenvial (Firma Chromacol) gegeben und unter einem kontinuierlichen Stickstoffstrom abgedampft. Die Proben wurden unter Stickstoffstrom verschlossen, so dass ein Stickstoffkissen auf den getrockneten Substanzen zu liegen kam, und bei –20 °C bis zur gaschromatographischen Analytik aufbewahrt.
Die Wiederfindungsrate wurde anhand des in jeder Probe mitgeführten internen Standards der Margarinensäure ermittelt und in der Berechnung berücksichtigt.

3.5.2. Gaschromatographie

Die Gaschromatographie (GC)-Anlage setzte sich, wie folgt, zusammen:

- Gaschromatograph CP 9000 (Fa. Chrompack AG; Frankfurt, Deutschland)
- Sampler (Fa. Chrompack AG; Frankfurt, Deutschland)
- Kapillarsäule CP-Sil 80 (Fa. Chrompack AG; Frankfurt, Deutschland)
- Software der Fa. Chrompack.

Als Chromatographiesäule wurde eine mit Silicagel beschichtete Kapillarsäule der Fa. Chrompack (50 m x 0.25 mm) verwendet. Ihr war eine Vorsäule (fused silica retention gap der Fa. Chrompack, 2,5 m x 0,25 mm) zum Schutz vor Verunreinigungen vorgeschaltet. Um eine schnelle und optimale Trennung der Methylester zu erreichen, wurde Wasserstoff als Trägergas eingesetzt.
Zur gaschromatographischen Analyse der entstandenen Methylester wurden die getrockneten Proben unmittelbar zuvor in 50 µl Chloroform aufgenommen und kräftig aufgerüttelt. Mittels einer 1 µl-Hamilton-Spritze wurde 1 µl des Probenvolumens in den Inlet-Splitter injiziert. Dieser arbeitete mit einem Split von 1:50, d. h., der fünfzigste Teil des Aufgabevolumens wurde auf die Säule geleitet. So wurde einer Überladung der Säule sowie einer Verminderung der Trennleistung vorgebeugt. Bei einem Säulendurchfluss von 1 ml/min und einem Druck von 100 kPa wurde mittels folgendem Programm eine optimale Separation der Fettsäuremethylester erzielt:
Die initiale Ofentemperatur betrug 160 ºC für 2 min. Eine Steigerung auf eine Endtemperatur von 220 ºC wurde mit einer Anstiegrate von 4 ºC/min vorgenommen und dann für 3 min gehalten. Der Injektor arbeitete mit einer Temperatur von kontinuierlich 250 ºC, der Detektor mit 300 ºC. Der eingesetzte Flammen-Ionisations-Detektor (FID) wurde während der Chromatographiezeit mit konstanten Flussraten folgender Gase beschickt: synthetische Luft (Flussrate 250 ml/min), Stickstoff (30 ml/min) und Wasserstoff (30 ml/min).

Diese Methode ermöglichte eine Basislinientrennung für ein Spektrum von 24 physiologisch relevanten veresterten Fettsäuren (C12:0 bis C22:6). Die Retentionszeiten der einzelnen Fettsäurenmethylester wird von deren Affinitätsverhalten zur stationären Phase bestimmt. Mit Zunahme der Kettenlänge und der Anzahl der Doppelbindungen verzögert sich die Elution der Substanzen von der Säule. Über einen Vergleich der Retentionszeiten mit authentischen Standards war eine Quantifizierung der in den Proben enthaltenen Methylester möglich. Diese Standards wurden täglich zu Beginn der Messreihe aufgetragen, auch wenn das chromatographische Verhalten der FAME (**f**atty **a**cid **m**ethyl**e**ster) über alle Messungen eine hohe Reproduzierbarkeit bot. Eine Quantifizierung der einzelnen Verbindungen wurde mit Hilfe der Standardeichkurve und anhand der integrierten Fläche unter der Peakkurve der aufgezeichneten Chromatogramme durchgeführt.

3.6. Statistik

Alle Daten sind als Mittelwert ± Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben. Da die Studie als Pilotstudie geplant war, wurde eine explorative Datenanalyse durchgeführt. Die statistischen Analysen wurden mit dem Paket SigmaStat® berechnet.

Im Fall von LTB_4, Elastase, IP_x und PAF wurde der höchste Wert in jeder Patientengruppe mit dem Wert der Kontrollgruppe mittels Varianzanalyse und dem Student-Newman-Keul post-hoc-Test verglichen.

Im Fall des TxB_3/TxB_2-Verhältnisses, freier AA und freier EPA wurde die gleiche Methode für den niedrigsten Wert angewendet.

Um einen Einfluss der Behandlung zu testen, führten wir eine Analyse für repeated-measures mit dem Student-Newman-Keul post-hoc Test durch.

Um die Hypothese zu testen, dass sich Vasopressoren und Beatmungstage zwischen den Behandlungsgruppen unterschieden, wurde ein Cochran-Armitage Trendtest durchgeführt. Ein Niveau von $p < 0.05$ wurde als statistisch signifikant bezeichnet.

4. MATERIAL

4.1. Inkubationsmedien und Agenzien der Zellisolation

- BSA (bovines Serumalbumin), Fettsäure-frei (Paesel & Lorei; Hanau, Deutschland)
- Calciumdichlorid ($CaCl_2$ x 2 H_2O pro analysi), MW 147.02 (Merck; Darmstadt, Deutschland)
- EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure-Dinatrium-Dihydrat Titriplex), Calciumchelator; MG 372.24 (Merck; Darmstadt, Deutschland)
- FCS (fetales Kälberserum) (Gibco; Karlsruhe, Deutschland)
- Hanks Balanced Salt Solution (HBSS) (10 x), ohne Phenolrot (Gibco; Karlsruhe, Deutschland)
- HBSS, Ca^{2+}-, Mg^{2+}- und Phenolrot frei (10 x) (Gibco; Karlsruhe, Deutschland)
- Hanks/HEPES +/+ (cum Ca^{2+}/Mg^{2+}), 1 Liter -Pufferlösung:
  100 ml HBSS (10 x)
  + 6 g HEPES (= 25 mM)
  + 1 n NaOH ad pH 7.4
  mit Aqua dest. auf 1000 ml auffüllen
- Hanks/HEPES +/- mit reduziertem Calciumgehalt, 1 Liter-Pufferlösung:
  100 ml HBSS (10 x), Ca^{2+}-, Mg^{2+}- und Phenolrot frei
  + 6 g HEPES (= 25 mM)
  + 0.5 mM $CaCl_2$ x 2 H_2O
  + 1 n NaOH ad pH 7.4
  mit Aqua tridest. auf 1000 ml auffüllen
- HEPES (N-2-Hydroxyethylpiperazine-N`-2-ethanesulfonic acid), MW 238.3; pK_a 7.5 bei 25º C (Sigma; Deisenhofen, Deutschland)
- LDH-Kit zur Lactatdehydrogenase-Messung (Boehringer; Mannheim, Deutschl.)
- Liquemin 5.000 IE/0.5 ml (Heparin-Natrium) (Hoffmann La Roche AG; Grenzach-Whylen, Deutschland)
- Mellitin (Sigma; Deisenhofen, Deutschland)
- PBS (phosphate buffered saline) (Merck; Darmstadt, Deutschland)
- Percoll: mit kolloidalem Polyvinylpyridin ummanteltes Kieselgel,
  Dichte 1.130/ml, pH 8.8 +/- 0.3, Osmolalität 16 mOs/kg H_2O
  (Pharmacia Fine Chemicals; Uppsala, Schweden)
- RPMI-Medium 1640 ohne L-Glutamin (Gibco; Karlsruhe, Deutschland)
- Tris [tris-(Hydroxymethyl)-aminomethane] (Calbiochem; La Jolla, USA)
- Trypan-Blau (Boehringer; Mannheim, Deutschland)

4.2. Experimentelle Agenzien und Pharmaka

- A 23187 (Calcium-Ionophor) (Calbiochem; La Jolla, USA)
- Cytochrom C (Sigma; Deisenhofen, Deutschland)
- Diethylether, destilliert in Glas, pro analysi (Fluka AG; Bern, Schweiz)
- Fmlp (Formylmethionyl-leucyl-phenylalanin), chemotaktischer Rezeptorligand (Sigma; Deisenhofen, Deutschland)
- N-methyl-N`-nitro-N-nitrosoguanidin (Fluka AG; Bern, Schweiz)
- PAF (1-O-Hexadecyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholin), chemotaktischer Rezeptorligand (Sigma; Deisenhofen, Deutschland)
- Superoxiddismutase (SOD) (Sigma; Deisenhofen, Deutschland)
- WEB 2086, PAF-Rezeptorantagonist (Boehringer; Mannheim, Deutschland)

4.3. Elastase-Messung

- Messpuffer zur Elastase-Messung:
  100 mmol/l Tris-HCl, 960 mmol/l NaCl, pH 8.3
  Ansatz: 60 ml Aqua dest.
  + 1.21 g Tris
  + 5.62 g NaCl
  + 1 M HCl ad pH 8.3
  mit Aqua dest. auf 100 ml auffüllen
- Substratlösung zur Elastase-Messung:
  chromogenes Substrat S-2484 (L-Pyroglutamyl-L-Valin-p-Nitroanilidin) (KabiVitrum; Stockholm, Schweden)
  Ansatz: 25 mg Trockensubstanz
  + 7 ml DMSO (Dimethylsulfoxid) (Merck; Darmstadt, Deutschland)
- Tween 20 (Sigma; Deisenhofen, Deutschland)
- Verdünnungspuffer zur Elastase-Messung:
  0.1 M Na-Acetatpuffer pH 5.5 mit 0.1 % Tween 20
  Ansatz: 60 ml Aqua dest.
  + 1.2 ml Essigsäure 98 %
  + 1 M NaOH ad pH 5.5
  + 1 g Tween 20

4.4. Materialien zur Analytik der Inositolphosphate

- Ameisensäure, MG 68.01 (Sigma; Deisenhofen, Deutschland)
- 0.1 Ameisensäure/1.0 M Ammoniumformiat
  38 ml Ameisensäure mit Aqua bidest. auf 800 ml auffüllen
  mit 25 %iger Ammoniaklösung auf pH 7.0 einstellen
  + 3,8 ml Ameisensäure (0.1 M), mit Aqua bidest. auf 1 l auffüllen

- 0.1 Ameisensäure/0.4 M Ammoniumformiat
  15.2 ml Ameisensäure + 800 ml Aqua bidest.
  mit Ammoniaklösung auf pH 7.0 einstellen
  + 3.8 ml Ameisensäure
  mit Aqua bidest. auf 1 l auffüllen
- 0.1 M Ameisensäure/0.2 M Ammoniumformiat
  7.6 ml Ameisensäure + 800 ml Aqua bidest.
  mit Ammoniaklösung auf pH 7.0 einstellen
  + 3.8 ml Ameisensäure
  mit Aqua bidest. auf 1 l auffüllen
- myo-[2-^{3}H]Inositol: MG 180 (unlabeled), spez. Aktivität 614 GBq/mmol (Amersham; Dreieich, Deutschland)
- Dowex (Ionenaustauscherharz), Korngröße 100-200 µm, Gegenion: Chlorid (Serva; Heidelberg, Deutschland)
- Lithiumchlorid, MG 42.39 (Merck; Darmstadt, Deutschland)
- Medium 199, Inositol-arm, ohne Glutamin (Gibco; Karlsruhe, Deutschland)
- Myo-Inositol, MG 180.2 D (Sigma; Deisenhofen, Deutschland)
- Szintillatorflüssigkeit Quicksafe A (Zinsser Analytik; Frankfurt, Deutschland)
- Trichloressigsäure (Merck; Darmstadt, Deutschland)

4.5. HPLC-Materialien

Lösungsmittel:

- Ammoniakalische Lösung pro analysi, 25 %ig, zur pH-Einstellung (Merck; Darmstadt, Deutschland)
  Daraus wird mit hochreinem Aqua tridestillata 10 %ige Ammoniaklösung hergestellt.
- Chloroform reinst (Merck; Darmstadt, Deutschland)
- Essigsäure 100 % pro analysi (Merck; Darmstadt, Deutschland)
- Hexan, destilliert in Glas, pro analysi (Fluka AG; Buchs, Schweiz)
- Isopropanol pro analysi (Fluka AG; Bern, Schweiz)
- Methanol reinst (Fluka AG; Bern, Schweiz)

Säulenmaterial:

- Edelstahlsäulen, Länge 25 cm, Innendurchmesser 0.46 cm (Shandon; Runcorn, England)
- Packungsmaterial Octadecysilyl-Hypersil, Partikelgröße 5 µm (Machery Nagel; Düren, Deutschland)
- Packungsmaterial Octadecysilyl-Hypersil, Partikelgröße 3 µm (Shandon GmbH; Frankfurt, Deutschland)
- Silica-Gel ODS Hypersil, Partikelgröße 3 µm (Hypersil; Exmoor, England)

4.6. Agenzien zur PAF-Analytik

- [^{3}H]Acetat (41000 Ci/mmol) (NEN^{TM} Life-Science Products; Boston, USA)
- Acetonitril, destilliert in Glas, pro analysi (Fluka AG; Bern, Schweiz)
- Phosphorsäure (Merck; Darmstadt, Deutschland)

4.7. Agenzien zur Analyse der Cyclooxygenase-Metabolite

- Avidin-Biotin-Horseradisch-Peroxidase (AB-Komplex) (Dakopatts GmbH; Hamburg, Deutschland)
- 2,2`-Azino-di-[3-ethylbenzthiazolinsulfonat(6)] (ABTS) (Boehringer GmbH; Mannheim, Deutschland)
- Biotinylierter Schaf-anti-Maus-Antikörper (Amersham Buchler GmbH; Braunschweig, Deutschland)
- Thrombin, humanes (Sigma; Deisenhofen, Deutschland)
- Tetrabutylammonium-dihydrogen-phosphat (TBA) (Aldrich Chemie; Steinheim, Deutschland)
- α-Tocopherol (Sigma Chemie; München, Deutschland)

4.8. Gaschromatographie-Materialien

GC-Gase von Messer Griesheim GmbH (Krefeld; Deutschland)

- Wasserstoff-Gas
- Synthetische Luft (20.5 O_2 in N_2)
- Stickstoff 5.0

4.9. Authentische Standards

4.9.1. Lipoxygenase-Produkte

- Omega-COOH-LTB_4, 10 µg in 0.5 ml Methanol (Paesel AG; Frankfurt, Deutschland)
- Omega-OH-LTB_4, 10 µg in 0.5 ml Methanol (Paesel AG; Frankfurt, Deutschland)
- LTB_4, 50 µg in 1 ml Methanol (Paesel AG; Frankfurt, Deutschland)
- 5-HETE, 10 µg in 0.5 ml Methanol (Paesel AG; Frankfurt, Deutschland)
- 6-trans-LTB_4, 0.2 mg in 0.1 ml Hexan (Merck Frosst; Toronto, Kanada)
- 6-trans-epi-LTB_4, 0.2 mg in 0.1 ml Hexan (Merck Frosst; Toronto, Kanada)
- 5,6-DiHETE, 0.2 mg in 0.1 ml Hexan (Merck Frosst; Toronto, Kanada)
- 5,6-epi-DiHETE, 0.2 mg in 0.1 ml Hexan (Merck Frosst; Toronto, Kanada)

Alle Substanzen wurden vor ihrem Einsatz UV-spektrometrisch auf Reinheit überprüft. Mittels des spezifischen Absorptionskoeffizienten erfolgte die Quantifizierung. Bei erfassbaren Verunreinigungen diente ein präparativer Chromatographieschritt der Aufreinigung der getesteten Substanz.

4.9.2. Cyclooxygenase-Produkte

- TxB_2 (Sigma; Deisenhofen, Deutschland)
- TxB_3 (Geschenk von C. O. Meese, Margarete Fischer-Bosch Institut für klinische Pharmakologie; Stuttgart, Deutschland)

4.9.3. Fettsäuren und Fettsäuremethylester

Diese Substanzen lagen in GC-Qualität vor (Reinheitsgrad ca. 99 %); alle wurden von Firma Sigma (Deisenhofen, Deutschland) bezogen.

<u>Fettsäuren:</u>

- Palmitinsäure	(C16:0)	- Linolensäure	(C18:3)
- Margarinensäure	(C17:0)	- Arachidonsäure	(C20:4)
- Stearinsäure	(C18:0)	- Docosahexaensäure	(C22:6)
- Ölsäure	(C18:1)		

Fettsäuremethylester (ME):

- Laurinsäure-ME	(C12:0)	- Eicosadiensäure-ME	(C20:2)
- Myristinsäure-ME	(C14:0)	- Eicosatriensäure-ME	(C20:3ω-6)
- Palmitinsäure-ME	(C16:0)	- Eicosatriensäure-ME	(C20:3ω-3)
- Palmitolensäure-ME	(C16:1)	- Arachidonsäure-ME	(C20:4ω-6)
- Margarinensäure-ME	(C17:0)	- Eicosapentaensäure-ME	(C20:5ω-3)
- Stearinsäure-ME	(C18:0)	- Docosansäure-ME	(C22:0)
- Ölsäure-ME	(C18:1)	- Docosensäure-ME	(C22:1)
- Linolsäure-ME	(C18:2)	- Docosatriensäure-ME	(C22:3)
- Linolensäure-ME	(C18:3)	- Docosatetraensäure-ME	(C22:4)
- α-Linolensäure-ME	(C18:3ω-3)	- Docosahexaensäure-ME	(C22:6ω-3)
- γ-Linolensäure-ME	(C18:3ω-6)	- Lignocerin-ME	(C24:0)
- Arachidinsäure-ME	(C20:0)	- Nervonsäure-ME	(C24:1)
- Eicosensäure-ME	(C20:1)		

4.10. Geräte

- Biofuge A (Heraeus; Hanau, Deutschland)
- CO_2-Inkubator IR 1500 (Flow Laboratories; Meckenheim, Deutschland)
- Hamilton Präzisionsspritze (Hamilton; Darmstadt, Deutschland)
- Liquidszintillationscounter (Philips; Hamburg, Deutschland)
- Milli Q Wasseraufbereitungsanlage zur Aqua dest.-, Aqua bidest.-, Aqua tridest.-Herstellung (Millipore; Eschborn, Deutschland)
- Photometer Uvikon 860 (Kontron Instruments; Deutschland)
- Säulenpackvorrichtung (Gynkothek; München, Deutschland)
- Ultraschallbad (Bandelin electronic; Berlin, Deutschland)
- Vakuumzentrifuge (Heraeus; Hanau, Deutschland)
- Wägezelle (Hottinger Baldwin Messtechnick; Langen, Deutschland)
- Zentrifuge RPC Rotanta (Hettich; Tuttlingen, Deutschland)

5. ERGEBNISSE

Die Bearbeitung der Fragestellung erfolgte anhand einer offenen, randomisierten Pilotstudie mit Patienten im septischen Schock. Nach Kontrolle bezüglich des Vorliegens von Ein- und Ausschlusskriterien wurden 10 Patienten, die eine parenterale Ernährung benötigten, nach dem Zufallsprinzip den zwei Gruppen zugeordnet, welche sich lediglich über eine 10-tägige Periode durch die Art der verabreichten Lipidemulsion unterschieden.
Die 10 Studienteilnehmer befanden sich in einem Alter zwischen 27 und 71 Jahren. Die Lipoven®-Gruppe zeigte eine Geschlechterverteilung von 2:3 (m:f), die Omegaven®-Gruppe von 3:2. In der ersten Gruppe wurden als der Sepsis zugrunde liegende Diagnose dreimal ARDS, einmal Pneumonie und einmal peripheres Gangrän erfasst, zwei Patienten boten das Vollbild eines Multiorganversagens (MOF). Dem standen in der ω-3-Population drei Patienten mit Pneumonie, ein Patient mit ARDS und ein Patient mit infiziertem Ulcus cruris gegenüber, drei Patienten entwickelten ein MOF. In beiden Infusionsgruppen gelang in jeweils zwei Fällen kein Erregernachweis. Eine Zusammenfassung ist in Tabelle 6 dargestellt.
Die beiden Patientengruppen wurden mit einer Kontrollgruppe von 8 gesunden Probanden im Alter zwischen 23 und 66 Jahren verglichen.

Alle Patienten benötigten eine vasopressorische Therapie bei Studienbeginn, entsprechend den Kriterien des septischen Schocks, und boten deutlich erhöhte Leukozytenzahlen, C-reaktives Protein (CRP)- und Plasmalaktat-Konzentrationen. Beide Infusionsgruppen unterschieden sich bei Studienstart nicht signifikant in Alter, Geschlecht, APACHE II-Score, CRP, Laktat, Leukozytenzahl und Körperkerntemperatur. Eine Übersicht ist in Tabelle 6 und 7 gegeben.

An den Anfang der Ergebnisse stelle ich die freien Plasmafettsäuren und ihre Beeinflussung durch die verabreichten Fettemulsionen, da nur die nicht-veresterten Fettsäuren einer Inkorporation in zelluläre Membranen zur Verfügung stehen. Dieser Einbau in Membranphospholipide beinhaltet den entscheidenden Schritt für nachfolgende molekulare Mechanismen akuter inflammatorischer Prozesse, auf deren Modifikation ich in den zwei darauf folgenden Abschnitten eingehen werde. Die Auswirkung der nachgewiesenen inflammatorischen Mediatoren auf den klinischen Verlauf der Sepsis ist im abschließenden Abschnitt dieses Kapitels aufgezeigt.

Patient	Geschlecht	Alter	Lipid-Infusion	zugrunde liegende Diagnose	Sekundärdiagnose	verursachender Erreger	APACHE II Score	Outcome (Tag 28)
WL	m	59	**ω-6**	Pneumonie, MOF	Diabetes	unbekannt	23	Überleben
FB	f	71	**ω-6**	Gangrän D V linker Fuß	Diabetes, art. Hypertonie	Streptokokken der Gruppe A	9	Überleben
SK	f	50	**ω-6**	ARDS nach Akut-CABG	arterielle Hypertonie	unbekannt	14	Überleben
WT	f	62	**ω-6**	ARDS nach CABG	arterielle Hypertonie	Pseudomonas aeruginosa	10	Versterben
HK	m	40	**ω-6**	ARDS, MOF		Streptococcus viridans	19	Überleben
KW	m	71	**ω-3**	Pneumonie, MOF	COPD, chronische Niereninsuffizienz	Candida albicans	34	Überleben
WK	m	57	**ω-3**	ARDS nach CABG	COPD	Serratia species	14	Überleben
NR	f	31	**ω-3**	Pneumonie, MOF		unbekannt	21	Überleben
HB	m	59	**ω-3**	infiziertes Ulcus cruris, MOF	Diabetes, chronische Niereninsuffizienz	Staphylococcus aureus	24	Versterben
MA	f	27	**ω-3**	Pneumonie		unbekannt	12	Überleben

Tabelle 6: Demographische Daten beider Patientenkollektive der Studie

Demographische Charakteristiken der Sepsispatienten, welche nach dem Zufallsprinzip auf die beiden Infusionsgruppen verteilt wurden, die sich lediglich in der Art ihrer Fettsäurezusammensetzung unterschieden. Der angegebene APACHE II-Score beschreibt den klinischen Zustand des einzelnen Patienten bei Studienantritt.
(APACHE = Acute Physiology and Chronic Health Evaluation; ARDS = adult respiratory distress syndrome; CABG = coronary artery bypass grafting; CRF = chronic renal failure; MOF = multiorgan failure)

Tag	Leukozyten [G/l]		CRP [mg/l]		Laktat [mmol/l]		Temperatur [ºC]		APACHE II	
	ω-6	ω-3	ω-6	ω-3	ω-6	ω-3	ω-6	ω-3	ω-6	ω-3
1	21800 ± 4300	25000 ± 8300	196.0 ± 42.0	168.2 ± 36.0	3.4 ± 1.4	2.6 ± 0.7	38.7 ± 0.5	38.9 ± 0.1	16.3 ± 3.0	23.3 ± 4.2
3	22400 ± 4500	12600 ± 3600	205.0 ± 53.0	89.0 ± 20.0	1.8 ± 0.6	1.5 ± 0.5	37.7 ± 0.4	38.4 ± 0.4	14.8 ± 3.5	16.5 ± 5.1
7	15700 ± 2700	14500 ± 3000	124.4 ± 38.0	85.0 ± 18.8	1.1 ± 0.2	1.3 ± 0.5	37.7 ± 0.2	38.1 ± 0.6	11.6 ± 2.0	12.8 ± 3.2
10	11600 ± 1200	9300 ± 1500	135.0 ± 20.8	112.4 ± 38.8	1.3 ± 0.2	1.2 ± 0.4	38.0 ± 0.3	37.9 ± 0.4	11.0 ± 2.8	13.3 ± 2.3

Tabelle 7: Klinische und laborchemische Daten

Vergleich der laborchemischen und klinischen Daten der beiden Behandlungsgruppen unter der Infusionstherapie. Beide Gruppen unterschieden sich zu Beginn der Infusionstherapie nicht in ihrem APACHE II-Score, ihrer Körperkerntemperatur (Temperatur, angegeben in ºC), ihrer Leukozytenzahl (Leukozyten, angegeben in G/l), im C-reaktiven Protein (CRP, angegeben in mg/l) und ihrem Laktatspiegel (Laktat, angegeben in mmol/l). Alle Parameter werden in Mittelwert ± SEM angegeben.
(APACHE = Acute Physiology and Chronic Health Evaluation; ω-6 = ω-6-Lipid-infusionsgruppe; ω-3 = ω-3-Lipidinfusionsgruppe; SEM = Standardfehler des Mittelwertes)

5.1. Einfluss der Lipidinfusionstherapie auf das Profil und die Plasmaspiegel freier Fettsäuren in septischen Patienten

Die Blutproben wurden am Tag 1, 3, 7 und 10 vor Beginn der täglichen Infusionen gewonnen. Die freien Fettsäuren im Plasma wurden in dem bereits beschriebenen Einschritt-Verfahren methyliert, extrahiert und anschließend gaschromatographisch analysiert und quantifiziert.

5.1.1. Summe der freien Fettsäuren im Plasma

Bereits vor Beginn der geplanten Lipidinfusionstherapie, d. h., an Studientag 1, konnte im Plasma beider Patientengruppen ein mehrfacher Anstieg der freien Fettsäuren dokumentiert werden. Die Gesamtsumme der freien Fettsäuren aus dem Plasma der Sepsispatienten am Tag 1 übertrifft die der Kontrollgruppe um das mehr als 4fache. In den drei Kollektiven zeigt sich dabei eine Dominanz der Palmitinsäure (C16:0): in der ω-6-Gruppe 36 % der Gesamtfettsäuren, in der ω-3-Gruppe 35 % und in der Kontrollgruppe 27 %. Des Weiteren findet sich ein hoher Anteil an Öl- (C18:1) und Linolsäure (C18:2) in allen drei Gruppen, der sich auf 19 - 26 % beläuft. Bei allen drei Fettsäuren handelt es sich um essentielle Fettsäuren. Während die Gesamtmenge der freien Fettsäuren und das Fettsäureprofil im weiteren Studienverlauf in der ω-6-Gruppe zum größten Teil durch die Lipidinfusionen unbeeinflusst blieben, konnte in der Gruppe, die die Fischöl-basierte Infusion erhielt, ein diskreter Anstieg der Gesamtmenge der FFA, allerdings ohne Signifikanz, sowie ein deutlicher Anstieg der ω-3-Fettsäuren verzeichnet werden. Die dokumentierte Menge von Linolsäure und Linolensäure in beiden Infusionskollektiven zeigte einen stabilen Verlauf und einen vergleichbaren Anteil an den Gesamtfettsäuren über die Studienperiode trotz höherer Konzentration beider in der Lipoven®-Infusion. Das Profil und der Verlauf der plasmatischen freien Fettsäuren der drei Kollektive ist in Tabelle 8 zusammengefasst.

Ein Vergleich der Fettsäurezusammensetzung der ω-6- und ω-3-Lipidemulsion zeigt in der Lipoven®-Infusion ein Überwiegen der Ölsäure (24.1 g/l) und der Linolsäure (52.2 g/l), die den Präkursor der AA-Synthese darstellt. Dem steht eine Ölsäure-Konzentration von 12.3 g/l und eine Linolensäure-Konzentration von 3.7 g/l sowie eine - in der ersten Infusionsgruppe fehlende - AA-Konzentration von 2.6 g/l in der Omegaven®-Infusion gegenüber. Beide Lipidemulsionen haben nahezu den gleichen Anteil an gesättigten Fettsäuren, jedoch in einer unterschiedlichen Zusammensetzung. Der Gesamtmenge der in der Fischöl-basierten Infusion enthaltenen ω-3-Fettsäuren von 39.4 g/l steht eine α-Linolensäure-Menge von 8.2 g/l in der Lipoven®-Gruppe gegenüber. Das ω–3/ω-6-Verhältnis beträgt in der Lipoven®-Infusion 0.16, in der Omegaven®-Infusion 6.25. Einen Überblick ermöglicht Tabelle 5.

Studien-tag	Tag 1		Tag 3		Tag 7		Tag 10		Kontroll-gruppe
FFA µmol/l	ω-6	ω-3	ω-6	ω-3	ω-6	ω-3	ω-6	ω-3	
C14:0	5.6 ± 1.6	8.6 ± 3.1	4.8 ± 1.9	19.3 ± 9.0	5.2 ± 2.8	20.7 ± 6.5	6.5 ± 3.6	13.6 ± 3.3	0.3 ± 0.1
C16:0	379.9 ± 75.3	575.4 ± 191.1	368.8 ± 49.2	842.4 ± 323.7	555.2 ± 148.8	966.5 ± 390.2	451.6 ± 105.5	985.6 ± 285.9	66.5 ± 6.7
C16:1ω-7	9.7 ± 2.0	22.9 ± 9.7	7.7 ± 1.3	41.0 ± 16.5	7.2 ± 0.7	34.2 ± 9.8	9.1 ± 3.8	28.5 ± 9.9	0.6 ± 0.2
C18:0	115.3 ± 22.0	175.5 ± 45.7	137.1 ± 11.0	277.6 ± 89.7	225.4 ± 82.0	358.0 ± 128.8	175.5 ± 40.5	372.0 ± 105.3	38.5 ± 3.9
C18:1ω-6	225.4 ± 55.3	341.7 ± 113.4	188.5 ± 20.2	492.0 ± 149.0	261.6 ± 72.8	466.9 ± 159.9	173.4 ± 54.8	469.5 ± 123.5	47.7 ± 4.9
C18:2ω-6	238.1 ± 99.5	312.5 ± 96.1	200.3 ± 22.7	366.6 ± 127.6	401.7 ± 167.5	332.7 ± 130.4	260.3 ± 77.1	466.8 ± 119.8	64.7 ± 6.7
C18:3ω-3	17.1 ± 12.9	13.6 ± 5.3	6.6 ± 2.6	12.8 ± 4.6	14.6 ± 5.0	8.0 ± 2.7	6.5 ± 1.6	13.1 ± 5.7	0.0 ± 0.0
C20:3ω-6	10.7 ± 2.3	22.1 ± 7.6	11.1 ± 2.0	35.1 ± 16.7	17.1 ± 5.2	35.9 ± 14.1	15.7 ± 3.2	30.9 ± 9.9	6.4 ± 1.0
C20:4ω-6	42.7 ± 9.7(*)	111.8 ±37.7(*)	46.2 ± 1.7	150.4 ± 51.2	76.7 ± 35.6	170.1 ± 64.5	66.4 ± 19.8(§)	173.2 ± 62.9	10.9 ± 1.2
C20:5ω-3	2.6 ± 1.2	5.6 ± 1.5(*)	2.7 ± 1.0	80.9 ± 31.5	6.1 ± 6.1	121.5 ± 43.2	3.5 ± 3.5(§)	121.9 ± 31.0	1.3 ± 0.3
C22:6ω-3	23.5 ± 5.4(*)	74.9 ± 32.3(*)	26.1 ± 3.9	138.7 ± 50.4	37.9 ± 12.4	203.2 ± 69.2	36.6 ± 10.0(§)	202.2 ± 60.3	9.3 ± 1.8
Summe	1070.5 ± 280.8	1664.3 ± 527.9	999.9 ± 104.4	2456.6 ± 855.1	1606.6 ± 530.3	2717.6 ± 1005.2	1205.0 ± 300.9	2853.0 ± 775.7	247.3 ± 21.0

Tabelle 8: Plasmaspiegel der freien Fettsäuren (FFA) in den beiden Infusionsgruppen sowie der Kontrollgruppe

Alle plasmatischen freien Fettsäuren werden in µmol/l (Mittelwert ± SEM) angegeben. Die Konzentrationen von AA, EPA und DHA werden vor Beginn der Lipidinfusionstherapie in jeder Gruppe mit den Konzentrationen in der Kontrollgruppe verglichen (= $p < 0.05$). Ebenso werden die gleichen Fettsäuren beider Studiengruppen vor und nach Beendigung des Infusionszeitraums einander gegenübergestellt (§ = $p < 0.05$).*
(ω-6 = ω-6-Lipidinfusionsgruppe; ω-3 = ω-3-Lipidinfusionsgruppe; Kontrollgruppe = Gruppe der gesunden Probanden; SEM = Standardfehler des Mittelwertes))
C17:0 diente als interner Standard. Folgende Fettsäuren wurden nicht nachgewiesen: C12:0, γC18:3, C20:0, C20:1, C20:3:3, C20:3:9, C22:0, C22:1, C22:2, C22:3, C22:4, C22:5, C24:0, C24:1, C24:1, C24:2, C24:3 und C24:4.

5.1.2. Verhalten der freien Arachidonsäure im Plasma

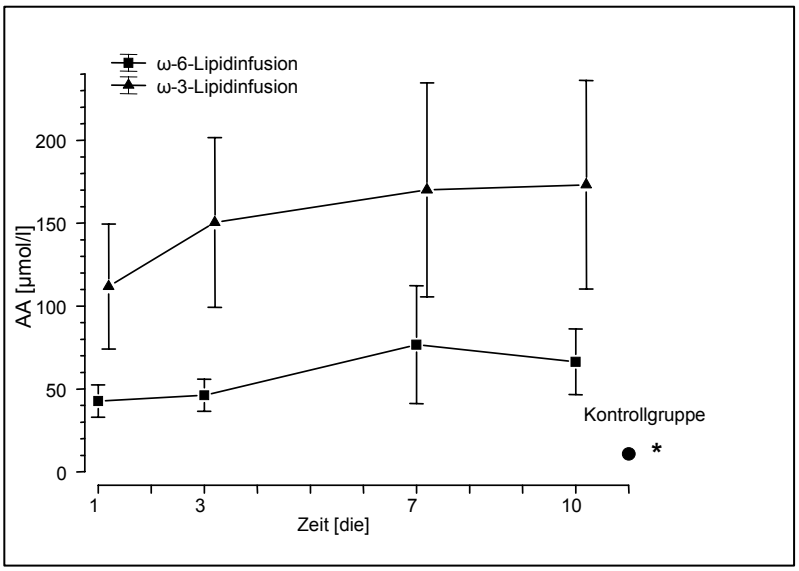
Im Vergleich zu den gesunden Kontrollen war die Konzentration von Arachidonsäure im Plasma zu Studienbeginn in beiden Infusionsgruppen merklich erhöht, eine Signifikanz erreichend (* = $p < 0.05$): in der ω-6-Gruppe 42.7 ± 9.7, in der ω-3-Gruppe 111.8 ± 37.7, in der Kontrollgruppe 10.9 ± 1.2 µmol/l. Sie stellte in allen drei Gruppen den nahezu gleichen Anteil an der Gesamtsumme der FFA (4-7 %). In der ω-3-Gruppe bot sich im Verlauf ein angedeuteter, jedoch nicht signifikanter AA-Anstieg von 111.8 ± 37.7 µmol/l (Studientag 1) auf 173.2 ± 62.9 µmol/l (Studientag 10) (Abbildung 13).

5.1.3. Verhalten der freien Eicosapentaensäure/Docosahexaensäure im Plasma

Beide Infusionsgruppen boten zu Studienbeginn (Studientag 1) eine gegenüber der Kontrollgruppe signifikant erhöhte DHA-Konzentration, in der ω–3-Population fand sich zusätzlich eine gegenüber der Kontrollgruppe signifikante Erhöhung der EPA-Konzentration (* = $p < 0.05$).

In der Gruppe, die die Fischöl-basierte Lipidinfusion erhielt, wurde ein deutlicher Anstieg der ω-3-Fettsäuren EPA und DHA verzeichnet: EPA bot über die Infusionsperiode einen Anstieg von 5.6 ± 1.5 µmol/l auf 121.9 ± 31.0 µmol/l, d. h., auf das ca. 22fache des Basiswertes von Tag 1. Dem steht eine nahezu gleichbleibende EPA-Konzentration zwischen 2.6 ± 1.2 µmol/l und 6.1 ± 6.1 µmol/l in der ω-6-Gruppe sowie von 1.3 ± 0.3 µmol/l in der Kontrollgruppe gegenüber. Der Anstieg der EPA-Konzentration zeigte eine Signifikanz sowohl gegenüber der Kontrollgruppe als auch gegenüber der ω-6-Gruppe (§ = $p < 0.05$) (Abbildung 13). Während DHA in der Fischöl-Gruppe von 74.9 ± 32.3 µmol/l auf 202.2 ± 60.3 µmol/l anstieg, eine Signifikanz gegenüber der Lipoven®-Gruppe erreichend (§ = $p < 0.05$), zeigte die Patientenvergleichsgruppe eine Konstanz ihrer DHA-Menge.

Beide ω-3-FS (EPA und DHA) erreichten ein Plateau am 7. Studientag und übertrafen in ihrer Summe die AA-Konzentration nahezu 2fach.



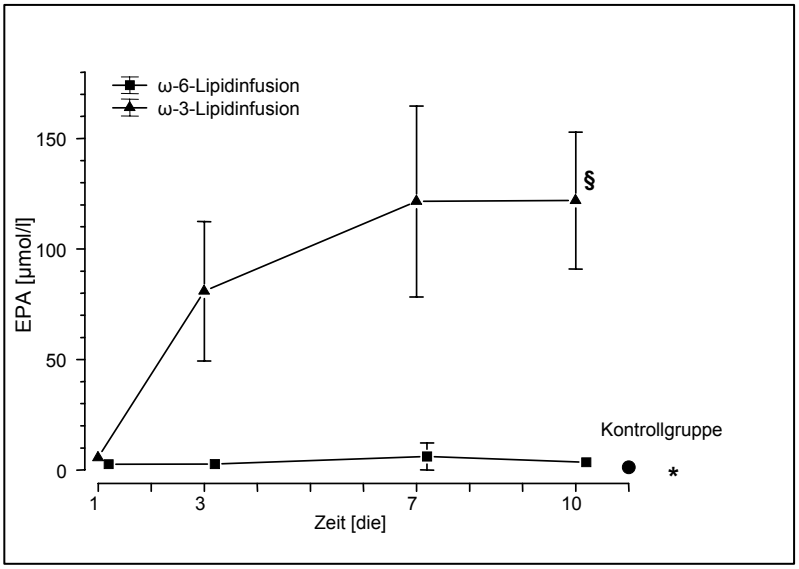


Abbildung 13: Plasmaspiegel freier Arachidonsäure (oben) und Eicosapentaensäure (unten) als Antwort auf die parenterale ω-6- und ω-3-Lipidinfusionstherapie

Die Konzentrationen der Fettsäuren werden in µmol/l und Mittelwert ± SEM angegeben.
Im Vergleich zur Kontrollgruppe entwickeln beide Gruppen septischer Patienten einen dramatischen Anstieg der Konzentration von freier AA (= $p < 0.05$). Der EPA-Spiegel der ω-3-Gruppe unterschied sich an Studientag 1 signifikant von dem der Kontrollgruppe (* = $p < 0.05$) und an Studientag 10 von dem beider Vergleichsgruppen (§ = $p < 0.05$).*
(ω-3 = ω-3-Lipidinfusionsgruppe; ω-6 = ω-6-Lipidinfusionsgruppe; SEM = Standardfehler des Mittelwertes)

5.2. Einfluss der Infusionstherapie auf den granulozytären Entzündungs-metabolismus

5.2.1. Leukotriene

Die PMN der Patientengruppen wurden an Tag 1, 3, 7 und 10 der Studienphase nach oben beschriebener Methode isoliert und anschließend mit A23187 stimuliert. Nach Aufarbeitung des Zellüberstands mittels Festphasen-Extraktion wurden die Lipidmediatoren der Lipoxygenase einer Identifikation und Quantifizierung im HPLC-Verfahren zugeführt und anschließend den Messungen aus der Kontrollgruppe gegenübergestellt.

Die Ionophor-induzierte LTB_4-Sekretion der isolierten Granulozyten beider Infusionsgruppen war im Vergleich zu den gesunden Kontrollpersonen signifikant reduziert (§ = $p < 0.05$) und lag bei ca. 50 % der Vergleichsgruppe, erreichte jedoch zu keinem Zeitpunkt des Untersuchungszeitraums eine Signifikanz zwischen beiden Behandlungsgruppen (Abbildung 14).

Zu Beginn der Infusionsbehandlung war LTB_5 in keiner der drei Gruppen nachweisbar, bot jedoch in der ω-3-Gruppe nach Infusionsbeginn einen zügigen Anstieg bis zum Studientag 10 (19.6 ± 3.2 pmol/ml) und erreichte zu diesem Zeitpunkt eine Signifikanz gegenüber den beiden Vergleichsgruppen (* = $p < 0.05$) (Abbildung 14).
In der Omegaven®-Gruppe konnte ein LTB_5/LTB_4-Verhältnis von nahezu 20 % am Ende der 10-tägigen Periode dokumentiert werden.

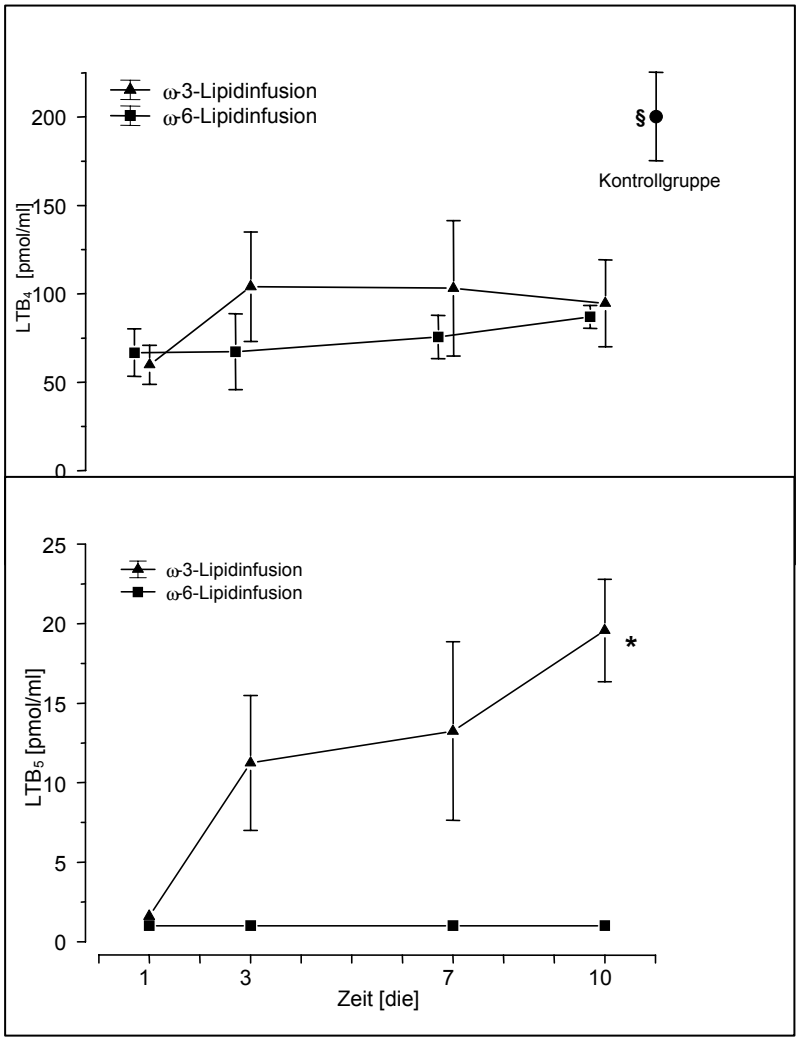


Abbildung 14: Verlauf der Leukotrien $B_{4/5}$-Freisetzung

Es wird die Synthese von LTB_4 (oben) der Freisetzung von LTB_5 (unten) gegenübergestellt im Vergleich zwischen den beiden Patientenkollektiven und der Kontrollgruppe. Zu beachten ist die differierende Skala von LTB_4 und LTB_5. Angegeben ist der Mittelwert ± SEM aus n = 5 Mitgliedern einer Studiengruppe sowie n = 8 Probanden der Kontrollgruppe.
(ω-3 = ω-3-Lipidinfusionsgruppe; ω-6 = ω-6-Lipidinfusionsgruppe; SEM = Standardfehler des Mittelwertes)

5.2.2. ROS

Die Sauerstoffradikal (ROS = reactive oxygen species)-Bildung von 5 x 10^6 PMN auf die Stimulation mit fmlp wurde an den Studientagen 1, 3, 7 und 10 quantifiziert und als Maß des abgelaufenen „respiratorischen Burst" gesehen.

Im Vergleich zur Kontrollgruppe war die fmlp-induzierte O^{2-}-Freisetzung in beiden Patientengruppen reduziert (Abbildung 15).

Während auf die fmlp-Stimulation in der ω-3-Gruppe eine weitere leichte Zunahme der Superoxid-Bildung im Beobachtungszeitraum zu verzeichnen war, konnte in der ω-6-Gruppe eine Reduktion dokumentiert werden, am Tag 7 einen statistisch signifikanten Unterschied erreichend (* = $p < 0.05$) (Abbildung 15).

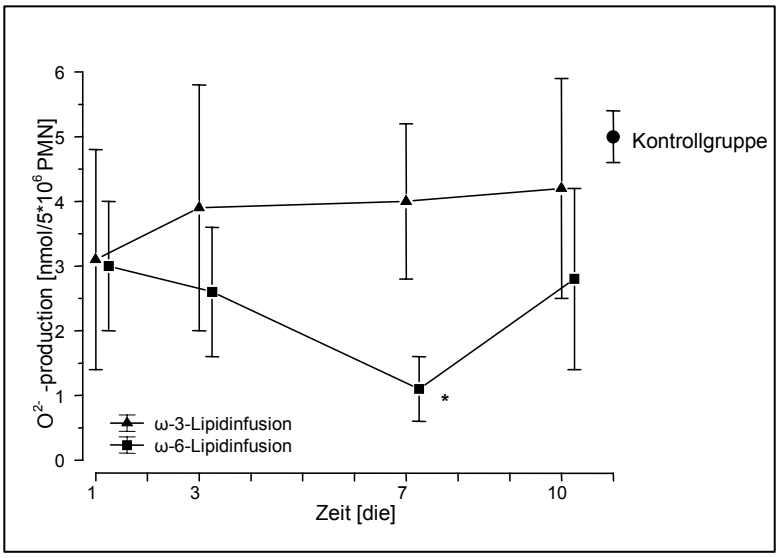


Abbildung 15: Die Freisetzung granulozytärer Superoxide

Verlauf der durch fmlp induzierten Superoxid (O^{2-})-Freisetzung in beiden Infusionsgruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe, angegeben in Mittelwert ± SEM, bei n = 5 Teilnehmern in jeder Patientengruppe und n = 8 Teilnehmern der Kontrollgruppe.
*(ω-3 = ω-3-Lipidinfusionsgruppe; ω-6 = ω-6-Lipidinfusionsgruppe; SEM = Standardfehler des Mittelwertes; * = $p < 0.05$, wenn ω-3- mit ω-6-Gruppe verglichen wird)*

5.2.3. Elastase

Eine Degranulierungsreaktion der 1 x 10^7 PMN, initiiert durch die Stimulation mit fmlp (1 µmol/l), wurde anhand der Elastasefreisetzung aus den primären neutrophilen Granula an den Studientagen 1, 3, 7 und 10 in beiden Infusionsgruppen bestimmt und in Relation zu den Kontrollwerten gesetzt.

Im Vergleich zur Kontrollgruppe boten die PMN der septischen Patienten auf fmlp eine signifikante Suppression der Elastasesekretion (§ = $p < 0.05$ für alle Zeitpunkte), welche in der ω-6-Infusiongruppe am Tag 7 gegenüber der ω-3-Gruppe ein signifikant niedrigeres Niveau erreichte (* = $p < 0.05$). Die Fischöl-basierte Infusionsgruppe ließ vielmehr einen leichten Anstieg der Elastasefreisetzung erkennen (Abbildung 16).

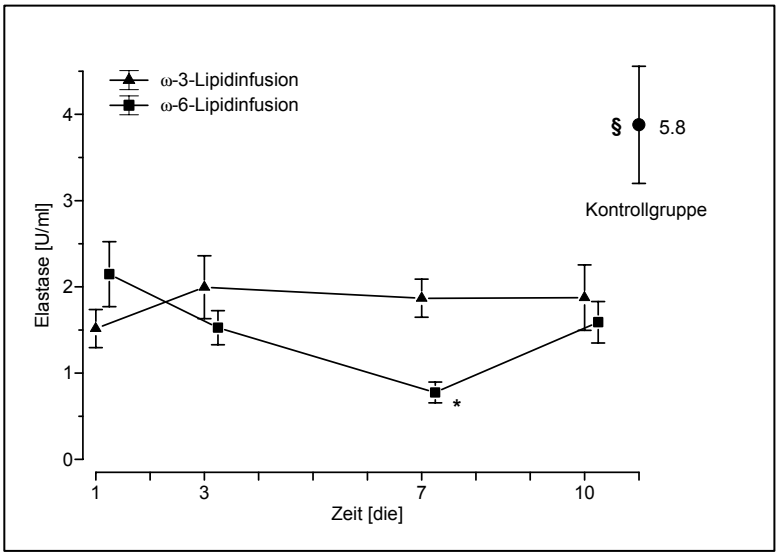


Abbildung 16: Elastasefreisetzung auf fmlp-Stimulation als Maß der Degranulierungsreaktion von neutrophilen Granulozyten

Angegeben sind die Mittelwerte ± SEM aus n = 5 Mitgliedern in jeder Patientengruppe und n = 8 in der Kontrollgruppe.
(ω-3 = ω-3-Lipidinfusionsgruppe; ω-6 = ω-6-Lipidinfusionsgruppe; SEM = Standardfehler des Mittelwertes)

5.2.4. Phosphatidylinositol

Die Bildung von Inositolphosphaten (IP) der mit fmlp stimulierten neutrophilen Granulozyten wurde in beiden Infusionsgruppen sowie der Kontrollgruppe quantifiziert und vergleichend diskutiert. Sie galt als Maß für den Signaltransduktionsweg der „PI-response".
Vor Beginn der Infusionstherapie (Tag 1) und an Tag 7 wurden 1 x 10^7 PMN, nach Markierung mit [^{3}H]Inositol, einer Stimulation mit 1 µg fmlp/l unterzogen. Die extrahierten Inositolphosphate wurden anschließend mit der bereits beschriebenen Anionenaustausch-Chromatographie aufgetrennt. IP_3, IP_2 und IP_1 werden als IP_x zusammengefasst.

In Relation zu den Kontrollen zeigten die septischen Patienten beider Gruppen zu jedem Zeitpunkt eine signifikant reduzierte IP_x-Synthese (§ = $p < 0.05$). Während am Tag 7 ein weiterer Abfall der IP_x-Bildung im ω-6-Kollektiv zu verzeichnen war, konnte in der Fischöl-Gruppe ein signifikanter Anstieg dokumentiert werden (1.38 ± 0.11 versus 1.79 ± 0.09; * = $p < 0.05$), der innerhalb der ω-3-Gruppe eine Signifikanz zwischen Tag 1 und Tag 7 zeigte ($ = $p < 0.05$) (Abbildung 17).

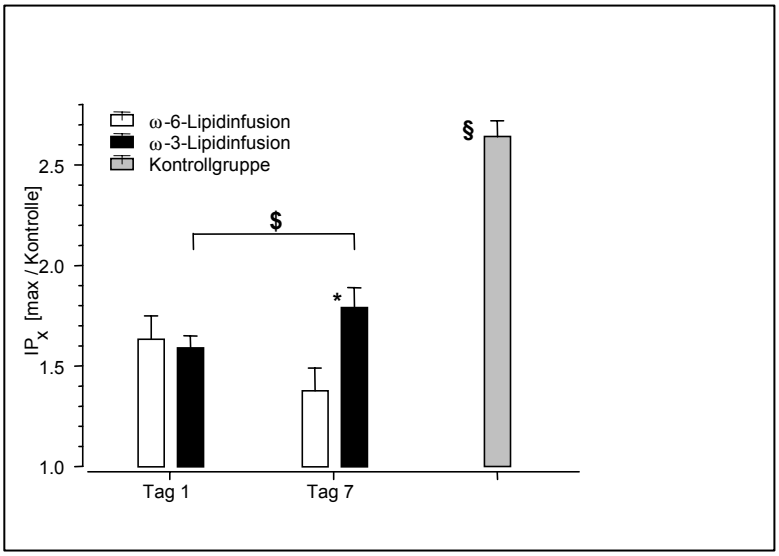


Abbildung 17: IP-Synthese in den radioaktiv markierten und mit fmlp stimulierten Neutrophilen der drei Untersuchungsgruppen

IP_3, IP_2 und IP_1 werden unter IP_x subsumiert. Der Spitzenwert von cpm wird durch die Aktivität der mitgeführten Kontrollprobe dividiert. Angegeben ist der Mittelwert ± SEM von n = 5 Mitgliedern in jeder Patientengruppe, n = 8 in der Kontrollgruppe.
*(ω-3 = ω-3-Lipidinfusionsgruppe; ω-6 = ω-6-Lipidinfusionsgruppe; SEM =Standardfehler des Mittelwertes; * = $p < 0.05$ im Vergleich beider Infusionsgruppen; § = $p < 0.05$ im Vergleich beider Infusionsgruppen mit der Kontrollgruppe; $ = $p < 0.05$ im Vergleich innerhalb der ω-3-Gruppe)*

5.2.5. PAF

Die granulozytäre PAF-Bildung wurde an den Studientagen 1, 3, 7, und 10 gemessen. 1 x 10^7 PMN wurden nach einer Inkorporation von [^{3}H]Acetat mit A23187 stimuliert, die Radioaktivität des Lipidextraktes mittels Straight-Phase-HPLC quantifiziert und anschließend die Menge des synthetisierten PAF nach dem bereits beschriebenen Verfahren errechnet.

Zu allen Zeitpunkten unterschieden sich die Kontrollprobanden statistisch signifikant von den Messungen in den Infusionsgruppen (§), indem sie eine deutlich erniedrigte PAF-Bildung zeigten. An Studientag 7 wurde im ω-3-Kollektiv im Vergleich zur ω-6-Gruppe eine statistisch signifikant höhere PAF-Synthese dokumentiert (*). In der Fischöl-Gruppe stieg die Freisetzung bis Tag 7 kontinuierlich an, um dann zum Tag 10 wieder abzufallen, in der zweiten Gruppe zeigte sich über den 10-tägigen Beobachtungszeitraum keine wesentliche Veränderung der PAF-Sekretion auf den verabreichten Stimulus (Abbildung 18).

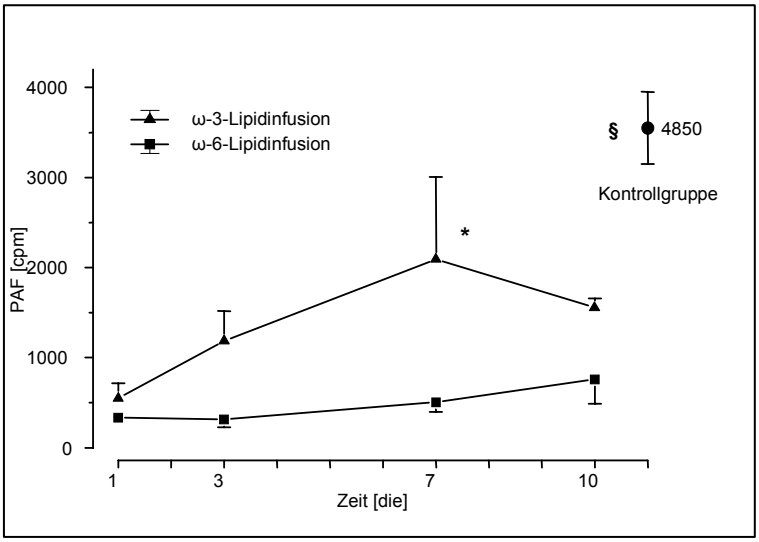


Abbildung 18: PAF-Synthese der mit A23187 stimulierten Neutrophilen

Die PAF-Menge wird in cpm und Mittelwert ± SEM aus n = 5 Teilnehmern in jeder Patientengruppe und n = 8 in der Kontrollgruppe angegeben. Zu beachten ist die differierende Darstellung der Konzentration in der Kontrollgruppe.
*(ω-3 = ω-3-Lipidinfusionsgruppe; ω-6 = ω-6-Lipidinfusionsgruppe; SEM = Standardfehler des Mittelwertes; * = $p < 0.05$ im Vergleich beider Infusionsgruppen; § = $p < 0.05$ im Vergleich beider Infusionsgruppen mit der Kontrollgruppe)*

5.3. Veränderungen des Thromboxanmetabolismus der Plättchen unter der Lipidinfusion

Die Thromboxan (Tx) $A_{2/3}$-Synthese von isolierten Thrombozyten auf die Thrombin-Stimulation wurde anhand ihrer stabilen Zerfallsprodukte – TxB_2 und TxB_3 – nach der Festphasen-Extraktion mittels Post-HPLC-ELISA, wie bereits beschrieben, gemessen.

In der Kontrollgruppe sowie der Gruppe der Patienten, welche die ω-6-Lipidemulsionen erhielt, lag das Verhältnis von TxA_3/TxA_2 kontinuierlich unter 1 %. In der ω-3-Infusionsgruppe hingegen wurde in zunehmenden Maß TxA_3 nachgewiesen, sodass am Ende der Infusionsperiode (Studientag 10) ein TxA_3/TxA_2-Verhältnis von 17.8 ± 7.4 dokumentiert wurde, jedoch keine Signifikanz gegenüber den anderen beiden Gruppen erreichend (Abbildung 19).

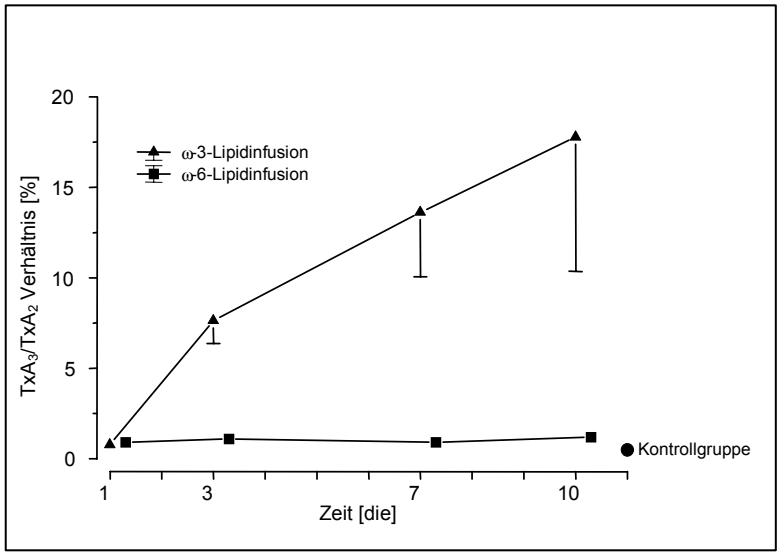


Abbildung 19: Thrombozytärer Thromboxanmetabolismus im Verlauf

Es wurde die Thromboxansynthese der 2er- und 3er-Serie von isolierten und mit Thrombin stimulierten Thrombozyten in allen Gruppen gemessen. Dargestellt ist das TxA_3/TxA_2-Verhältnis jeder Gruppe in Mittelwert ± SEM (n = 5 in jeder Patientengruppe, n = 8 in der Kontrollgruppe).
(ω-3 = ω-3-Lipidinfusionsgruppe; ω-6 = ω-6-Lipidinfusionsgruppe; SEM = Standardfehler des Mittelwertes)

5.4. Einfluss der parenteralen Lipidtherapie auf den Verlauf ausgewählter klinischer Parameter der beobachteten Sepsispatienten

Der kontinuierlich über den Studienzeitraum kontrollierte und dokumentierte klinische Verlauf der Mitglieder beider Lipidemulsionsgruppen wurde in den APACHE II-Score-Werten der einzelnen Studientage zusammengefasst, in Tabelle 7 jedoch zusätzlich anhand der laborchemischen und klinischen Daten weiter aufgeschlüsselt.

5.4.1. Beatmung

Zu Studienbeginn waren in beiden Kollektiven 4 von 5 Patienten auf eine maschinelle Unterstützung ihrer Atmung angewiesen. Während in der Omegaven®-Gruppe bereits an Tag 3 lediglich noch ein, an Tag 7 kein Patient mehr beatmungspflichtig war, erreichte die Lipoven®-Gruppe dieses Ergebnis erst an Tag 10 und ließ damit den Trend zu einer längeren Beatmungszeit erkennen. Einen Überblick soll Tabelle 9 geben.

5.4.2. Katecholamine

Alle Studienpatienten benötigten bei Einschluss in die Studie eine vasopressorische Behandlung aufgrund des Vorliegens eines septischen Schocks. Während bereits an Tag 7 und 10 mehr als die Hälfte der Patienten aus der ω-6-Infusionsgruppe nicht mehr auf diese therapeutische Unterstützung angewiesen war, erreichte dies das ω-3-Kollektiv erst an Studientag 10. Zu diesem Zeitpunkt erhielten zwei der Patienten aus jeder Gruppe eine vasopressorische Therapie. Eine Zusammenfassung gibt Tabelle 9.

Tag	Abhängigkeit vom Respirator		Vasopressoren-Gabe	
	ω-6	ω-3	ω-6	ω-3
1	4 (5)	4 (5)	5 (5)	5 (5)
3	4 (5)	1 (5)	4 (5)	3 (5)
7	2 (5)	0 (5)	2 (5)	3 (5)
10	0 (5)	0 (5)	2 (5)	2 (5)

Tabelle 9: Notwendigkeit einer vasopressorischen und ventilatorischen Behandlung

Vergleich der Anzahl von Patienten, welche eine maschinell unterstützte Ventilations- und eine Vasopressoren-Therapie benötigten. Vasopressoren wurden über die Notwendigkeit einer Katecholamin-Behandlung definiert, eine Dopamin-Gabe von < 5.0 µg/(kg x min) ausgenommen. Es wird die Zahl der Patienten angegeben, in Klammern die Gesamtpatientenzahl jeder Studiengruppe.
(ω-6 = ω-6-Lipidinfusionsgruppe; ω-3 = ω-3-Lipidinfusionsgruppe)

5.4.3. APACHE II

An Tag 3 des Lipidinfusionsregimes stieg das CRP in der ω-6-Lipidinfusionsgruppe (205.0 ± 53.0 mg/l), während es in der ω-3-Gruppe abfiel (89.0 ± 20.0 mg/l) – jedoch erreichte die Differenz zwischen beiden Kollektiven keine Signifikanz (p = 0.077). Parallel dazu nahm die Leukozytenzellzahl in der Fischöl-Gruppe ab (12600 ± 3600 G/l) und in der ω-6-Gruppe zu (22400 ± 4500 G/l) (p = 0.086). In beiden Behandlungsgruppen wurde während der 10-tägigen Lipidinfusionsphase ein Abfall von Körpertemperatur, Laktat, CRP, Leukozytenzahl und APACHE II-Score dokumentiert.
Der ermittelte APACHE II-Score fiel in der Lipoven®-Gruppe im Studienverlauf um 32 %, in der Omegaven®-Gruppe um 42 %, allerdings ohne eine Signifikanz zu erreichen. Alle Patienten überlebten den 10-tägigen Beobachtungszeitraum.
Die Daten sind in Tabelle 7 zusammengefasst.

6. DISKUSSION

6.1. Anstieg des freien Präkursors „Fettsäure" im Plasma

Wie bereits andere Arbeiten in Bezug auf septische Patienten zeigten (275, 276), konnte in dieser Studie vor Beginn der geplanten Lipidinfusionen für alle Sepsispatienten ein deutlicher Anstieg der Gesamtmenge freier Fettsäuren im Plasma dokumentiert werden. Diese Veränderungen des Metabolismus unter einem akuten inflammatorischen Geschehen – angezeigt durch eine Erhöhung der Konzentration aller einzelnen Fettsäuren auf das > 2-10fache – könnte Ausdruck der Schwere der Erkrankung sein, in allen Fällen einmündend in den septischen Schock.

Folgende Faktoren könnten dieser veränderten metabolischen Antwort zugrunde liegen:

- Anstieg der freien Plasmafettsäuren als Teil der systemischen metabolischen Antwort auf Stress aufgrund des geänderten Metabolismus von Leber und anderen Organen (277).
- Gesteigerte Lipolyse durch Adipozyten und gesteigerte de novo Lipogenese in der Sepsis (278-281).
- Reduzierte muskuläre Fettsäureoxidation (282).
- Erhöhung der sekretorischen Phospholipase A_2 während der Sepsis (283).
- Die in allen Patientenfällen eingesetzte vasopressorische Medikation mit Epinephrin oder Norepinephrin erhöht bevorzugt die Plasmaspiegel der mehrfach ungesättigten freien Fettsäuren über eine Aktivierung der Lipoproteinlipase sowie der hormonsensitiven Lipoproteinlipase des Fettgewebes (284, 285).
- Das bei jedem Patienten in geringer Menge eingesetzte Heparin stellt einen weiteren Aktivator der Lipoproteinlipase dar (286).

Diese metabolischen Veränderungen des Organismus in der Sepsis münden in den imposanten Anstieg der Plasmakonzentration des Eicosanoid-Präkursors AA auf Werte zwischen 43 und > 100 µmol/l, dem eine Konzentration von ca. 11 µmol/l in der Kontrollgruppe sowie die Tatsache gegenübersteht, dass Messungen von freier extrazellulärer AA innerhalb eines inflammatorischen Fokus Spiegel zwischen 20 und 50 µmol/l erbrachten (287-289).

Nach Beginn der Fischöl-basierten Lipidgabe war ein rascher Anstieg der freien EPA- und DHA-Spiegel bis zu einem Maximum im Mittel von 120 bzw. 200 µmol/l zu verzeichnen, ein EPA+DHA/AA-Verhältnis von nahezu 2:1 erreichend. Das umgehende Erscheinen von freien ω-3-Fettsäuren nach Infusionsbeginn deutet auf eine zügige Hydrolyse von EPA- und DHA-enthaltenden Triglyzeriden in septischen Patienten hin. Dies steht mit der Vorstellung im Einklang, dass synthetische Lipidaggregate die endotheliale Lipoproteinlipase aktivieren, woraus ein Anstieg der FFA im Plasma resultiert (255, 256). Die Kinetik und das Maß der Erhöhung der plasmatischen FFA geht über die entsprechenden Veränderungen als Antwort auf eine konventionelle enterale Fischölgabe hinaus (290, 291). Interessanterweise wurden in der ω-3-Lipidinfusionsgruppe parallel ein Anstieg der Arachidonsäure dokumentiert, auch wenn dieser weniger beeindruckend war als die Plasmaspiegelzunahme von EPA und DHA. Derzeit ist noch nicht eindeutig geklärt, ob der Anstieg freier AA durch eine Freisetzung aus der ω-3-Emulsion bedingt ist (Anteil an AA ca. 2.6 %) oder durch die Substitution von EPA und/oder DHA mediierte sekundäre Freisetzung aus endogenen, AA enthaltenden Lipidpools. Dieser Anstieg plasmatischer AA in der ω-3-Infusionsgruppe kann im Zusammenhang der Spätphase der Sepsis, des sog. CARS, diskutiert werden. AA könnte hier als Präkursor proinflammatorischer Mediatoren dem Entstehen einer Immunparalyse entgegenwirken und zur Abwehr sekundär eindringender Mikroorganismen beitragen.

Interessant wäre eine Untersuchung des FFA-Profils unter dem gleichen Infusionsregime in einem Patientenkollektiv, dessen Ernährung sich bezüglich seiner Fettzusammensetzung vor Auftreten der Sepsis vor allem aus ω-3-ungesättigten Fetten zusammensetzt, um bereits vor der Infusionstherapie den Anteil an ω-3-Fetten gegenüber den ω-6-Fetten zu erhöhen. So wurde bereits 1994 von Lorgeril et al. eine Anwendung vegetarischer Öle, wie Oliven- und Rapsöl, in einer breiten Bevölkerung diskutiert, um den Effekt von therapeutischen Strategien, die eine Suppression der ω-6-Eicosanoidproduktion zum Ziel haben, zu verbessern, wenn zuvor ein größerer Anteil an ω-3-Fettsäuren bereitgestellt wurde (292). Vor diesem Hintergrund wird ernährungspolitisch die Produktion einer genetisch modifizierten Ölsaaternte erwogen, um ein vegetarisches Öl mit modifizierten Fetten, für die ein gesundheitsfördernder Effekt erwiesen ist, bereitzustellen, ohne dass der Konsument einen wesentlichen Nahrungswechsel vornehmen muss (293).

6.2. Immunmodulatorische Therapie der Sepsis durch ω-3-Lipide infolge einer verbesserten Immunantwort durch Reduktion der hyperinflammatorischen Antwort der Leukozyten?

Parallel zu dem Anstieg freier EPA und DHA im Plasma der ω-3-Patienten wurde eine beträchtliche LTB_5-Ausschüttung aus Neutrophilen beobachtet, die nach Isolation ex vivo mit Calciumionophor stimuliert wurden. In diesen Experimenten wurde in der Omegaven®-Gruppe ein LTB_5/LTB_4-Verhältnis von > 20 % erreicht. Es ist zu berücksichtigen, dass die PMN-Stimulation in Abwesenheit von Plasma erfolgte. Dies deutet darauf hin, dass in den Membranphospholipidpools, welche die Präkursor-FFA für den granulozytären 5-Lipoxygenase-Stoffwechsel bereitstellen, ein Austausch von AA gegen freie EPA aus dem Plasma stattgefunden hat. Des Weiteren ist zu bedenken, dass der Leukotrienmetabolismus der Neutrophilen im physiologischen „Mikroenvironment" dem strengen Einfluss der exogenen freien Präkursor-FFA unterworfen ist (294, 295). Da freie EPA gegenüber freier AA das bevorzugte Substrat der 5-LO darstellt, kann eine deutliche Wirkung dieser im ω-3-Kollektiv demonstriert werden. Werden die sehr hohen Konzentrationen freier EPA und freier DHA im Plasma der Patienten, die die ω-3-Fettemulsionen erhielten, berücksichtigt, ist bei einer Stimulation der PMN durch Exo-, Endotoxine und inflammatorische Mediatoren in vivo ein wesentlich höherer Prozentsatz an LTB_5 zu erwarten. Diese Tatsache könnte ebenfalls für den thrombozytären Thromboxan-Metabolismus gelten: Das auf die ex vivo-Stimulation gewaschener Thrombozyten dokumentierte TxA_3/TxA_2-Verhältnis von ca. 18 % wird möglicherweise in vivo übertroffen, wenn die thrombozytäre Aktivierung in einer Umgebung stattfindet, in der die Plasmakonzentration von freier EPA und freier DHA zur freien AA hinzukommt.

Vor diesem Hintergrund ist zu berücksichtigen, dass Mediatoren eine unterschiedliche Reaktion initiieren, je nachdem in welcher Konzentration sie vorliegen. So konnten Endres et al. dokumentieren, dass eine Reduktion der PGE_2-Bildung den Immunstatus verbessert, eine vollständige Blockierung jedoch eine Verschlechterung der Immunabwehr bewirkt (296). Des Weiteren induziert PGE_2 in niedriger Konzentration die Lymphozytendifferenzierung, während es in hoher Konzentration die MNL- und B-Zell-Proliferation inhibiert und die NK-Zellaktivität reduziert. Da Monozyten und Makrophagen in der Sepsis hohe Konzentrationen der 2er-Eicosanoide freisetzen, sind eine gesteigerte Inflammation und eine Schwächung der

Immunantwort die Folge – EPA hingegen verändert die Bildung von PGE_2, welches ein wichtiger Modulator der Makrophagen- und Lymphozyten-Funktion ist (297).

Unter inflammatorischen Bedingungen, wie sie z. B. in der Sepsis vorliegen, wurden sowohl eine steigende als auch eine supprimierte granulozytäre Superoxid-Bildung als Antwort auf verschiedene Protokolle einer ex vivo-Stimulation beschrieben.
Es häufen sich allerdings die Beweise, nach welchen eine Beeinträchtigung der granulozytären Funktionen, einschließlich des respiratorischen Burst, immer offensichtlicher wird, je schwerer und länger die Sepsis verläuft. In einer Reihe von Studien in Bezug auf isolierte Neutrophile septischer Patienten konnten Solomkin et al. bereits eine supprimierte fmlp-induzierte Superoxid-Freisetzung nachweisen, obwohl die fmlp-Rezeptordichte und die zelluläre Internalisation unbeeinflusst waren (298, 299). Ebenso berichteten Vespasiano et al. (300) sowie Pascual et al. (301) von einer reduzierten O^{2-}-Ausschüttung aus Neutrophilen septischer Patienten, unabhängig von dem zur ex vivo-Stimulation verwendeten Agens.
In Übereinstimmung mit diesen Beobachtungen wurde im Falle aller hier untersuchten Studienpatienten bereits zu Studienbeginn eine reduzierte granulozytäre Superoxid-Produktion dokumentiert, welche im weiteren Verlauf in der Gruppe, die das ω–6-Infusionsregime erhielt, zunahm. Zudem konnte gezeigt werden, dass alle weiteren Merkmale der Neutrophilenfunktion, die in dieser Arbeit berücksichtigt wurden, in den von den septischen Patienten isolierten PMN supprimiert waren: Hierzu zählten die Lipidmediatoren einschießlich LTB_4 und PAF, die Elastasefreisetzung und die Bildung von Inositolphosphaten mittels „PI-response". Letztere repräsentiert einen entscheidenden granulozytären Signaltransduktionsweg und könnte einen grundlegenden Mechanismus der beobachteten Beeinträchtigung von Neutrophilenfunktionen darstellen. In Bezug darauf konnte Burke et al. einen abnehmenden Ca^{2+}-Einstrom als Antwort auf die fmlp-Stimulation in isolierten PMN septischer Patienten nachweisen (302).
Weitere detailierte Studien zur Klärung der Signaltransduktion Neutrophiler, isoliert aus dem Blut septischer Schockpatienten, sind unbedingt erforderlich.

Bereits in der Einleitung wurde die Beeinflussung der Entstehung und Wirkung proinflammatorischer Zytokine als inflammatorische Antwort des Organismus durch verabreichte ω-3-Fettsäuren beschrieben. Als Initiatoren eines septischen Krankheitsgeschehens sind neben Endotoxin (LPS) insbesondere IL-1 und TNF-α zu nennen,

die mittels Rezeptorokkupation eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-κB mit anschließender Expression weiterer inflammatorischer Mediatoren zur Folge haben: IL-1, TNF-α, IL-2, IL-6, IL-8, GM-CSF, ICAM-1, E-Selektin, IL-2-Rezeptor.
Van Deventer et al. zeigten in einer Studie mit gesunden Probanden, dass die TNF-α-Freisetzung ca. 30-45 min nach Endotoxin-Gabe erfolgt und über 180 min anhält, der Peak nach 90 min erreicht wird. Dagegen konnte kein IL-1-Anstieg dokumentiert werden. IL-6 stieg ca. 15 min nach TNF-α-Freisetzung an und erreichte seinen Peak nach 120-150 min (303). Bereits 1987 beschrieben Waage et al., dass es nur in besonders schweren Verläufen des septischen Schocks zu einem IL-1-Anstieg im Plasma kommt. Sie fanden einen Zusammenhang zwischen der IL-6-Konzentration im Plasma und der Mortalität (304).
Aus einer in 1994 abgeschlossenen Studie lässt sich auf einen möglicherweise prädiktiven Wert des IL-6-Plasmaspiegels bezüglich Bakteriämie und Letalität schließen (305).
Phase III-Studien, die die therapeutische Strategie einer Antagonisierung dieser Initiatoren der Sepsis zum Thema hatten, wurden ohne Erfolg durchgeführt. Hier sind insbesondere die therapeutische Verwendung von TNF-Antagonisten und IL-1-Rezeptorantagonisten zu nennen. Als Ursache hierfür kommt einerseits der sehr frühe TNF-Anstieg in der Sepsis in Frage, so dass das Maximum seiner Auswirkung zum Zeitpunkt der Diagnosestellung einer Sepsis bereits überschritten ist. Andererseits ist eine „Orchestration“ der Ereignisse in der Sepsis zu diskutieren, bedingt durch eine ausgeprägte Vielfalt an Mediatoren.
Aufgrund der oben geschilderten immunmodulatorischen Effekte der ω-3-Lipide ist hervorzuheben, dass diese in zahlreiche Abläufe der Inflammation beeinflussend eingreifen und damit der Mediatorenvielfalt am ehesten gerecht werden.

Interessant ist die derzeitige Diskussion um den LPS-Rezeptor TLR, dessen Funktion bereits oben beschrieben wurde. Durch diesen Rezeptor mediiert LPS die zelluläre Aktivierung der Leukozyten und über eine erhöhte NF-κB-Aktivierung die gesteigerte Expression inflammatorischer Mediatoren (306). Hier bietet sich ein erneutes Potential der Sepsistherapie, konnte doch in einem Mausmodell eine LPS-Resistenz durch TLR-4-Mutationen dokumentiert werden (307). Ebenso könnte eine unterschiedliche Anzahl der TLR die Empfindlichkeit von Immunzellen gegenüber Infektionen wiederspiegeln – so lässt sich eine große Variationsbreite der individuellen Antwort auf Infektion erkennen, weswegen ein genetischer Einfluss angenommen wird (308, 309). In Patienten mit systemischer Meningokokken-Erkrankung konnte ein signifikantes Ausmaß an TLR-4-Mutationen nachgewiesen werden (310). Es fand sich ebenso ein Zusammenhang zwischen dem

Vorliegen des TNF-α-Polymorphismus TNF2 und dem Entstehen einer Sepsis sowie deren tödlichen Ausgang (311). Bezüglich der Suppression der TNF-α-Bildung durch Fischöl fand sich ebenfalls eine Abhängigkeit von dem Vorliegen eines Genpolymorphismus (312).

Aus den verschiedenen tierexperimentellen Sepsis-Modellen liegen widersprüchliche Resultate vor: Eine diätetische Vorbehandlung mit Fischöl reduzierte das Überleben in einem Mausmodell (313), steigende Plasmaspiegel von TNF-α wurden von anderen Autoren in einem Modell von mit Fischöl vorgefütterten und anschließend LPS ausgesetzten Mäusen beschrieben (314). Keinen Einfluss einer diätetischen ω-3-Lipidgabe auf die Überlebensrate von diabetischen Ratten mit intraperitonealer Sepsis fanden wiederum andere Arbeitsgruppen bei erhöht gemessenen Konzentrationen inflammatorischer Zytokine in der ω-3-FS-Gruppe (315). Im gleichen Modell unter der Anwendung einer totalen parenteralen Ernährung wurde kein Unterschied der inflammatorischen Zytokine dokumentiert (316). Im Gegensatz dazu fanden sich vorteilige Effekte der ω-3-FS auf ein bestehendes Lungenödem sowie den Blutfluss im Splanchnikusgebiet (317). Diese differenten Ergebnisse erklären sich möglicherweise durch den Unterschied der verwendeten Bedingungen: verschiedene Spezies und Modelle (z. B. chronische intraperitoneale Sepsis versus LPS-Bolus-Gabe) und verschiedene diätetische Ernährungsregime (enteral versus parenteral sowie differierende Zusammensetzungen). Hinzu kommt, dass eine kürzlich veröffentlichte Arbeit folgenden Punkt fokusierte: Das Aktivierungsstadium veränderte den Effekt von ω-3-FS auf Mausmakrophagen. Während Fischöl die inflammatorische Zytokinantwort in durch Thioglycollat gewanderte Makrophagen erniedrigte, wurde die Antwort in ortsständigen Zellen gesteigert (318).

6.3. Das Konzept der parenteralen Immunnutrition – eine Perspektive

Bereits Anfang der 80er Jahre beschäftigten sich Kliniker mit dem möglicherweise schädigenden Effekt einer parenteralen Ernährung bei kritisch kranken Patienten, welche häufig mit einer künstlichen Ernährung versorgt werden, obwohl die Auswirkung der einzelnen Ernährungskomponenten unklar und strittig ist. Die zur parenteralen Ernährung am weitesten verbreitete Infusionstherapie beinhaltet Lipidemulsionen, die auf ω-6-FFA beruhen, wie z. B. Sojabohnenöl. Diskutiert wird, ob die hohen Spiegel der ω-6-Fette für die beobachteten schädigenden Effekte auf die Immunantwort in der Inflammation während einer

vollständigen parenteralen Ernährung verantwortlich sind (319, 320). Zahlreiche Untersuchungen legen den Einsatz von alternativen Lipidsourcen nahe, wie Fisch-, Kokosnuss-, Raps- und Olivenöl (292, 321).

6.3.1. Vorteile einer parenteralen versus enteralen Darreichungsform von Lipiden

Obwohl die Langzeiterfahrungen mit ω-3-Fettsäuren auf einer diätetischen Applikation beruhen, ist die orale Therapie durch einige Nachteile versehen: Der therapeutische Effekt zeigt einen verzögerten Beginn und ist aus diesem Grunde in akuten Erkrankungen ineffektiv. Bei Verwendung von Fischölkapseln ist die Verfügbarkeit von bioaktiven Molekülen dadurch begrenzt, dass die Fettsäuren die Zirkulation nach Durchwandern der Darm-Blut-Schranke in Form von Triglyzeridvesikeln erreichen, zur Leber transportiert werden und hier ein „Remodeling" erfahren. Durch diese Vorgänge kommt es zu einem Verlust von freier ω-3-FS sowie zu einer limitierten Bereitstellung freier FS für den inflammatorischen Metabolismus sowohl der Leukozyten als auch der Endothelzellen.

Mehrere Arbeiten konnten zeigen, dass die enterale Zufuhr von ω-3-Fetten, wie z. B. von Fischöl, mehrere Tage und Wochen benötigt, um die FS-Zusammensetzung der Membranphospholipide und damit das Lipidmediatoren- und das Zytokinprofil des Organismus nachweislich zu verändern (322-324) oder eine Verbesserung des Bildes hyperinflammatorischer Erkrankungen zu initiieren (244). Ungeachtet dieser Limitierung wurde unter dem Einsatz einer mit ω-3-FS angereicherten Ernährung über eine Magensonde im Falle intensivpflichtiger Patienten eine signifikante Reduktion infektiöser Komplikationen und der Mortalitätsrate im Vergleich zu einer isokalorischen Kontrollnahrung dokumentiert (325-327). Da diese Nahrung weitere Zusätze enthielt (Glutamin und Arginin), ist unklar, welche der Additiva der enteralen Ernährung dieses Ergebnis verursachte.

Parallel zur Aktivierung der endothelialen Lipoproteinlipase durch synthetische Lipidaggregate im Plasma entgehen die in Fettemulsionen enthaltenen Triglyzeride durch eine parenterale Gabe der Kinetik und den Problemen der Digestion und Resorption (328, 329). Intravenös angebotene, EPA enthaltende Triglyzeride werden rasch hydrolysiert, wodurch EPA in der Plasmafraktion der freien Fettsäuren (FFA) nachgewiesen werden kann (256), was die hier vorliegenden Ergebnisse bestätigen. Damit resultiert aus einer parenteralen Fettemulsionsgabe ein rascher Anstieg der plasmatischen freien FS, insbesondere von AA, EPA und DHA, die dann im Überschuss als freie Präkursor dem Lipidmediatormetabolismus zur Verfügung stehen.

Durch die intravenöse Gabe einer Fischöl-basierten Lipidemulsion im Falle chronischer Darm- und Hauterkrankungen zeigte unsere Arbeitsgruppe bereits im Vorfeld eine rasche Veränderung der Fettsäurezusammensetzung von Zellmembranen und eine veränderte Lipidmediatorsynthese (330).

Patienten mit schwerer Sepsis, im septischen Schock oder mit ARDS benötigen eine totale parenterale Ernährung, da ihr Darm nicht dazu in der Lage ist, diätetische Nahrung zu transportieren oder aufzuschlüsseln. Aufgrund der Entwicklung einer Hypotension im Rahmen des septischen Schocks kommt es über eine hämodynamische Dysfunktion mit nachfolgender Störung der Mikrozirkulation – potenziert über eine vorliegende disseminierte intravasale Gerinnung – zu einer fokalen Ischämie und im Weiteren zur Zerstörung der Schleimhautbarriere. Im Falle des oberen Gastrointestinaltrakts ist die Entstehung einer Nekrose und damit eines Ulkus die Folge, im unteren Gastrointestintaltrakt das Syndrom des MSOF (multiple splanchnic organ failure), welches durch ödematöse Dünndarmwände und verminderte Peristaltik, verbunden mit Schrankenstörungen, gekennzeichnet ist. Durch die Entwicklung einer Schrankenstörung in diesem Organ wäre die Gefahr von einem sekundären Keim- oder Toxineintritt denkbar – damit stellt der Darm eine mögliche „sekundäre“ oder „endogene“ Sepsisquelle dar. Jedoch existieren bislang für diese Theorie keine wissenschaftlichen Belege außer die in Polytraumatisierten und Schockpatienten durchgeführten Endotoxinmessungen (34).

Des Weiteren zu berücksichtigen ist die Wirkung der Begleitmedikationen auf die Funktion der glatten Muskelzellen: So bewirken Katecholamine und Anästhetika eine Paralyse der glatten Muskulatur des Magen-Darm-Trakts. Hinzu kommt eine Beeinflussung durch weitere vorliegende metabolische Störungen: Bjornsson et al. hoben eine verringerte gastrointestinale Motilität unter anderem auf dem Boden einer Hyperglykämie bei kritisch Kranken hervor (331).

Des Weiteren wird das Entstehen einer Fettleber auf dem Boden der Verbrennung von Kohlenhydraten als alleiniger Energielieferant durch die parenterale Gabe von Lipidemulsionen unterbunden.

6.3.2. Phasen der Sepsis

Die pathogenetischen Folgen der beeinträchtigten Granulozytenfunktionen sowie der Veränderung des Zytokinprofils in der Sepsis sind zur Zeit noch ungeklärt. Das CARS-

Konzept favorisiert eine initiale hyperinflammatorische Erkrankungsphase mit einer überschießenden leukozytären Antwort und einer Freisetzung des gesamten destruktiven Potentials der Leukozyten (SIRS), gefolgt von einer gegenregulatorischen Phase mit Überwiegen der antiinflammatorischen Mediatoren und mit Auswirkung auf die Immunkompetenz der Zellen (CARS) (244, 332). Diese späte Phase der Sepsis - die Phase der „Immunparalyse" - ist durch eine beeinträchtigte Neutrophilenfunktion und inaktive Monozyten gekennzeichnet. Folge ist eine abgeschwächte Abwehr des Organismus und eine zunehmende Empfänglichkeit gegenüber Sekundärinfektionen (299, 333-336).

Ungeachtet vieler offener Fragen hebt die vorliegende Pilotstudie hervor, dass diese Folgen durch die zur parenteralen Ernährung septischer Patienten eingesetzten ω-6- versus ω-3-Lipidemulsionen unterschiedlich modifiziert werden. Während in der Patientengruppe, welche die konventionelle Lipidernährung erhielt, die neutrophile Hyporeagibilität entweder fortbestand - nachvollziehbar anhand der PAF- und LTB_4-Synthese - oder im weiteren Verlauf zunahm - erkennbar an der PI-Hydrolyse und der Freisetzung von Superoxid (lediglich die Elastasefreisetzung ließ einen diskreten Anstieg erkennen) – konnte die partielle Wiederherstellung eines „normalen" granulozytären Reaktionsverhaltens in der Omegaven®-Gruppe beobachtet werden. Dieser Unterschied in beiden Patientenkollektiven war an Studientag 7 am deutlichsten zu erkennen. Hier konnte eine statistisch signifikante Differenz zwischen den beiden Infusionsgruppen bezüglich der PI-Response, der Bildung von PAF sowie der Superoxid- und Elastase-Freisetzung neben der direkt durch EPA bedingten LTB_5- und TxA_3-Synthese dokumentiert werden.

Die erweiterten und immunmodulatorischen therapeutischen Ansätze in der Sepsis sind vor dem Hintergrund der Ergänzung einer symptomatisch orientierten Sepsistherapie zu sehen. So ist eine Kontrolle und Sanierung des Infektionsfokus sehr wichtig und umgehend einzuleiten, konnte gezeigt werden, dass die Verzögerung einer adäquaten Antibiotikatherapie zu einer Steigerung der Mortalität um 10 – 15 % führt (337).
Des Weiteren ist es aus pathophysiologischen Überlegungen sinnvoll, bei Sepsispatienten – insbesondere in der Phase der arteriellen Hypotension, Mikrozirkulationsstörung und Laktatbildung, eine Optimierung des Sauerstofftransports anzustreben, um hierüber eine Steigerung der Sauerstoffaufnahme peripherer Organe und damit eine Reduktion der Sauerstoffschuld zu erreichen. Hierzu zählen Maßnahmen wie Volumenzufuhr, Optimierung des Hämoglobingehalts, Verwendung positiv inotroper Pharmaka und Vasodilatatoren, wie

z. B. PGE_1, PGI_1 und NO. Induziert das in der Sepsis unter Wirkung der iNOS gebildete NO eine Katecholamin-refraktäre Hypotension (338), so konnte dokumentiert werden, dass Inhibitoren der NO-Synthasen eine Erhöhung des arteriellen Drucks und des systemischen Widerstands in der Sepsis bewirken. Jedoch musste eine multizentrische Studie bezüglich des therapeutischen Einsatzes unselektiver NO-Synthase-Inhibitoren aufgrund des gleichzeitig auftretenden Abfalls des Cardiac Index abgebrochen werden (339, 340).

Eine 2001 veröffentliche Untersuchung bezüglich der Standardtherapie versus des frühen Einsatzes einer zielgerichteten therapeutischen Behandlung der schweren Sepsis und des septischen Schocks anhand des frühen Einsatzes von Volumenersatz, Inotropika, Vasopressoren sowie Transfusionen dokumentiert eine reduzierte Mortalität in der Leitlinien-orientierten Therapiegruppe gegenüber der Standardtherapiegruppe (30.5 versus 46.5 %) (341).

Gegenwärtig hat noch keine klinische Studie, zielend auf die Antagonisierung spezifischer inflammatorischer Mediatoren der menschlichen Sepsis (anti-TNF-alpha, anti-IL-1, IL-1-ra, anti-LPS), eine gesteigerte Überlebensrate in der Sepsis erreicht. Der Einsatz solcher Therapien ist vor dem Hintergrund des biphasischen Verlaufs der Sepsis zu diskutieren: Damit könnte ein eingesetztes antiinflammatorisches Zytokin einen günstigen Einfluss in der Frühphase der Sepsis besitzen, in der Spätphase jedoch zu einer zusätzlichen Schädigung führen. Bis heute existiert noch kein Routinelaborparameter, der eine Diskriminierung zwischen hyper- und hypoinflammatorischer Phase der Sepsis zuließe.
Allerdings liegen einzelne Erfolge vor: Volk et al. zeigten, dass durch eine in der immunparalytischen Spätphase der Sepsis verabreichte Interferon-Gabe nicht nur die HLA-DR-Expression der Monozyten, sondern auch deren Produktion von proinflammatorischen Zytokinen rekonstituierbar war (335).
Nicht zu vernachlässigen ist, dass zahlreiche Studien zur Klärung der pathogenetischen Grundlagen der Sepsis mit gesunden Testpersonen durchgeführt wurden und werden. Dies wird nicht der Tatsache gerecht, dass Sepsispatienten zahlreiche vorbestehende Funktionsstörungen aufweisen und die inflammatorischen Zellen durch proinflammatorische Zytokine und Endo-/Exotoxine in einen voraktivierten Zustand versetzt werden („Priming”). Des Weiteren ist die Interpretation von Serumspiegeln immunmodulierender Mediatoren – gemessen mittels Immunoassays – dadurch erschwert, dass die Menge der an Zellen und Rezeptoren gebundenen Mediatoren nicht erfasst werden kann. Ebenso wird angenommen,

dass die Konzentration der Zytokine in betroffenen Gewebskompartimenten von ebenfalls großer klinischer und pathophysiologischer Bedeutung ist, hierüber liegen jedoch derzeit kaum Erfahrungen vor.

Bereits vor dem ersten Einsatz von anti-TNF und anti-IL-1 wurden hochdosierte Steroidmedikationen untersucht: In einer großen multizentrischen Studie konnte kein positiver Einfluss auf das Überleben im septischen Schock verzeichnet werden. Vielmehr zeigt sich ein erhöhtes Risiko einer GI-Blutung und eine Anfälligkeit gegenüber opportunistischen Infektionen (342, 343). Eine Untersuchung bezüglich des Einsatzes einer niedrigdosierten Hydrokortison- und Fludrokortison-Therapie in der Sepsis konnte eine geringere Therapiedauer mit Vasopressoren im Vergleich zur Placebogruppe hervorheben (344). Aktuell läuft eine große multizentrische Studie (CORTICUS) bezüglich dieser therapeutischen Strategie in der Sepsis.

NSAID (non-steroidal anti-inflammatory drugs) wurden kürzlich in einer multizentrischen Sepsisstudie getestet: Auch hier zeigte sich keine verbesserte Überlebensrate. Mit der Gabe dieser Medikation war das vermehrte Risiko einer GI-Blutung, eines Nierenversagens und einer Bronchokonstriktion vergesellschaftet (345).
Für aktiviertes Protein C kann eine Inhibition des „Rollings“ der PMN auf dem Endothel, der Wirkung des Tissue factor (TF) auf Endothelzellen und eine Reduktion der TF-Freisetzung aus Monozyten sowie die Inaktivierung der Gerinnungsfaktoren PAI-1, Faktor VIIIa und Va nachgewiesen werden. Demnach ist von antithrombotischen, antiinflammatorischen und profibrinolytischen Wirkungen des rekombinanten humanen aktivierten Protein C (rhAPC) Drotrecogin alfa auszugehen. Eine in 2001 von Bernard et al. veröffentlichte randomisierte, doppelblinde multizentrische Phase III-Studie (PROWESS), die 1690 Sepsispatienten einschloss, konnte eine signifikante Reduktion der Mortalität in schwerer Sepsis dokumentieren, jedoch mit einem gesteigerten Blutungsrisiko (346).

Der Einsatz weiterer Antagonisten der Mediatoren in der Sepsis blieben ohne signifikanten Benefit: PAF-Antagonist BN 52021, Bradykinin-Antagonist CP-0127 (347, 348).
Pentoxifyllin und andere PDE-Inhibitoren induzieren die PGI_2-Bildung in Endothelzellen, was eine TNF-α-Inhibition und damit eine verminderte Adhärenz der PMN auf den Endothelzellen zur Folge hat – ein wichtiger Faktor in dem durch PMN verursachten Lungenschaden (349).

6.3.3. Mögliche Intervention mit ω-3- versus ω-6-Lipidemulsionen

Im Gegensatz zur deutlichen Immunsuppression durch Verabreichung von Steroiden, Methotrexat, Cyclosporin zeigen ω-3-Fettsäuren eine maßvolle Immunmodulation in verschiedenen Erkrankungen. So konnte ein klinischer Benefit bereits für den Einsatz von intravenösem Fischöl im Rahmen einer schweren Colitis ulcerosa und einer akuten und ausgedehnten Psoriasis guttata herausgearbeitet werden (350, 351). Eine Studie an Nierentransplantierten zeigte, dass die enterale Gabe von Fischöl zu einer höheren glomerulären Filtrationsrate, das Maß der renalen Funktion, führte als in der Vergleichsgruppe (352). In zahlreichen tierexperimentellen Modellen der Organtransplantation wurde eine günstige Beeinflussung des akuten Reperfusionsschadens und der akuten Abstoßungsreaktion nachgewiesen.

Angesichts der Tatsache – wie bereits im Vorfeld ausführlich diskutiert – dass der Mechanismus der Herunterregulation von granulozytären Funktionen und der Inaktivierung von Monozyten im septischen Schock nicht eindeutig geklärt ist, sind derzeit Spekulationen über die Intervention mittels Verwendung von ω-3-Lipiden verfrüht. Die wesentlichen Kennzeichen der von EPA abgeleiteten Mediatoren und der deutliche, wenn auch nicht signifikante Abfall des CRP innerhalb der Omegaven®-Gruppe könnten jedoch darauf hindeuten, dass es in Gegenwart von hohen Plasmaspiegeln freier ω-3-Fettsäuren zu einer Dämpfung fortdauernder inflammatorischer Ereignisse kommt, bedingt durch Reduktion der Konversion von AA in ihre inflammatorischen Mediatoren, durch Verringerung der Bildung von Second messenger und inflammatorischen Zytokinen sowie durch Reduktion der Hochregulation von Adhäsionsmolekülen und damit Reduktion der Leukozytenextravasation.
Den Aspekt einer Suppression der Neutrophilenaktivierung in der Sepsis untermauernd, berichteten Czermak und Mitarbeiter über einen nützlichen Effekt der C5a-Blockade im Rattenmodell (353).

Durch die Dämpfung der überschießenden Immunantwort in der Frühphase der Sepsis wird eine Rekonstitution der Immunabwehr des Organismus gegenüber invasiven Mikroorganismen erreicht, ein Zusammenhang, der in Abbildung 20 veranschaulicht wird. Galban et al. konnten durch die enterale Substitution von ω-3-FS eine Reduktion der Mortalität in der Sepsis dokumentieren (323).

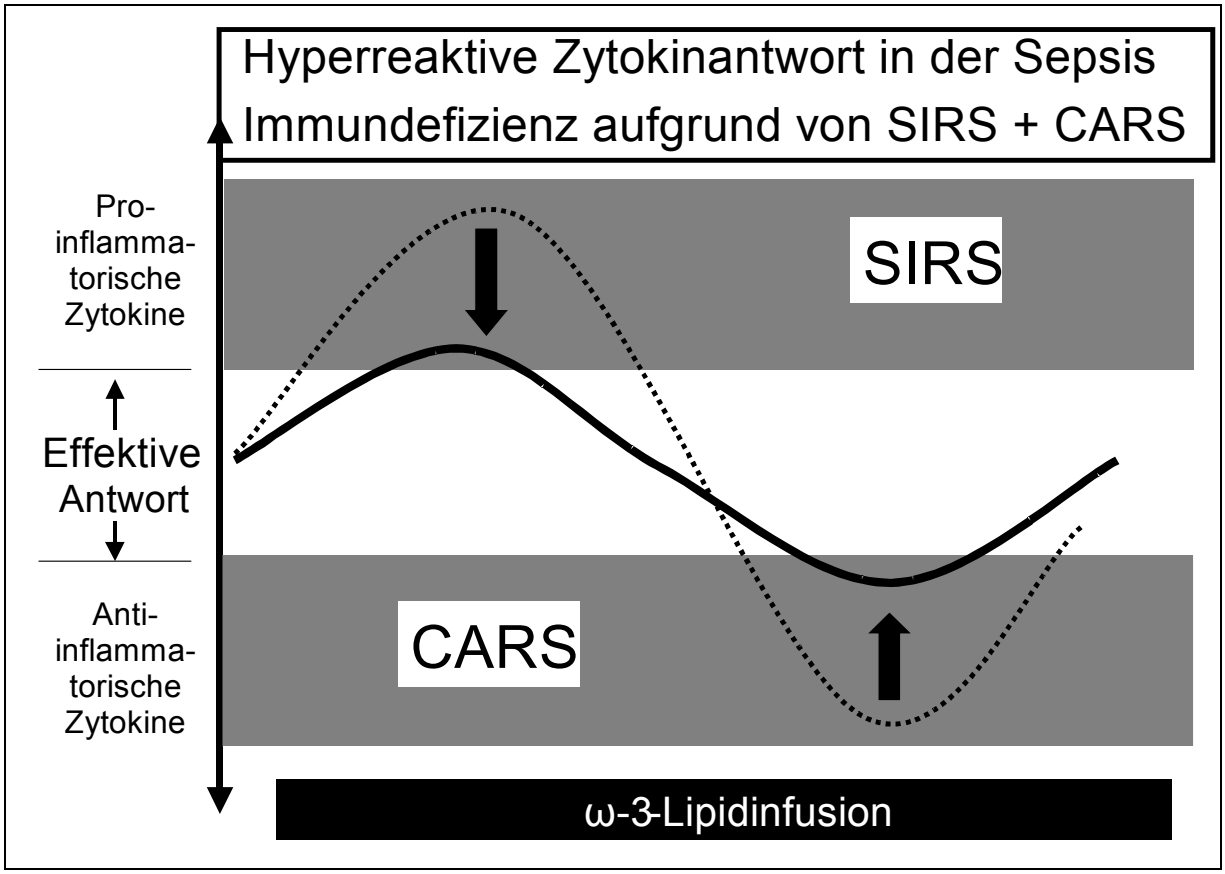


Abbildung 20: ***Beeinflussung des postulierten biphasischen Verlaufs der Sepsis durch die parenterale Verabreichung von ω-3-Lipidemulsionen***

Zu Beginn der Sepsis sind die Leukozyten septischer Patienten hyperaktiv im Rahmen des SIRS (systemic inflammatory response syndrome) und führen zur Entwicklung eines sekundären Organschadens. Die nachfolgende Phase des CARS (compensatory anti-inflammatory response syndrome) ist durch Leukozyten charakterisiert, die eine reduzierte Fähigkeit der Mikrobenabwehr besitzen, was letztendlich Sekundärinfektionen zur Folge hat. ω-3-Lipidemulsionen dämpfen sowohl die Hyperinflammation als auch die überschießende hypoinflammatorische Antwort durch die Beeinflussung der inter- und intrazellulären Reaktionen auf Inflammation.

Die Ausführungen machen deutlich, dass gegenwärtig noch kein therapeutisches Vorgehen einer Mediatorenblockade zur Behandlung der Sepsis empfohlen werden kann. Dies mag enttäuschen angesichts der gewaltigen Forschungsinvestitionen auf diesem Gebiet. Jedoch haben diese den Kenntnisstand auf dem komplexen Sektor der Auseinandersetzung des Organismus mit infektiösen Agenzien erheblich erweitert. Da die Behandlung von Sepsispatienten ein permanentes Mitdenken in pathophysiologischen Konzepten erfordert, ist ein solcher Erkenntnisgewinn bereits jetzt hilfreich. Die Komplexität der Ereignisse erkennend, zeigt sich, dass jedes Eingreifen auf dem Gebiet der Mediatoreninteraktion vielfache Konsequenzen hat, die sowohl vor- als auch nachteilig sein können. Es wird keinen „Anti-Alles-Cocktail" geben, da inflammatorische Mediatoren und inflammatorisch kompetente Zellen zur Überwindung eines infektiösen Geschehens einerseits notwendig sind, andererseits bei übermäßiger Aktivierung destruierende Effekte besitzen. Die Vielfalt der an der Initiierung und der Perpetuierung der Sepsis beteiligten Mediatoren legt den Einsatz von Kombinationstherapien nahe, allerdings existieren hierzu keine ausreichenden Erfahrungen - es sind weiterführende klinische Studien erforderlich.

7. ZUSAMMENFASSUNG

In der hier vorgestellten randomisierten Studie wird eine in der parenteralen Ernährung septischer Patienten verwendete Fischöl-basierte Fettemulsion der konventionellen, an ω-6-Fettsäuren reichen Lipidinfusion gegenübergestellt.

In beiden Lipidinfusionsgruppen war die Plasmakonzentration von Arachidonsäure (AA) zu Studienbeginn signifikant erhöht. Es konnte gezeigt werden, dass alle Merkmale der Neutrophilenfunktion, die in dieser Arbeit berücksichtigt wurden, in den von den septischen Patienten beider Studiengruppen isolierten polymorphkernigen Neutrophilen (PMN) supprimiert waren: Lipidmediatoren einschließlich LTB_4 und PAF, granulozytäre Superoxid-Produktion, die Elastasefreisetzung und die Bildung von Inositolphosphaten. In der ω–6-Infusionsgruppe konnte an Tag 7 ein signifikanter Abfall der Superoxid-Freisetzung, der Elastasesekretion und der Bildung von Inositolphosphaten als Zeichen einer fortdauernden oder sogar zunehmenden Beeinträchtigung der Neutrophilenfunktion nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu fand sich in der Gruppe, die eine Fischöl-basierte parenterale Ernährung erhielt, ein rascher Wandel des Lipidmediatoren- und Präkursor-Profils im Plasma mit Überwiegen der ω-3-Fettsäuren Eicosapentaensäure (EPA) und Docosahexaensäure (DHA) sowie Auftreten der aus EPA gebildeten Mediatoren. Begleitend konnte eine partielle Erholung ex vivo analysierter Granulozytenfunktionen dokumentiert werden, sich von der ω-6-Gruppe signifikant unterscheidend.

Aufgrund der erhobenen Daten ist davon auszugehen, dass die parenterale Gabe von ω-6-Fettemulsionen in der Sepsis das Entstehen einer Immunparalyse beschleunigt und unterhält, die Verabreichung von ω–3-Fettsäuren jedoch einerseits durch einen Wechsel der gebildeten Mediatoren zu einer Reduktion des Destruktionspotentials hyperreaktiver Leukozyten in der ersten Phase der Sepsis (SIRS) führt. Andererseits wirkt die partielle Erholung der immunkompetenten Blutzellen dem Eintreten einer Immunparalyse in der zweiten Phase der Sepsis (CARS) entgegen.

Die vorliegende Studie ist aufgrund ihrer limitierten Anzahl an Sepsispatienten nicht in der Lage, eine mögliche Auswirkung von ω-3- versus ω-6-Fettinfusionen auf den klinischen Verlauf der Sepsis zu evaluieren. Jedoch steht außer Zweifel, dass die beiden Alternativen einer lipidbasierten parenteralen Ernährung einen unterschiedlichen Einfluss auf die Entstehung inflammatorischer Mediatoren und auf granulozytäre Funktionen ausüben, die eng in die pathogenetischen Grundlagen der Sepsis eingebunden sind.

7. SUMMARY

The presented randomized study compares the effects of a fish oil-based lipid infusion and a conventional ω-6 fatty acid enriched lipid infusion for parenteral nutrition in patients with septic shock.

At baseline in both groups concentrations of arachidonic acid (AA) in plasma were significantly increased at baseline. Suppression of all examined neutrophil functions in isolated polymorphonuclear granulocytes (PMN) was shown in both study groups: lipid mediators including leukotriene B_4 (LTB_4) and platelet-activating factor (PAF), superoxide generation, release of elastase, and phosphoinositide metabolism. Under ω–6 lipid infusion regimen a significant decrease of superoxide generation, elastase release and phosphoinositide metabolism could be documented on day 7 as a sign of a persistent or even increasing impairment of neutrophil function. In contrast, patients who received fish oil-based lipid infusion for parenteral nutrition showed a rapid switch in plasma profile of lipid mediators and precursors with predominance of the ω-3 acids eicosapentaenoic (EPA) and docosahexaenoic (DHA) acid and with appearance of ω-3 fatty acid-derived mediators. Additionally it could be documented that ex vivo analysed neutrophil functions were partially restored in response to the ω–3 lipid emulsion and differed significantly from the group that received ω–6 lipid infusion.

These data show an accelerated development and maintaining of immune paralysis under ω–6 lipid infusion during sepsis. In contrast, there is a decreased destructive potential in patients infused with ω–3 lipid emulsions during the initial phase of the disease (SIRS) because of a change in metabolized mediators. In addition, there is a partial restoration of a more ”normal“ responsiveness in this group during the late phase of sepsis (CARS), counteracting the development of immune paralysis.

The presented study is – due to the limited number of septic shock patients - clearly insufficient to evaluate possible impact of the ω–3 versus the ω–6 lipid infusions on the clinical course of the disease. However, the two alternative regimens of lipid-based parenteral nutrition exert different influence on key variables of inflammatory mediator generation and neutrophil function, both intimately involved in pathogenetic sequelae of sepsis.

8. LITERATURVERZEICHNIS

1. Friedman, G., Silva, E., and Vincent, J. L.. 1998. Has the mortality of septic shock changed with time. *Crit. Care Med. 26:2078-86*.
2. Wheeler, A. P., and Bernard, G. R.. 1999. Treating patients with severe sepsis. *N. Engl. J. Med. 340:207-14*.
3. Bone, R. C., Grodzin, C. J., and Balk, R. A.. 1997. Sepsis: a new hypothesis for pathogenesis of the disease process. *Chest 112:235-43.*
4. Eisele, B., and Lamy, M.. 1998. Clinical experience with antithrombin III concentrates in critically ill patients with sepsis and multiple organ failure. *Semin. Thromb. Hemostas. 24:71-80*.
5. Martin, G. S., Mannino, D. M., Eaton, S., and Moss, M..2003. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N. Engl. J. Med. 348(16): 1546-54.*
6. Parrillo, J. E., Parker, M. M., Natanson, C., et al.. 1990. Septic shock in humans. Advances in the understanding of pathogenesis, cardiovascular dysfunction, and therapy. *Ann. Intern. Med. 113:227-42.*
7. Niederman, M. S., and Fein, A. M.. 1990. Sepsis syndrome, the adult respiratory distress syndrome, and nosocomial pneumonia. A common clinical sequence. *Clin. Chest Med. 11:633-56*.
8. Bone, R. C.. 1992. Toward an epidemiology and natural history of SIRS (systemic inflammatory response syndrome). *JAMA 268:3452-55.*
9. Bone, R. C., Balk, R. A., Cerra, F. B., Dellinger, R. P., Fein, A. M., Knaus, W. A., Schein, R. M., and Sibbald, W. J.. 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 Physicans/Society of Critical Care Medicine. *Chest 101:1644-55.*
10. Levi et al. 2003. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Crit. Care Med.*
11. Brun-Buisson, C., Doyon, F., Carlet, J., Dellamonica, P., Gouin, F., Lepoutre, A., Mercier, J. C., Offenstadt, G., and Regnier, B.. 1995. Incidence, risk factors, and outcome of severe sepsis and septic shock in adults. A multicenter prospective study in intensive care units. French ICU Group for Severe Sepsis. *JAMA 274:968-74.*
12. Bates, D. W., Sands, K., Miller, E., Lanken, P. N., Hibberd, P. L., Graman, P. S., Schwartz, J. S., Kahn, K., Snydman, D. R., Parsonnet, J., Moore, R., Black, E., Johnson, B. L., Jha, A., and Platt, R.. 1997. Predicting bacteremia in patients with sepsis syndrome.

Academic Medical Center Consortium Sepsis Project Working Group. *J. Infect. Dis. 176:1538-51.*

13. Dinarello, C. A. 1997. Pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines as mediators in the pathogenesis of septic shock. *Chest 112:321S-9S.*
14. Chabot, F., Mitchell, J. A., Gutteridge, J. M. and Evans, T. W.. 1998. Reactive oxygen species in acute lung injury. *Eur. Resp. J. 11:745-57.*
15. Heller, A., Koch, T., Schmeck, J., and van Ackern, K.. 1998. Lipid mediators in inflammatory disorders. *Drugs 55:487-96.*
16. Baker, C. C., and Huynh, M. D.. 1995. Sepsis in the critically ill patient. *Curr. Probl. Surg. 32:1013-83.*
17. Gallagher, H. J., and Daly, J. M.. 1993. Malnutrition, injury, and the host immune response: nutrient substitution. *Curr. Opin. Gen. Surg.:92-104.*
18. van der Poll, T., and van Deventer, S. J. H.. 1999. Cytokines and anticytokines in the pathogenesis of sepsis. *Infect. Dis. Clin. North Am. 13(2):413-26.*
19. Yao, Y. M., Redl, H., Bahrami, S., and Schlag, G.. 1998. The inflammatory basis of trauma/shock-associated multiple organ failure. *Inflamm. Res. 47:201-10.*
20. Bone, R. C.. 1996. Sir Isaac Newton, sepsis, SIRS, and CARS. *Crit. Care Med. 24:1125-8.*
21. Docke, W. D., Randow, F., Syrbe, U., Krausch, D., Asadullah, K., Reinke, P., Volk, H. D., and Kox, W.. 1997. Monocyte deactivation in septic patients: restoration by IFN-gamma treatment. *Nat. Med. 3:678-81.*
22. Kox, W. J., Bone, R. C., Krausch, D., Docke, W. D., Kox, S. N., Wauer, H., Egerer, K., Querner, S., Asadullah, K., von Baehr, R., and Volk, H. D.. 1997. Interferon gamma-1b in the treatment of compensatory anti-inflammatory response syndrome. A new approach: proof of principle. *Arch. Intern. Med. 157:389-93.*
23. Solomkin, J. S., Jenkins, M. K., Nelson, R. D., Chenoweth, D., and Simmons, R. L.. 1981. Neutrophil dysfunction in sepsis. II. Evidence for the role of complement activation products in cellular deactivation. *Surgery 90:319-27.*
24. Solomkin, J. S., Cotta, L. A., Brodt, J. K., Hurst, J. W., and Ogle, C. K.. 1984. Neutrophil dysfunction in sepsis. III. Degranulation as a mechanism for nonspecific deactivation. *J. Surg. Res. 36:407-12.*
25. Sorrell, T. C., Sztelma, K., and May, G. L.. 1994. Circulating polymorphonuclear leukocytes from patients with gram-negative bacteremia are not primed for enhanced production of leukotriene B_4 or 5-hydroxyeicosatetraenoic acid. *J. Infect. Dis. 169:1151-4.*

26. Pascual, C., Karzai, W., Meier-Hellmann, A., Bredle, D. L., and Reinhart, K.. 1997. A controlled study of leukocyte activation in septic patients. *Intensive Care Med. 23:743-8.*
27. Seeger, W., and Suttorp, N.. 1987. Role of membrane lipids in the pulmonary vascular abnormalities caused by bacterial toxins. *Am. Rev. Respir. Dis. 136: 462-6.*
28. MacMicking, J. D., Nathan; C., Hom, G., Chartrain, N., Fletcher, D. S., Trumbauer, M., Stevens, K., Xie, Q. W., Sokol, K., Hutchinson, N, et al.. 1995. Altered responses to bacterial infection and endotoxic shock in mice lacking inducible nitric oxide synthase. *Cell 81:641-50.*
29. Lasch, H. G., and Seeger, W.. 1985. Pathophysiologie der Mikrozirkulation. *Monatsschr. Kinderheilkd. 133:393-9.*
30. Bone, R. C.. 1994. Gram-positive organisms and sepsis. *Arch. Intern. Med. 10:26-34.*
31. Banerjee, S. N., Emori, T. G., Culver, D. H., et al.. 1991. Secular trends in nosocomial primary bloodstream infections in the United States, 1980-1989. *Am. J. Med. 91:86S-89S.*
32. Bone, R. C.. 1994. Sepsis and its complications: the clinical problem. *Crit. Care Med. 22:S8-11.*
33. Geerdes, H. F., Ziegler, D., Lode, H., et al.. 1992. Septicemia in 980 patients at an university hospital in Berlin: prospective studies during 4 selected years between 1979 and 1989. *Clin. Infect. Dis. 15:991-1002.*
34. van Deventer, S. J. H., Buller, H. R., ten Cate, J. W., Sturk, A., and Pauw, W.. 1988. Endotoxaemia: an early predictor of septicaemia in febrile patients. *Lancet I:605-9.*
35. Nakagawara, M., Takeshige, K., Sumimoto, H., Yoshitake, J., and Minakami, S.. 1984. Superoxide release and intracellular free calicum of calcium-depleted human neutrophils stimulated by N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine. *Biochim. Biophys. Acta 805:97-103.*
36. Sklar, L. A., Hyslop, P. A., Oades, Z. G., Oman, G. M., Jesaitis, A. J., Painter, R. G., and Cochrane, C. G.. 1985. Signal transduction and ligand-receptor dynamics in the human neurophil. Transient responses and occupancy-response relations at the formyl peptide receptor. *J. Biol. Chem. 260:11461-7.*
37. Barrowman, M. M., Cockcroft, S., and Gomperts, B. D.. 1986. Two roles of guanine nucleotides in the stimulus-secretion sequence of neutrophils. *Nature 319:504-7.*
38. Kato, I., Morinaga, N., and Muneto, R.. 1988. Non-thiol-activated cytolytic bacterial toxins: current status. *Microbiol. Sci. 5:53-7.*
39. Suttorp, N., and Habben, E.. 1988. Effect of staphylococcal alpha-toxin on intracellular Ca^{2+} in polymorphonuclear leukocytes. *Infect. Immun. 56:2228-34.*

40. Suttorp, N., Seeger, W., Uhl, J., Lutz, F., and Roka, L.. 1985. Pseudomonas aeruginosa cytotoxin stimulates prostacyclin production in cultured pulmonary artery endothelial cells: membrane attack and calcium influx. *J. Cell Physiol. 123:64-72.*
41. Eberspacher, B., Hugo, F., and Bhakdi, S.. 1989. Quantitative study of the binding and hemolytic efficiency of Escherichia coli hemolysin. *Infect. Immun. 57:983-8.*
42. Llewelyn, M., Cohen, J.. 2002. Superantigens: microbial agents that corrupt immunity. *Lancet Infect. Dis. 2:156-62.*
43. Pfeiffer, R.. 1992. Untersuchungen über das Choleragift. *Z. Hyg. 11:393-412.*
44. Rietschel, E. T., Kirikae, T., Schade, F. U., Mamat, U., Schmidt, G., Loppnow, H., Ulmer, A. J., Zahringer, U., Seydel, U., Di Padova, F., Schreier, M., and Brade, H.. 1994. Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function. *FASEB J. 8:217-25.*
45. Galanos, C., Freudenberg, M. A., Katschinski, T., Salomao, R., Mossmann, H., and Kumazawa, Y.. 1992. Tumor necrosis factor and host response to endotoxin. *In*: *Bacterial Endotoxic Lipopolysaccharides, Vol. 1*. D. C. Morrison, J. L. Ryan (eds). CRC Press, Boca Raton, pp. 75-102.
46. Forehand, J. R., Pabst, M. J., Phillips, W. A., and Johnston, R. B. Jr.. 1989. Lipopolysaccharide priming of human neutrophils for an enhanced respiratory burst. Role of intracellular free calcium. *J. Clin. Invest. 83:74-83.*
47. Loppnow, H.. 1994. LPS, recIL1 and smooth muscle cell-IL1 activate vascular cells by specific mechanisms. *In*: *Bacterial Endotoxins: Basic Science to Anti-Sepsis Strategies.* J. Levin, S. J. H. van Deventer, T. van der Poll, A. Sturk (eds). Wiley-Liss, New York, pp. 309-21.
48. Strieter, R. M., Kunkel, S. L., Showell, H. J., Remick, D. G., Phan, S. H., Ward, P. A., and Marks, R. M.. 1989. Endothelial cell gene expression of a neutrophil chemotactic factor by TNF-alpha, LPS, and IL-1 beta. *Science 243:1467-9.*
49. Palma, C., Cassone, A., Serbousek, D., Pearson, C. A., and Djeu, J. Y.. 1992. Lactoferrin release and interleukin-1, interleukin-6 and tumor necrosis factor production by human polymorphonuclear cells stimulated by various lipopolysaccharides: relationship to growth inhibition of Candida albicans. *Infect. Immunol. 60:4604-11.*
50. Haziot, A., Tsuberi, B. Z., and Goyert, S. M.. 1993. Neutrophil CD14: biochemical properties and role in the secretion of tumor necrosis factor-α in response to lipopolysaccharide. *J. Immunol. 150:5556-65.*

51. Mattern, T., Thanhaeuser, A., Reiling, N., Toellner, K. M., Duchrow, M., Kusumoto, S., Rietschel, E. T., Ernst, M., Brade, H., Flad, H. D., and Ulmer, A. J.. 1994. Endotoxin and lipid A stimulate proliferation of human T cells in the presence auf autologous monocytes. *J. Immunol. 153:2996-3004.*
52. Haziot, A., Chen, S., Ferrero, E., Low, M. G., Silber, R., and Goyert, S. M.. 1988. The monocyte differentiation antigen, CD14, is anchored to the cell membrane by phosphatidylinositol linkage. *J. Immunol. 141:547-52.*
53. Lien, E., and Ingalls, R. R.. 2002. Toll-like receptors. *Crit. Care Med. 30:1-11.*
54. Fenton, M. J., and Golenbock, D. T.. 1998. LPS-binding proteins and receptors. *J. Leukoc. Biol. 64:25-32.*
55. Schütt, C., Schilling, T., Grunwald, U., Schönfeld, W., and Krüger, C.. 1992. Endotoxin-neutralizing capacity of soluble CD14. *Res. Immunol. 143:71-8.*
56. Goldstein, I. M.. 1988. Complement: Biologically active products. *In: Inflammation.* J. L. Gallin, I. M. Goldstein, R. Snyderman (eds). New York, Raven Press, pp. 55-74.
57. Hammerschmidt, D. E., Weaver, L. J., Hudson, L. D., Craddock, P. R., and Jacob, H. S.. 1980. Association of complement activation and elevated plasma-C5a with adult respiratory distress syndrome. Pathophysiological relevance and possible prognostic value. *Lancet 1:947-9.*
58. Langlois, P. F., and Gawryl, M. S.. 1988. Accentuated formation of the terminal C5b-9 complement complex in patient plasma precedes development of the adult respiratory distress syndrome. *Am. Rev. Respir. Dis. 138:368-75.*
59. Hänsch, G. M.. 1992. The complement attack phase: control of lysis and non-lethal effects of C5b-9. *Immunopharmacology 24:107-17.*
60. Hänsch, G. M., Seitz, M., and Betz, M.. 1987. Effect of the late complement components C5b-9 on human monocytes: release of prostanoids, oxygen radical and of a factor in inducing cell proliferation. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. 82:317-20.*
61. Schönermark, M., Deppisch, R., Riedasch, G., Rother, K., and Hänsch, G. M.. 1991. Induction of mediator release from human glomerular mesangial cells by the terminal complement components C5b-9. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. 96:331-7.*
62. Seeger, W., Hartmann, R., Neuhof, H., and Bhakdi, S.. 1989. In-situ complement activation, pulmonary hypertension and vascular leakage in rabbit lungs – the role of the terminal complement complex. *Prog. Clin. Biol. Res.. 308:283-9.*

63. Seeger, W., Suttorp, N., Hellwig, A., and Bhakdi, S.. 1986. Noncytolytic terminal complement complexes may serve as calcium gates to elicit leukotriene B_4 generation in human polymorphonuclear leukocytes. *J. Immunol. 137:1286-93.*
64. Betz, M., Seitz, M., and Hänsch, G. M.. 1987. Thromboxane B_2 synthesis in human platelets induced by the late complement components C5b-9. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. 82:313-6.*
65. Niculescu, F., Lang, T., Rus, H., and Shin, M. L.. 1991. G protein activation and diacylglycerol production in JY human B lymphoblastoid cell line treated with sublytic terminal complement complexes. *Complement Inflammation (Abstract) 8:199.*
66. Torbohm, I., Berger, B., Schönermark, M., von Kempis, J., Rother, K., and Hänsch, G. M.. 1989. Modulation of collagen synthesis in human glomerular epithelial cells by interleukin 1. *Clin. Exp. Immunol. 75:427-31.*
67. Klostermann, M., Schöls, M., and Hänsch, G. M.. 1992. Effect of C5b-9 on the release of 72-kDa and 92-kDa gelatinases from human synovial fibroblasts (SFC) in culture. *Immunology (Abstract) 184:433.*
68. Cosio, F. G., and Birmingham, D. J.. 1992. Changes in decay accelerating factor (DAF) and membrane cofactor protein (MCP) mRNA levels in human mesangial cells (HMC) exposed to complement activation products. *Immunobiol. (Abstract) 184:419.*
69. Shin, M. L., Hänsch, G. M., Hu, V. W., and Nicholson-Weller, A.. 1986. Membrane factors responsible for homologous species restriction of complement-mediated lysis: evidence for a factor other than DAF operating at the stage of C8 and C9. *J. Immunol. 136:1777-82.*
70. Hänsch, G. M.. 1988. The homologous species restriction of the complement attack: structure and function of the C8 binding protein. *In: Current Topics in Microbiology and Immunology*. E. Podack (ed). Springer Verlag, Heidelberg, pp. 109-18.
71. Cicala, C., and Cirino, G.. 1998. Linkage between inflammation and coagulation: an update on the molecular basis of the crosstalk. *Life Sci. 62:1817-24.*
72. van Gorp, E. C., Suharti, C., ten Cate, H., et al.. 1999. Review: infectious diseases and coagulation disorders. *J. Infect. Dis. 180:176-86.*
73. Levi, M., van der Poll, T., ten Cate, H., and van Deventer, S. J. H.. 1997. The cytokine-mediated imbalance between coagulant and anticoagulant mechanisms in sepsis and endotoxaemia. *Eur. J. Clin. Invest. 27:3-9.*

74. Colman, R. W., and Schmaier, A. H.. 1997. Contact system: a vascular biology modulator with anticoagulant, profibrinolytic, antiadhesive, and proinflammatory attributes. *Blood 90:3819-43.*
75. Herwald, H., Mörgelin, M., Olsén, A., et al.. 1998. Activation of the contact-phase system on bacterial surfaces - a clue to serious complications in infectious diseases. *Nat. Med. 4:298-302.*
76. Bhoola, K. D., Figueroa, C. D., and Worthy, K.. 1992. Bioregulation of kinins: kallikreins, kininogens, and kininases. *Pharmacol. Rev. 44:1-80.*
77. Levi, M., ten Cate H., van der Poll, T., and van Deventer, S. J. H.. 1993. Pathogenesis of disseminated intravascular coagulation in sepsis. *JAMA 270:975-9.*
78. Taylor, F. B. Jr.. 1993. Role of tissue factor in the coagulant and inflammatory response to LD1000E. coli sepsis and in the early diagnosis of DIC in the baboon. *In*: *DIC: Pathogenesis, Diagnosis and Therapy of disseminated Intravascular Fibrin Formation.* G. Müller-Berghaus, K. Madlener, M. Blomback, et al. (eds). New York, Excerpta Medica, pp 19-32.
79. Camerer, E., Kolstø, A. B., and Prydz, H.. 1996. Cell biology of tissue factor, the principal initiator of blood coagulation. *Thromb. Res. 81:1-41.*
80. Franco, R. F., de Jonge, E., Dekkers, P. E., et al.. 2000. The in vivo kinetics of tissue factor messenger RNA expression during human endotoxemia: relationship with activation of coagulation. *Blood 96:554-9.*
81. Veltrop, M. H., Beekhuizen, H., and Thompson, J.. 1999. Bacterial species- and strain-dependent induction of tissue factor in human vascular endothelial cells. *Infect. Immun. 67:6130-8.*
82. Cunningham, M. A., Romas, P., Hutchinson, P., Holdsworth, S. R., and Tipping, P. G.. 1999. Tissue factor and factor VIIa receptor/ligand interactions induce proinflammatory effects in macrophages. *Blood 94:3413-20.*
83. Vergnolle, N.. 1999. Proteinase-activated receptor-2-activating peptides induce leukocyte rolling, adhesion, and extravasation in vivo. *J. Immunol. 163:5064-9.*
84. Johnson, K., Choi, Y., DeGroot, E., et al.. 1998. Potential mechanisms for a proinflammatory vascular cytokine response to coagulation activation. *J. Immunol. 160:5130-5.*
85. Levi, M., de Jonge, E., van der Poll, T., and ten Cate, H.. 2000. Novel approaches to the management of disseminated intravascular coagulation. *Crit. Care Med. 9:S20-4.*

86. Levi, M., and ten Cate, H.. 1999. Disseminated intravascular coagulation. *N. Engl. J. Med. 341:586-92.*
87. Bick, R. L.. 1998. Disseminated intravascular coagulation: pathophysiological mechanisms and manifestations. *Semin. Thromb. Hemost. 24:3-18.*
88. Altieri, D. C.. 1999. Regulation of leukocyte-endothelium interaction by fibrinogen. *Thromb. Haemost. 82:781-6.*
89. Lee, W. L., and Downey, G. P.. 2000. Coagulation inhibitors in sepsis and disseminated intravascular coagulation. *Intensive Care Med. 26:1701-6.*
90. Foex, B. A., and Shelly, M. P.. 1996. The cytokine response to critical illness. *J. Accid. Emerg. Med. 13:154-62.*
91. Hack, C. E., Aarden, L. A., and Thijis, L. G.. 1997. Role of cytokines in sepsis. *Adv. Immunol. 66:101-95.*
92. Tracey, K. J., and Cerami, A.. 1993. Tumor necrosis factor: an update review of its biology. *Crit. Care Med. 21:S415-22.*
93. Strieter, R. M., Kunkel, S. L., and Bone, R. C. 1993. Role of tumor necrosis factor-alpha in disease states and inflammation. *Crit. Care Med. 21:S447-63.*
94. Beutler, B.. 1989. Cachectin in tissue injury, shock, and related states. *Crit. Care Clin. 5:353-65.*
95. Cannon, J. G., Tompkins, R. G., Gelfand, J. A., Michie, H. R., Stanford, G. G., van der Meer, J. W. M., Endres, S., Lonnemann, G., Corsetti, J., Chernow, B., Wilmore, D. W., Wolff, S. M., Burke, J. F., and Dinarello, C. A.. 1990. Circulating interleukin-1 and tumor necrosis factor in septic shock and experimental endotoxin fever. *J. Infect. Dis. 161:79-84.*
96. Moldawer, L. L.. 1994. Biology of proinflammatory cytokines and their antagonists. *Crit. Care Med. 22:S3-7.*
97. Karima, R., Matsumoto, S., Higashi, H., and Matsushima, K.. 1999. The molecular pathogenesis of endotoxic shock and organ failure. *Mol. Med. Today 123-32.*
98. Bone, R. C.. 1991. The pathogenesis of sepsis. *Ann. Intern. Med. 115:457-69.*
99. Billiau, A., and Vandekerckhove, F.. 1991. Cytokines and their interactions with other inflammatory mediators in the pathogenesis of sepsis and septic shock. *Eur. J. Clin. Invest. 21:559-73.*
100. Nathan, C., and Sporn, M.. 1991. Cytokines in context. *J. Cell Biol. 113:981-6.*
101. Simpson, S. Q., and Casey, L. C.. 1989. Role of tumor necrosis factor in sepsis and acute lung injury. *Crit. Care Clin. 5:27-47.*

102. Shedlofsky, S. I., and McClain, C. J.. 1991. Hepatic dysfunction due to cytokines. *In: Cytokines and inflammation.* E. Kimball (ed.). Boca Raton, F. L., CRC Press., pp. 235-73.

103. Decker, K.. 1998. The response of liver macrophages to inflammatory stimulation. *Keio. J. Med. 47:1-9.*

104. Vadas, P., Browning, J., Edelson, J., and Pruzanski, W.. 1993. Extracellular phospholipase A_2 expression and inflammation: the relationship with associated disease states. *J. Lipid Mediators 8:1-30.*

105. Angel, J., Berenbaum, F., Le Denmat, C., Nevalainen, T., Masliah, J., and Fournier, C.. 1994. Interleukin-1-induced prostaglandin E_2 biosynthesis in human synovial cells involves the activation of cytosolic phospholipase A_2 and cyclooxygenase-2. *Eur. J. Biochem. 226:125-31.*

106. Schalkwijk, C. G., Vervoordeldonk, M., Pfeilschifter, J., and van den Bosch, H.. 1993. Interleukin-1 beta-induced cytosolic phospholipase A_2 activity and protein synthesis is blocked by dexamethasone in rat mesangial cells. *FEBS Lett. 333:339-43.*

107. van Damme, J., Opdenakker, G., Simpson, R. J., Rubira, M. R., Cayphas, S., Vink, A., Billiau, A., and van Snick, J.. 1987. Identification of the human 26-kD protein, interferon $beta_2$ (IFN-$beta_2$), as a B cell hybridoma plasmacytoma growth factor induced by interleukin 1 and tumor necrosis factor. *J. Exp. Med. 165:914-9.*

108. Loppnow, H., and Libby, P.. 1989. Adult human vascular endothelial cells express the IL6 gene differentially in response to LPS or IL 1. *Cell Immunol. 122:493-503.*

109. Djeu, J. Y., Matsushima, K., Oppenheim, J. J., Shiotsuki, K., and Blanchard, D. K.. 1990. Functional activation of human neutrophils by recombinant monocyte-derived neutrophil chemotactic factor/IL-8. *J. Immunol. 144:2205-10.*

110. Hayes, M. P., and Zoon, K. C.. 1993. Priming of human monocytes for enhanced lipopolysaccharide responses: expression of alpha interferon, interferon regulatory factors, and tumor necrosis factor. *Infect. Immun. 61:3222-7.*

111. Kox, W. J., Bone, R. C., Krausch, D., Docke, W. D., Kox, S. N., Wauer, H., Egerer, K., Querner, S., Asadullah, K., von Baehr, R., and Volk, H. D.. 1997. Interferon gamma-1b in the treatment of compensatory anti-inflammatory response syndrome. A new approach: proof of principle. *Arch. Intern. Med. 157:389-93.*

112. Schindler, R., Mancilla, J., Endres, S., Ghorbani, R., Clark, S. C., and Dinarello, C. A.. 1990. Correlations and interactions in the production of interleukin-6 (IL-6), IL-1, and tumor necrosis factor (TNF) in human blood mononuclear cells: IL-6 suppresses IL-1 and TNF. *Blood 75:40-7.*

113. Chernoff, A. E., Granowitz, E. V., Shapiro, L., Vannier, E., Lonnemann, G., Angel, J. B., Kennedy, J. S., Rabson, A. R., Wolff, S. M., and Dinorello, C. A.. 1995. A randomized, controlled trial of IL-10 in humans. Inhibition of inflammatory cytokine production and immune responses. *J. Immunol. 154:5492-9.*

114. Kawai, S., Sakayori, S., and Kobayashi, H.. 1995. The role of IL-10 in patients with SIRS (systemic inflammatory response syndrome) – in relation to TNF activity. *Kansenshogaku Zasshi 69:765-71.*

115. Gerard, C., Bruyns, C., Marchant, A., Abramowicz., D., Vandenabeele, P., Delvaux, A., Fiers, W., Goldman, M., and Velu, T.. 1993. Interleukin 10 reduces the release of tumor necrosis factor and prevents lethality in experimental endotoxemia. *J. Exp. Med. 177:547-50.*

116. de Waal Malefyt, R., Abrams, J., Bennett, B., Figdor, C. G., and de Vries, J. E.. 1991. Interleukin (IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J. Exp. Med. 174:1209-20.*

117. Smith, J. A. 1994. Neutrophils, host defense, and inflammation: a double-edged sword. *J. Leukoc. Biol. 56:672-86.*

118. Weiss, S. J.. 1989. Tissue destruction by neutrophils. *N. Engl. J. Med. 320:365-76.*

119. Bevilacqua, M. P., and Neslon, R. M.. 1993. Selectins. *J. Clin. Invest. 91:379-87.*

120. Kishimoto, T. K., Jutila, M. A., Berg, E. L., and Butcher, E. C.. 1989. Neutrophil Mac-1 and MEL-14 adhesion proteins inversely regulated by chemotactic factors. *Science 245:1238-41.*

121. Gardiner, E. E., De Luca, M., McNally, T., Michelson, A. D., Andrews, R. K., and Berndt, M. C.. 2001. Regulation of P-selectin binding to the neutrophil P-selectin counter-receptor P-selectin glycoprotein ligand-1 by neutrophil elastase and cathepsin G. *Blood 98:1440-7.*

122. Roldan, V., Marin, F., Lip, G. Y., and Blann, A. D.. 2003. Soluble E-selectin in cardiovascular disease and its risk factors. A review of the literature. *Thromb. Haemost. 90:1007-20.*

123. Hynes, R. O.. 1992. Integrins: versatility, modulation and signaling in cell adhesion. *Cell 69:11-25.*

124. de Fougerolles, A. R., Stacker, S. A., Schwarting, R., and Springer, T. A.. 1991. Characterization of ICAM-2 and evidence for a third counter-receptor for LFA-1. *J. Exp. Med. 174:253-67.*

125. Lawrence, M. B., and Springer, T. A.. 1991. Leukocytes roll on a selectin at physiologic flow rates: distinction from and prerequisite for adhesion through integrins. *Cell 65:859-73.*

126. Shanley, T. P., Warner, R. L., and Ward, P. A.. 1995. The role of cytokines and adhesion molecules in the development of inflammatory injury. *Mol. Med. Today 1:40-5.*

127. Zigmond, S. H.. 1978. Chemotaxis by polymorphonuclear leukocytes. *J. Cell Biol. 77:269-87.*

128. Della Bianca, V., Grzeskowiak, M., and Rossi, F.. 1990. Studies on molecular regulation of phagozytosis and activation of the NADPH oxidase in neutrophils. IgG- and C3b-mediated ingestion and associated respiratory burst independent of phopholipid turnover and Ca^{2+} transients. *J. Immun. 144:1411-7.*

129. Henricks, P. A., Van der Tol, M. E., and Verhoef, J.. 1986. Production of leukotriene B_4 by polymorphonuclear leukocytes during phagocytosis of Staphylococcous aureus. *Agents Actions 17:388-9.*

130. Sandborg, R. R., and Smolen, J. E.. 1988. Early biochemical events in leukocyte activation. *Lab. Invest. 59:300-20.*

131. Smith, G. P., and Peters, T. J.. 1982. The release of granule components from human polymorphonuclear leukocytes in response to both phagocytic and chemical stimuli. *Biochim. Biophys. Acta 719:304-8.*

132. Bretz, U., and Baggiolini, M.. 1974. Biochemical and morphological characterization of azurophil and specific granules of human neutrophilic polymorphonuclear leukocytes. *J. Cell Biol. 63:251-6.*

133. Bainton, D. F.. 1993. Neutrophilic leukocyte granules: from structure to function. *Adv. Exp. Med. Biol. 336:17-33.*

134. Borregaard, N., Lollike, K., Kjeldsen, L., Sengelov, H., Nielsen, M. H., and Bainton, D. F.. 1993. Human neutrophil granules and secretory vesicles. *Eur. J. Haematol. 51:187-98.*

135. Elsbach, P., and Weiss, J.. 1993. The bactericidal/permeability increasing protein, a potent element in host defense against gram-negative bacteria and lipopolysaccharide. *Immunobiology 187:417-29.*

136. Carrell, R. W.. 1986. $alpha_1$-Antitrypsin: molecular pathology, leukocytes, and tissue damage. *J. Clin. Invest. 78:1427-31.*

137. Molloy, A. L., and Winerbourn, C. C.. 1990. Release of iron from phagocytosed Escherichia coli and uptake by neutrophil lactoferrin. *Blood 75:984-9.*

138. Bainton, D. F., Miller, L. J., Kishimoto, T. K., and Springer, T. A.. 1987. Leukocyte adhesion receptors are stored in peroxidase-negative granules of human neutrophils. *J. Exp. Med. 166:1641-53.*

139. Petrequin, P. R., Todd, R. F. III, Devall, L. J., Boxer, L. A., and Curnutte, J. T. III. 1987. Association between gelatinase release and increased plasma membrane expression of the Mo 1 glycoprotein. *Blood 69:605-10.*

140. Kjeldsen, L., Bjerrum, O. W., Askaa, J., and Borregaard, N.. 1992. Subcellular localization and release of human neutrophil gelatinase, confirming the existence of separate gelatinase-containing granules. *Biochem. J. 287:603-10.*

141. Baldrige, C. W., and Gerhard, R. W.. 1933. The extra respiration of phagocytosis. *Am. J. Physiol. 103:235-6.*

142. Babior, B. M.. 1984. The respiratory burst of phagocytes. *J. Clin. Invest. 73:599-604.*

143. Rotrosen, D., Yeung, C. L., Leto, T. L., Malech, H. L., and Kwong, C. H.. 1992. Cytochrome b558: the flavin-binding component of the phagocyte NADPH oxidase. *Science 256:1459-62.*

144. Thelen, M., Dewald, B., and Baggiolini, M.. 1993. Neutrophil signal transduction and activation of the respiratory burst. *Physiol. Rev. 73:797-821.*

145. Brigham, K. L.. 1986. Role of free radicals in lung injury. *Chest 89:859-63.*

146. Omann, G. M., Allen, R. A., Bokoch, G. M., Painter, R. G., Traynor, A. E., and Sklar, L. A.. 1987. Signal transduction and cytoskeletal activation in the neutrophil. *Physiol. Rev. 67:285-322.*

147. O`Flaherty, J. T.. 1987. Phospholipid metabolism and stimulus-response coupling. *Biochem. Pharmacol.* 36:407-12.

148. Lands, W. E. M., and Samuelsson, B.. 1968. Phospholipid precursors of prostaglandins. *Biochim. Biophys. Acta 164:426-9.*

149. Swendsen, C. L., Chilton, F. H., O`Flaherty, J. T., Sulies, J. R., Piantadosi, C., Waite, M., and Wykle, R. L.. 1987. Human neutrophils incorporate arachidonic acid and saturated fatty acids into separate molecular species of phospholipids. *Biochim. Biophys. Acta 919:79-89.*

150. Nakagawa, Y., Kurihara, K., Sugiura, T., and Waku, K.. 1985. Heterogeneity in the metabolism of the arachidonoyl molecular species of glycerophospholipids of rabbit alveolar macrophages. The interrelationship between metabolic activities and chemical structures of the arachidonoyl molecular species. *Eur. J. Biochem. 153:263-8.*

151. Meade, C. J., Turner, G. A., and Bateman, P. E.. 1986. The role of polyphosphoinositides and their breakdown products in A23187-induced release of arachidonic acid from rabbit polymorphonuclear leukocytes. *Biochem. J. 238:425-36.*

152. Ochi, K. T., Yoshimoto, S., Yamamoto, K., Taniguchi, K., and Miyamoto, T.. 1983. Arachidonate 5-lipoxygenase of guinea pig peritoneal polymorphonuclear leukocytes. Acitvation by adenosine 5`-triphosphate. *J. Biol. Chem. 258:5754-8.*

153. Rouzer, C. A., and Kargman, S.. 1988. Translocation of 5-lipoxygenase to the membrane in human leukocytes challenged with ionophore A23187. *J. Biol. Chem. 263:10980-8.*

154. Wong, G. J., Hwang, S. M., Cook, M. N. Hogaboom, G. K., and Crooke, S. T.. 1988. Interactions of 5-lipoxygenase with membranes: studies on the association of soluble enzyme with membranes and alterations in enzyme activity. *Biochemistry 27:6763-9.*

155. Dixon, R. A., Diehl, R. E., Opas, E., Rands, E., Vickers, P. J., Evans, J. F., Gillard, J. W., and Miller, D. K.. 1990. Requirement of a 5-lipoxygenase-activating protein for leukotriene synthesis. *Nature 343:282-4.*

156. Borgeat, P., and Samuelsson, B.. 1979. Arachidonic acid metabolism in polymorphonuclear leukocytes: unstable intermediate in formation of dihydroxy acids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76:3213-7.*

157. Stenson, W. F., and Parker, C. W.. 1979. Metabolism of arachidonic acid in ionophore-stimulated neutrophils. Esterification of a hydroxylated metabolite into phospholipids. *J. Clin. Invest. 64:1457-65.*

158. Malle, E., Leis, H. J., Karadi, I., and Kostner, G. M.. 1987. Lipoxygenases and hydroperoxy/hydroxy-eicosatetraenoic acid formation. *Int. J. Biochem. 19:1013-22.*

159. O`Flaherty, J. T.. 1985. Neutrophil degranulation: Evidence pertaining to its mediation by the combined effects of leukotriene B_4, platelet-activating factor, and 5-HETE. *J. Cell. Physiol. 122:229-39.*

160. Hammarström, S.. 1983. Leukotrienes. *Ann. Rev. Biochem. 52:355-77.*

161. Ford-Hutchinson, A. W.. 1985. Leukotrienes: their formation and role as inflammatory mediators. *Fed. Proc. 44:25-9.*

162. Ford-Hutchinson, A. W.. 1990. Leukotriene B_4 in inflammation. *Crit. Rev. Immunol. 10:1-12.*

163. Palmblad, J. E., and Lerner, R. 1992. Leukotriene B_4-induced hyperadhesiveness of endothelial cells for neutrophils: relation to CD54. *Clin. Exp. Immunol. 90:300-4.*

164. Henderson, W. R. Jr.. 1994. The role of leukotrienes in inflammation. *Ann. Intern. Med. 121:684-97.*

165. Palmer, R. M., Stepney, R. J., Higgs, G. A., and Eakins, K. E.. 1980. Chemokinetic activity of arachidonic and lipoxygenase products on leukocytes of different species. *Prostaglandins 20:411-8.*

166. McDonald, P. P, McColl, S. R., Braquet, P., and Borgeat, P.. 1993. Autocrine enhancement of leukotriene synthesis by endogenous leukotriene B_4 and platelet-activating factor in human neutrophils. *Br. J. Pharmacol. 111 (3):852-60.*

167. Hatzelmann, A., Fruchtmann, R., Mohrs, K. H., Raddatz, S., and Müller-Peddinghaus, R.. 1994. Ca^{2+} ionophore A23187-stimulated secretion of azurophil granules in human polymorphonuclear leukocytes is largely mediated by endogenously formed leukotriene B_4. *Biochem. Pharmacol. 48 (1):31-9.*

168. Zhou, H. L., Chabot-Fletcher, M., Foley, J. J., Sarau, H. M., Tzimas, M. N., Winkler, J. D., and Torphy, T. J.. 1993. Association between leukotriene B_4-induced phospholipase D activation and degranulation of human neutrophils. *Biochem. Pharmacol. 46:139-48.*

169. Brach, M. A., de Vos, S., Arnold, C. Gruss, H. J., Mertelsmann, R., and Herrmann, F.. 1992. Leukotriene B_4 transcriptionally activates interleukin-6 expression involving NF-κB and NF-IL6. *Eur. J. Immunol. 22:2705-11.*

170. Rola-Pleszczynski, M., Chavaillaz, P. A., and Lemaire, I.. 1986. Stimulation of interleukin 2 and interferon gamma production by leukotriene B_4 in human lymphocyte cultures. *Prostaglandins Leukot. Med. 23:207-10.*

171. Stankova, J., and Rola-Pleszczynski, M.. 1992. Leukotriene B_4 stimulates c-fos and c-jun gene transcription and AP-1 binding activity in human monocytes. *Biochem. J. 282:625-9.*

172. Rola-Pleszczynski, M., Bouvrette, L., Gingras, D., and Girard, M.. 1987. Identification of interferon-gamma as the lymphokine that mediates leukotriene B_4-induced immunoregulation. *J. Immunol. 139:513-7.*

173. Brom, J., König, W., Stüning, M., Raulf, M., and Köller, M.. 1987. Characterization of leukotriene B_4-omega-hydroxylase activity within human polymorphonuclear granulocytes. *Scand. J. Immunol. 25:283-94.*

174. Penrose, J. F., Gagnon, L., Goppelt-Struebe, M., Myers, P., Lam, B. K., Jack, R. M., Austen, K. F., and Soberman, R. J.. 1992. Purification of human leukotriene C_4 synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1992. 89:11603-6.*

175. Kuo, C. G., Lewis, M. T., and Jakschik, B. A.. 1984. Leukotriene D_4 and E_4 formation by plasma membrane bound enzymes. *Prostaglandins 28:929-38.*

176. Joris, I., Majno, G. Corey, E. J., and Lewis, R. A.. 1987. The mechanism of vascular leakage induced by leukotriene E_4. Endothelial contraction.. *Am. J. Pathol. 126:19-24.*

177. Maclouf, J., Sala, A., Rossoni, G., Berti, F., Müller-Peddinghaus, R., and Folco, G.. 1996. Consequences of transcellular biosynthesis of leukotriene C_4 on organ function. *Haemostasis 26:28-36.*

178. Örning, L., Keppler, A., Midtvedt, R., and Hammarström, S.. 1988. In vivo formation of omega-oxidized metabolites of leukotriene C_4 in the rat. *Prostaglandins 35:493-501.*

179. Samuelsson, B., Dahlen, S. E., Lindgren, J. A., Rouzer, C. A., and Serhan, C. N.. 1987. Leukotrienes and lipoxins: structures, biosynthesis, and biological effects. *Science 237:1171-6.*

180. Henson, P. M.. 1970. Release of vasoactive amines from rabbit platelets induced by sensitized mononuclear leukocytes and antigen. *J. Exp. Med. 131:287-306.*

181. Demopoulos, C. A., Pinckard, R. N., and Hanahan, D. J.. 1979. Platelet-activating factor. Evidence for 1-O-alkyl-2-acetyl-sn-glyeryl-3-phosphorylcholine as the active component (a new class of lipid chemical mediators). *J. Biol. Chem. 254:9355-8.*

182. Müller, H. W., O`Flaherty, J. T., and Wykle, R. L.. 1983. Biosynthesis of platelet activating factor in rabbit polymorphonuclear neutrophils. *J. Biol. Chem. 258:6213-8.*

183. Whatley, R. E., Zimmerman, G. A., McIntyre, T. M., and Prescott, S. M.. 1988. Endothelium from diverse vascular sources synthesizes platelet-activating factor. *Arteriosclerosis 8:321-31.*

184. Camussi, G., Aglietta, M., Coda, R., Bussolino, F., Piacibello, W., and Tetta, C.. 1981. Release of platelet-activating factor (PAF) and histamine. II. The cellular origin of human PAF: monocytes, polymorphonuclear neutrophils and basophils. *Immunology 42:191-9.*

185. Chilton, F. H., O`Flathery, J. T., Walsh, C. E. Thomas, M. J., Wykle, R. L., DeChatelet, L. R., and Waite, B. M.. 1982. Platelet activating factor. Stimulation of the lipoxygenase pathway in polymorphonuclear leukocytes by 1-O-alkyl-2-O-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine. *J. Biol. Chem. 257:5402-7.*

186. Bolin, R. W., Martin, T. R., and Albert, R. K.. 1987. Lung endothelial and epithelial permeability after platelet-activating factor. *J. Appl. Physiol. 63:1770-5.*

187. Warren, J. S., Mandel, D. M., Johnson, K. J., and Ward, P. A.. 1989. Evidence for the role of platelet-activating factor in immune complex vasculitis in the rat. *J. Clin. Invest. 83:669-78.*

188. Smith, R. J., Bowman, B. J., and Iden, S. S.. 1984. Stimulation of the human neutrophil superoxide anion-generating system with 1-O-hexadecyl/octadecyl-2-acetyl-sn-glyceryl-3-phosphorylcholine. *Biochem. Pharmacol. 33:973-8.*

189. Zimmerman, G. A., Elstad, M. R., Lorant, D. E., McIntyre, T. M., Prescott, S. M., Topham, M. K., Weyrich, A. S., and Whatley, R. E.. 1996. Platelet-activating factor (PAF): signalling and adhesion in cell-cell interactions. *Adv. Exp. Med. Biol. 416:297-304.*

190. Hamasaki, Y., Mojarad, M., Saga, T., Tai, H. H., and Said, S. I.. 1984. Platelet-activating factor raises airway and vascular pressures and induces edema in lungs perfused with platelet-free solution. *Am. Rev. Respir. Dis. 129:742-6.*

191. Vargaftig, B. B., Lefort, J., Chignard, M. and Benveniste, J.. 1980. Platelet-activating factor induces a platelet-dependent bronchoconstriction unrelated to the formation of prostaglandin derivatives. *Eur. J. Pharma. 65:185-92*.

192. Lew, D. P.. 1989. Receptor signalling and intracellular calcium in neutrophil activation. *Eur. J. Clin. Invest. 19:338-46.*

193. Cassel, D., and Selinger, Z.. 1978. Mechanism of adenylate cyclase activation through the beta-adrenergic receptor: catecholamine-induced displacement of bound GDP by GTP. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75:4155-9.*

194. Freissmuth, M., Casey, P. J., and Gilman, A. G.. 1989. G proteins control diverse pathways of transmembrane signaling. *FASEB J. 3:2125-31.*

195. Rhee, S. G., and Choi, K. D.. 1992. Multiple forms of phospholipase C isozymes and their activation mechanisms. *In*: *Advances in second messenger and phosphoprotein research.* J. W. Putney, Jr. (ed.). New York: Raven Press. Volume Twenty-Six, pp 35-61.

196. Berridge, M. J.. 1987. Inositol triphosphate and diacylglycerol: two interacting second messengers. *Annu. Rev. Biochem. 56:159-93.*

197. Nakagawa, Y., Kurihara, K., Sugiura, T., and Waku, K.. 1986. Relative degradation of different arachidonoyl molecular species of choline glycerophospholipids in opsonized zymosan-stimulated rabbit alveolar macrophages. *Biochim. Biophys. Acta 876:601-10.*

198. Cockcroft, S., and Allan, D.. 1984. The fatty acid composition of phosphatidylinositol, phospatidate and 1,2-diacylglycerol in stimulated human neutrophils. *Biochem. J. 222:557-9.*

199. Majerus, P. W., Connolly, T. M., Deckmyn, H., Ross, T. S., Bross, T. E., Ishi, H., Bansal, V. S., and Wilson, D. B.. 1986. The metabolism of phosphoinositide-derived messenger molecules. *Science 234:1519-26.*

200. Hallcher, L. M., and Sherman, W. R.. 1980. The effects of lithium ion and other agents on the activity of myo-inositol-1-phosphatase from bovine brain. *J. Biol. Chem. 255:10896-901.*

201. Irvine, R. F., Letcher, A. J., Heslop, J. P., and Berridge, M. J.. 1986. The inositol tris/tetrakisphosphate pathway – demonstration of Ins(1,4,5)P 3-kinase activity in animal tissues. *Nature 320:6321-4.*

202. Downes, C. P., Hawkins, P. T., and Irvine, R. F.. 1986. Inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate and not phosphatidylinositol 3,4-bisphosphate is the probable precursor of inositol 1,3,4-trisphosphate in agonist-stimulated parotid gland. *Biochem. J. 238:501-6.*

203. Alkon, D. L., and Rasmussen, H.. 1988. A spatial-temporal model of cell activation. *Science 239:998-1002.*

204. Berridge, M. J.. 1993. Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature 361:315-25.*

205. Kikkawa, U., and Nishizuka, Y.. 1986. The role of protein kinase C in transmembrane signalling. *Annu. Rev. Cell Biol. 2:149-78.*

206. Wolf, M., LeVine, H. III, May, W. S. Jr., Cuatrecasas, P., and Sahyoun, N.. 1985. A model for intracellular translocation of protein kinase C involving synergism between Ca^{2+} and phorbol esters. *Nature 317:546-50.*

207. Papini, E., Grzeskowiak, M., Bellavite, P., and Rossi, F.. 1985. Protein kinase C phosphorylates a component of NADPH oxidase of neutrophils. *FEBS Lett. 190:204-8.*

208. Biden, T. J., and Wollheim, C. B.. 1986. Ca^{2+} regulates the inositol tris/tetrakis-phosphate pathway in intact and broken preparations of insulin-sectreting RINm5F cells. *J. Biol. Chem. 261:11931-4.*

209. Kurzrok, R., and Lieb, C.. 1930. Biochemical studies of human semen. II. The action of semen on the human uterus. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 28:286.*

210. Goldblatt, M. W.. 1935. Properties of human seminal fluid. *J. Physiol. 84:208.*

211. von Euler, U. S.. 1936. On the specific vasodilating and plain muscle stimulating substance from accessory genital glands in man and certain animals (prostaglandin and vesiglandin). *J. Physiol. 88:213.*

212. Bergstrom, S. Dressler, F. Krabisch, L. et al.. 1962. Isolation and structure of a smooth muscle stimulating factor in normal sheep and pig lungs. *Arkiv. Kemi. 20:63.*

213. Bergstrom, S., Dressler, F., Krabisch, L. et al..1962. The isolation of two further prostaglandins from sheep prostate glands. *Arkiv. Kemi. 19:563.*

214. Bergstrom, S., Danielsson, H., et al.. 1964. The enzymatic formation of prostaglandin E_2 from arachidonic acid prostaglandins and related factors 32. *Biochim. Biophys. Acta 90:207.*

215. Calder, P. C.. 1997. N-3 polyunsaturated fatty acids and immune cell function. *Adv. Enzyme Regul. 37:197-237.*

216. Rollins, T. E., and Smith, W. L.. 1980. Subcellular localization of prostaglandin-forming cyclooxygenase in Swiss mouse 3T3 fibroblasts by electron microscopic immunocytochemistry. *J. Biol. Chem. 255:4872-5.*

217. Needleman, P., Turk, J., Jakschik, B. A., Morrison, A. R., and Lefkowith, J. B.. 1986. Arachidonic acid metabolism. *Annu. Rev. Biochem. 55:69-102.*

218. Seeger, W., Bauer, M., and Bhakdi, S.. 1984. Staphylococcal alpha-toxin elicits hypertension in isolated rabbit lungs. Evidence for thromboxane formation and the role of extracellular calcium. *J. Clin. Invest. 74:849-58.*

219. Eisenhut, T., Sinha, B., Gröttrup-Wolfers, E., Semmler, J., Siess, W., and Endres, S.. 1993. Prostacyclin analogs suppress the synthesis of tumor necrosis factor-alpha in LPS-stimulated human peripheral blood mononuclear cells. *Immunopharmacology 26:259-64.*

220. Andersen, N. H., Hartzell, C. J., and De, B.. 1985. Chemistry and structure of cyclooxygenase-derived eicosanoids; a historical perspective. *Adv. Prostaglandin Thromboxan Leukot. Res. 14:1-44.*

221. Dahinden, C. A., Clancy, R. M., Gross, M., Chiller, J. M., and Hugli, T. E.. 1985. Leukotriene C_4 production by murine mast cells: evidence of a role for extracellular leukotriene A_4. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:6632-7.*

222. Grimminger, F., Becker, G., and Seeger, W.. 1988. High yield enzymatic conversion of intravascular leukotriene A_4 in blood-free perfused lungs. *J. Immunol. 141:2431-6.*

223. Grimminger, F., Menger, M., Becker, G., and Seeger, W.. 1988. Potentiation of leukotriene production following sequestration of neutrophils in isolated lungs: indirect evidence for intercellular leukotriene A_4 transfer. *Blood 72:1687-92.*

224. Grimminger, F., Kreusler, B., Schneider, U., Becker, G., and Seeger, W.. 1990. Influence of microvascular adherence on neutrophil leukotriene generation. Evidence for cooperative eicosanoid synthesis. *J. Immunol. 144:1866-72.*

225. Feinmark, S. J.. 1992. The role of the endothelial cell in leukotriene biosynthesis. *Am. Rev. Respir. Dis. 146:S51-5.*

226. Figard, P. H., Hejlik, D. P., Kaduce, T. L., Stoll, L. L., and Spector, A. A.. 1986. Free fatty acid release from endothelial cells. *J. Lipid Res. 27:771-9.*

227. Rankin, J. A., Schrader, C. E., Smith, S. M., and Lewis, R. A.. 1989. Recombinant interferon-gamma primes alveolar macrophages cultured in vitro for the release of leukotriene B_4 in response to IgG stimulation. *J. Clin. Invest. 88:1691-1700.*

228. Grimminger, F., Sibelius, U., and Seeger, W.. 1991. Amplification of LTB_4 generation in AM-PMN cocultures: transcellular 5-lipoxygenase metabolism. *Am. J. Physiol. 261:L195-203.*

229. Simopoulos A. P. 1995. Evolutionary aspects of diet: fatty acid, insulin resistance and obesitiy. *In: Obesitiy: new directions in assessment and management.* T. B. Vanitallie, A. P. Simopoulos (eds.). Charles Press, Philadelphia, pp. 241-261.

230. Report of the National Cholesterol Education Program Expert Panel on detection, evaluation and treatment of high blood cholesterol in adults. 1988. *Arch. Intern. Med. 148:36-69.*

231. Calder, P. C.. 1998. Immunregulatory and anti-inflammatory effects of n-3 polyunsaturated fatty acids. *Braz. J. Med. Biol. Res. 31:467-90.*

232. Bang, H. O., Dyerberg, J., and Nielsen, A. B.. 1971. Plasma lipid and lipoprotein pattern in Greenlandic West-coast Eskimos. *Lancet 1:1143-5.*

233. Dyerberg, J., and Bang, H. O.. 1979. Haemostatic function and platelet polyunsaturated fatty acids in Eskimos. *Lancet 2:433-5.*

234. Dyerberg, J., Bang, H. O., Stoffersen, E., Moncada, S., and Vane, J. R.. 1978. Eicosapentaenoic acid and prevention of thrombosis and atherosclerosis? *Lancet 2:117-9.*

235. Bang, H. O., Dyerberg, J., and Hjoorne, N.. 1976. The composition of food consumed by Greenland Eskimos. *Acta Med. Scand. 200:69-73.*

236. Endres, S., Meydani, S. N., Ghorbani, R., Schindler, R., and Dinarello, C. A.. 1993. Dietary supplementation with n-3 fatty acids suppresses interleukin-2 production and mononuclear cell proliferation. *J. Leukoc. Biol. 54:599-603.*

237. Meydani, S. N., Lichtenstein, A. H., Cornwall, S., Meydani, M., Goldin, B. R., Rasmussen, H., Dinarello, C. A., and Schaefer, E. J.. 1993. Immunologic effects of national cholesterol education panel step-2 diets with and without fish-derived N-3 fatty acid enrichment. *J. Clin. Invest. 92:105-13.*

238. Caughey, G. E., Mantzioris, E., Gibson, R. A., Cleland, L. G., and James, M. J.. 1996. The effect on human tumor necrosis factor alpha and interleukin 1 beta production of diets enriched in n-3 fatty acids from vegetable oil or fish oil. *Am. J. Clin. Nutr. 63:116-22.*

239. Tappia, P. S., Man, W. J., and Grimble, R. F.. 1995. Influence of unsaturated fatty acids on the production of tumor necrosis factor and interleukin-6 by rat peritoneal macrophages. *Mol. Cell Biochem. 143:89-98.*

240. Camandola, S., Leonarduzzi, G., Musso, T., Varesio, L., Carini, R., Scavazza, A., Chiarpotto, E., Baeuerle, P. A., and Poli, G.. 1996. Nuclear factor κB is activated by arachidonic acid but not by eicosapentaenoic acid. *Biochem. Biophys. Res. Commun. 229:643-7.*

241. Weber, C., and Springer, T. A.. 1998. Interaction of very late antigen-4 with VCAM-1 supports transendothelial chemotaxis of monocytes by facilitating lateral migration. *J. Immunol. 161:6825-34.*

242. De Caterina, R., Liao, J. K., and Libby, P.. 2000. Fatty acid modulation of endothelial activation. *Am. J. Clin. Nutr. 71:213S-223S.*

243. Heller, A., Koch, T., Schmeck, J., and van Ackern, K.. 1998. Lipid mediators in inflammatory disorders. *Drugs 55:487-96.*

244. Mayer K., Seeger, W., and Grimminger, F.. 1998. Clinical use of lipids to control inflammatory disease. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care. 1:179-84.*

245. Subbaiah, P. V., Kaufman, D., and Bagdade, J. D.. 1993. Incorporation of dietary n-3 fatty acids into molecular species of phosphatidyl choline and cholesteryl ester in normal human plasma. *Am. J. Clin. Nutr. 58:3360-8.*

246. Lee, T. H., Mencia-Huerta, J. M., Shih, C., Corey, E. J., Lewis, R. A:, and Austen, K. F.. 1984. Characterization and biologic properties of 5,12-dihydroxy derivatives of eicosapentaenoic acid, including leukotriene B_5 and the double lipoxygenase product. *J. Biol. Chem. 259:2383-9.*

247. Kragballe, K., Voorhees, J. J., and Goetzl, E. J.. 1987. Inhibition by leucotriene B_5 of leucotriene B_4-induced activation of human keratinocytes and neutrophils. *J. Invest. Dermatol. 88:555-8.*

248. Kraemer, H. J., Stevens, J., Grimminger, F., and Seeger, W.. 1996. Fish oil fatty acids and human platelets: dose-dependent decrease in dienoic and increase in trienoic thromboxane generation. *Biochem. Pharmacol. 52:1211-7.*

249. Bazzarre, T. L., and Clark, J.. 2001. Summary of the scientific conference on dietary fatty acids and cardiovascular health: conference summary from the nutrition committee of the American Heart Association. *Circulation 103:1034-9.*

250. Fisher, M., Upchurch, K. S., Levine, P. H., Johnson, M. H., Vaudreuil, C. H., Natale, A., and Hoogasian, J. J.. 1986. Effects of dietary fish oil supplementation on polymorphonuclear leukocyte inflammatory potential. *Inflammation 10: 387-92.*

251. Sperling, R. I., Benincaso, A. I., Knoell, C. T., Larkin, J. K., Austen, K. F., and Robinson, D. R.. 1993. Dietary omega-3 polyunsaturated fatty acids inhibit phosphoinositide formation and chemotaxis in neutrophils. *J. Clin. Invest. 91:651-60.*

252. Halvorsen, D. S., Hansen, J. B., Grimsgaard, S., Bonaa, K. H., Kierulf, P., and Nordoy, A.. 1997. The effect of highly purified eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids on monocyte phagocytosis in man. *Lipids 32:935-42.*

253. May, C. L., Southworth, A. J., and Calder, P. C.. 1993. Inhibition of lymphocyte protein kinase C by unsaturated fatty acids. *Biochem. Biophys. Res. Comm. 195:823-8.*

254. Terano, T., Shiina, T., and Tamura, Y.. 1996. Eicosapentaenoic acid suppressed the proliferation of vascular smooth muscle cells through modulation of various steps of growth signals. *Lipids 31:S301-4.*

255. Peterson, J., Bihain, B. E., Bengtsson-Olivecrona, G., Deckelbaum, R. J., Carpentier, Y. A., and Olivecrona, T.. 1990. Fatty acid control of lipoprotein lipase: a link between energy metabolism and lipid transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:909-13.*

256. Grimminger, F., Führer, D., Papavassilis, C., Schlotzer, E., Mayer, K., Heuer, K. U., Kiss., L., Walmrath, D., Piberhofer, S., Lübbecke, F., Krämer, H. J., Stevens, J., Schütterle, G., and Seeger, W.. 1993. Influence of intravenous n-3 lipid supplementation on fatty acid profiles and lipid mediator generation in a patient with severe ulcerative colitis. *Eur. J. Clin. Invest. 23:706-15.*

257. Grimminger, F., Wahn, H., Mayer, K., Kiss, L., Walmrath, D., and Seeger, W.. 1997. Impact of arachidonic versus eicosapentaenoic acid on exotonin-induced lung vascular leakage: relation to 4-series versus 5-series leukotriene generation. *Am. J. Respir. Crit. Care Med. 155:513-9.*

258. Mancuso, P., Whelan, J., DeMichele, S. J., Snider, C. C., Guszcza, J. A., and Karlstad, M. C.. 1997. Dietary fish oil and fish and borage oil suppress intrapulmonary proinflammatory eicosanoid biosynthesis and attenuate pulmonary neutrophil acccumulation in endotoxic rats. *Crit. Care Med. 25:1198-206.*

259. Sane, S., Baba, M., Kusano, C., Shirao, K., Andoh, T., Kamada, T., and Aikou, T.. 2000. Eicosapentaenoic acid reduces pulmonary edema in endotoxemic rats. *J. Surg. Res. 93:21-7.*

260. Gadek, J. E., DeMichele, S. J., Karlstad, M. D., Pacht, E. R., Donahoe, M., Albertson, T. E., Van Hoozen, C., Wennberg, A. K., Nelson, J. L., and Noursalehi M. and the Enteral Nutrition in ARDS Study Group. 1999. Effect of enteral feeding with eicosapentaenoic acid, gamma-linolenic acid, and antioxidants in patients with acute respiratory distress syndrome. *Crit. Care Med. 27:1409-20.*

261. Knaus, W. A., Draper, E. A., Wagner, D. P., and Zimmermann, J. E.. 1985. APACHE II: a severity of disease classification system. *Crit. Care Med. 13(10): 818-29.*

262. Hjorth, R., Jonsson, A. K., and Vretblad, P.. 1981. A rapid method for purification of human granulocytes using percoll. A comparison with dextran sedimentation. *J. Immunol. Methods 43:95-101.*

263. Kramps, J. A., van Twisk, C., and van der Linden, A. C.. 1983. L-Pyroglutamyl-L-propyl-L-valine-p-nitroanilide, a highly specific substrate for granulocyte elastase. *Scand. J. Clin. Lab. Invest. 43:427-33.*

264. Cohen, H. J., and Chovaniec, M. E.. 1978. Superoxid generation by digitonin-stimulated guinea pig granulocytes. A basis for a continous assay for monitoring superoxide production and for the study of the activation of the generation system. *J. Clin. Invest. 61:1081-7.*

265. Berridge, M. J., Dawson, R. M., Downes, C. P., Heslop, J. P., and Irvine, R. F.. 1983. Changes in the levels of inositol phosphates after agonist-dependent hydrolysis of membrane phosphoinositides. *Biochem. J. 212:473-82.*

266. Snyderman, R. (ed.). 1984. Regulation of leukocyte function. *In: Contemporary topics in Immunobiology. Plenum Press, N. Y. and London, Vol. 14.*

267. Mathews, W. R., Rokach, J., and Murphy, R. C.. 1981. Analysis of leukotriens by high-pressure liquid chromatography. *Anal. Biochem. 118:96-101.*

268. Nadeau, M., Fruteau de Laclos, B., Picard, S., Braquet, P., Corey, E. J., and Borgeat, P.. 1984. Studies on leukotriene B_4 omega-oxidation in human leukocytes. *Can. J. Biochem. Cell Biol.. 62:1321-6.*

269. Budavari, S., O`Neil, M. J., Smith, A., and Heckelmann, P. E.: Merck Index, 11th edition, 1989. An encyclopedia of chemicals, drugs and biochemicals. Merck & Co., Inc.; Rahway, N. J., USA.

270. Tessner, T. G., O`Flatherty, J. T., and Wykle, R. L.. 1989. Stimulation of platelet-activating factor synthesis by nonmetabolizable bioactive analog of platelet-activating factor and influence of arachidonic acid metabolites. *J. Biol. Chem. 264:4794-9.*

271. Bligh, E. G., and Dyer, W. J.. 1953. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol. 73:753.*

272. Krämer, H. J., Stevens, J., and Seeger, W.. 1993. Analysis of 2- and 3-series prostanoids by post-HPLC ELISA. *Anal. Biochem. 214:535-43.*

273. Dray, F., Mamas, S., and Bizzini, B.. 1982. Prostaglandins and Arachidonate Metabolites. *In: Methods in Enymology.* W. E. M. Lands, and W. L. Smith (eds.). Academic Press, San Diego, Vol. 86, pp. 258-69.

274. Pace-Asciak, C. R.. 1989. One-step rapid extractive methylation of nonesterified fatty acids for gas chromatographic analysis. *J. Lipid Res. 30:451-4.*

275. Bursten S. L., Federighi, D. A., Parsons, P., Harris, W. E., Abraham, E., Moore, E. E. Jr., Moore, F. A., Bianco, J. A., Singer, J. W., and Repine, J. E.. 1996. An increase in serum C18 unsaturated free fatty acids as a predictor of the development of acute respiratory distress syndrome. *Crit. Care Med. 24:1129-36.*

276. Robin A. P., Askanazi, J., Greenwood, M. R., Carpentier, Y. A., Gump, F. E., and Kinney, J. M.. 1981. Lipoprotein lipase activity in surgical patients: influence of trauma and infection. *Surgery 90:401-8.*

277. Weissman, C.. 1990. The metabolic response to stress: an overview and update. *Anesthesiology 73:308-27.*

278. Forse R. A., Leibel, R., J. Askanazi, J., Hirsch, J., and Kinney, J. M.. 1987. Adrenergic control of adipocyte lipolysis in trauma and sepsis. *Ann. Surg. 206:744-51.*

279. Spitzer, J. A., Leach, G. J., and Palmer, M. A.. 1980. Some metabolic and hormonal alterations in adipocytes isolated from septic dogs. *Adv. Shock Res. 4:55-62.*

280. Kiuchi, S., Matsuo, N., Takeyama, N., and Tanaka, T.. 1993. Accelerated hepatic lipid synthesis in fasted septic rats. *Eur. Surg. Res. 25:146-54.*

281. Winter, B. K., Fiskum, G., and Gallo, L. L.. 1995. Effects of L-carnitine on serum triglyceride and cytokine levels in rat models of cachexia and septic shock. *Br. J. Cancer 72:1173-9.*

282. Mela-Riker, L., Bartos, D., Vlessis, A. A., Widener, L., Muller, P., and Trunkey, D. D.. 1992. Chronic hyperdynamic sepsis in the rat. II. Characterization of liver and muscle energy metabolism. *Circ. Shock 36:83-92.*

283. Guidet, B., Piot, O., Masliah, J., Barakett, V., Maury, E., Bereziat, G., and Offenstadt, G.. 1996. Secretory non-pancreatic phospholipase A2 in severe sepsis: relation to endotoxin, cytokines and thromboxane B2. *Infection 24:103-8.*

284. Gavino, V. C., and Gavino, G. R.. 1992. Adipose hormone-sensitive lipase preferentially releases polyunsaturated fatty acids from triglycerides. *Lipids. 27:950-4.*

285. Samra, J. S., Simpson, E. J., Clark, M. L., Forster, C. D., Humphreys, S. M., Macdonald, I. A., and Frayn, K. N.. 1996. Effects of epinephrine infusion on adipose tissue: interactions between blood flow and lipid metabolism. *Am. J. Physiol. 34:E834-9.*

286. Jaume, J. C., Mendel, C. M., Frost, P. H., Greenspan, F. S., and Laughton, C. W.. 1996. Extremely low doses of heparin release lipase activity into the plasma and can thereby cause artifactual elevations in the serum-free thyroxine concentration as measured by equilibrium dialysis. *Thyroid 6:79-83.*

287. Hammarström, S., Hamberg, M., Samuelsson, B., Duell, E. A., Stawski, M., and Voorhees, J. J.. 1975. Increased concentrations of nonesterified arachidonic acid, 12L-hydroxy-5,8,10,14-eicosatetraenoic acid, prostaglandin $E_{2,}$ and prostaglandin F_{2alpha} in epidermis of psoriasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72:5130-4.*

288. Unterberg, A., Wahl, M., Hammersen, F., and Baethmann, A.. 1987. Permeability and vasomotor response of cerebral vessels during exposure to arachidonic acid. *Acta Neuropathol. 73:209-19.*

289. Ullrich, V., Hecker, G., and Schatz-Mundig, M.. 1991. Platelet-neutrophil interactions. *In Molecular Aspects of Inflammation.* H. Sies, L. Flohé, G. Zimmer (eds). Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp 59-71.

290. Rustan, A. C., Hustvedt, B. E., and Drevon, C. A.. 1998. Postprandial decrease in plasma unesterified fatty acids during n-3 fatty acid feeding is not caused by accumulation of fatty acids in adipose tissue. *Biochim. Biophys. Acta 1390:245-57*

291. Lovegrove J. A., Brooks, C. N., Murphy, M. C., Gould, B. J., and Williams, C. M.. 1997. Use of manufactured foods enriched with fish oil as a means of increasing long-chain n-3 polyunsaturated fatty acid intake. *Br. J. Nutr. 78:223-36.*

292. de Lorgeril, M., Renaud, S., Mamelle, N., et al.. 1994. Mediterranean alpha-linolenic acid-rich diet in secondary prevention of coronary heart disease. *Lancet 343:1454-9.*

293. Knutzon, D. S., Knauf, V.. 1998. Manipulating seed oils for polyunsaturated fatty acid content. In: Plant Lipid Bioynthesis: Fundamentals and Aricultural Applications. 287. Harwood, J. (ed.), Cambridge, UK: University Press.

294. Grimminger F., Scholz, C., Bhakdi, S., and Seeger, W.. 1991. Subhemolytic doses of Escherichia coli hemolysin evoke large quantities of lipoxygenase products in human neutrophils. *J. Biol. Chem. 266:14262-9.*

295. Grimminger F., Hattar, K., Papavassilis, C., Temmesfeld, B., Csernok, E., Gross, W. L., Seeger, W., and Sibelius, U.. 1996 Neutrophil activation by anti-proteinase 3 antibodies in Wegener's granulomatosis: role of exogenous arachidonic acid and leukotriene B4 generation. *J. Exp. Med. 184:1567-72.*

296. Endres, S., Meydani, S. N., Ghorbani, R., Schindler, R., and Dinarello, C. A.. 1993. Dietary supplementation with n-3 fatty acids suppresses interleukin-2 production and mononuclear cell proliferation. *J. Leukoc. Biol. 54:599-603.*

297. Schade, F. U., Engel, R., Hartling, S., Holler, S., and Jakobs, D.. 1993. The role of unsaturated fatty acids in endotoxin-induced macrophage activation. *Immunobiol. 187:283-302.*

298. Solomkin, J. S., Brodt, J. K., and Antrum, R. M.. 1985. Suppressed neutrophil oxidative activity in sepsis: a receptor-mediated regulatory response. *J. Surg. Res. 39:300-4.*

299. Solomkin, J. S., Jenkins, M. K., Nelson, R. D., Chenoweth, D., and Simmons, R. L.. 1981. Neutrophil dysfunction in sepsis. II. Evidence for the role of complement activation products in cellular deactivation. *Surgery 90:319-27.*

300. Vespasiano M. C., Lewandoski, J. R., and Zimmerman, J. J.. 1993. Longitudinal analysis of neutrophil superoxide anion generation in patients with septic shock. *Crit. Care Med. 21:666-72.*

301. Pascual C, Karzai, W., Meier-Hellmann, A., Bredle, D. L., and Reinhart, K.. 1997. A controlled study of leukocyte activation in septic patients. *Intensive Care Med. 23:743-8.*

302. Burke, P. A., Canning, C. M., Chartier, S., Lazo, S., Daley, J., Forse, R. A., and Ritz, J.. 1994. Alterations of Ca2+ signal transduction in critically ill patients. *Surgery 116:378-86.*

303. van Deventer, S. J. H., Büller, H. R., ten Cate, J. W., Aarden, L. A., Hack, C. E., and Sturk, A.. 1990. Experimental endotoxemia in humans: analysis of cytokine release and coagulation, fibrinolytic and complement pathway. *Blood 76:2520-6.*

304. Waage, A., Halstensen, A., and Espevik, T.. 1987. Association between tumor necrosis factor in serum and fatal outcome in patients with meningococcal disease. *Lancet 1:355-7.*

305. Moscovitz, H., Shofer, F., Mignott, H., Behrman, A., and Kilpatrick, L.. 1994. Plasma cytokine determinations in emergency department patients as a predictor of bacteremia and infectious disease severity. *Crit. Care Med. 22:1102-7.*

306. Zhang, G., and Ghosh, S.. 2000. Molecular mechanisms of NF-kappaB activation induced by bacterial lipopolysaccharide through Toll-like receptors. *J. Endotoxin Res. 6:453-7.*

307. Van Deventer, S. J.. 2000. Cytokine and cytokine receptor polymorphisms in infectious desease. *Intensive Care Med. 26:S98-102.*

308. Tamandl, D., Bahrami, M., Wessner, B., Weigel, G., Ploder, M., Furst, W., Roth, E., Boltz-Nitulescu, G., and Spittler, A.. 2003. Modulation of toll-like receptor 4 expression on human monocytes by tumor necrosis factor and interleukin-6: tumor necrosis factor evokes lipopolysaccharide hyporesponsiveness, whereas interleukin-6 enhances lipopolysaccharide activity. *Shock 20:224-9.*

309. Holmes, C. L., Russell, J. A., and wallex, K. R.. 2003. Genetic polymorphisms in sepsis and septic shock: role in prognosis and potential for therapy. *Chest 124:1103--15.*

310. Beutler, B., Hoebe, K., Du, X., Janssen, E., Georgel, P., and Tabeta, K.. 2003. Lps2 and signal transduction in sepsis: at the intersection of host responses to bacteria and viruses. *Scand. J. Infect. Dis. 35:563-7.*

311. Mira, J. P., Cariou, A., Grall, F., et al... 1999. Association of TNF2, a TNF- promoter polymorphism, with septic shock susceptibility and mortality. *JAMA 282:561-8.*

312. Grimbel, R. F., Howell, W. M., O`Reilly, G., Turner, S. J., Markovic, O., Hirrell, S., East, J. M., and Calder, P. C.. 2002. The ability of fish oil to suppress tumor necrosis factor α production by peripheral blood mononuclear cells in healthy men is associated with polymorphisms in genes that influence tumor necrosis factor α production. *Am. J. Clin. Nutr. 76:454-9.*

313. Blok, W. L., de Bruijn, M. F., Leenen, P. J., Eling, W. M., van Rooijen, N., Stanley, E. R., Buurman, W. A., and van der Meer, J. W.. 1996. Dietary n-3 fatty acids increase spleen size and postendotoxin circulating TNF in mice; role of macrophages, macrophage precursors, and colony stimulating factor-1. *J. Immunol. 157:5569-73.*

314. Chyi, A., and Yeh, S. L.. 2000. Effects of dietary fish oil on survival rate, plasma amino acid pattern, and inflammatory-related mediators in diabetic rats with sepsis. *Clin. Nutr. 19:313-8.*

315. Chao, C. Y., Yeh, S. L., Lin, M. T., and Chen, W. J.. 2000. Effects of parenteral infusion with fish-oil or safflower-oil on hepatic lipids, plasma amino acids, and inflammatory mediators in septic rats. *Nutrition. 16:284-8.*

316. Pscheidl, E. Reisch, S., and Rugheimer, E.. 1994. Chemically defined structured lipids with omega-3 fatty acids maintain splanchnic blood flow in a low-dose continous endotoxin model. *Infusionstherapie und Transfusionsmedizin 21:380-7.*

317. Wallace, F. A., Miles, E. A., and Calder, P. C.. 2000. Activation state alters the effect of dietary fatty acids on pro-inflammatory mediator production by murine macrophages. *Cytokine 12:1374-9.*

318. Fischer, G. W., Hunter, K. W., Wilson, S. R., and Mease, A. D.. 1980. Diminished bacterial defences with Intralipid. *Lancet 18:819-20.*

319. Freeman, J., Goldman, D. A., Smith, N. E., Sidebottom, D. G., Epsten, M. F., and Platt, R.. 1989. Association of intravenous lipid emulsion and coagulase-negative Staphylococcal bacteremia in neonatal intensive care units. *N. Engl.. J. Med. 323:301-8.*

320. Chan, S., McCowen, K. C., and Bistrian, B.. 1998. Medium-chain triglyceride and n-3 polyunsaturated fatty acid-containing emulsions in intravenous nutrition. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care 1:163-9.*

321. Vognild, E., Elvevoll, E. O., Brox, J., Olsen, R. L., Barstad, H., Aursand, M., and Osterud, B.. 1998. Effects of dietary marine oils and olive oil on fatty acid composition, platelet membrane fluidity, platelet responses, and serum lipids in healthy humans. *Lipids. 33:427-36.*

322. Guarini, P., Bellavite, P., Biasi, D., Carletto, A., Galvani, S., Caramaschi, P., Bambara, L. M., and Corrocher, R.. 1998. Effects of dietary fish oil and soy phosphatidylcholine on neutrophil fatty acid composition, superoxide release, and adhesion. *Inflammation. 22: 381-91.*

323. Endres, S., Ghorbani, R., Kelley, V. E., Georgilis, K., Lonnemann, G., van der Meer, J. W., Cannon, J. G., Rogers, T. S., Klempner, M. S., Weber, P. C., Schaefer, E. J., Wolff, W. M., and Dinarello, C. A.. 1989. The effect of dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids on the synthesis of interleukin-1 and tumor necrosis factor by mononuclear cells. *N. Engl. J. Med. 320:265-71.*

324. Galban, C., Montejo, J. C., Mesejo, A., Marco, P., Celaya, S., Sanchez-Segura, J. M., Farre, M., and Bryg, D. J.. 2000. An immune-enhancing enteral diet reduces mortality rate and episodes of bacteremia in septic intensive care unit patients. *Crit. Care Med. 28:643-8.*

325. Kudsk, K. A., Minard, G., Croce, M. A., Brown, R. O., Lowrey, T. S., Pritchard, F. E., Dickerson, R. N., and Fabian, T. C.. 1996. A randomized trial of isonitrogenous enteral diets after severe trauma. An immne-enhancing diet reduces septic complications. *Ann. Surg. 224:531-43.*

326. Senkal, M., Mumme, A., Eickhoff, U., Geier, B., Späth, G., Wulfert, D., Joosten U., Frei, A., and Kemen, M.. 1997. Early postoperative enteral immunonutrition: clinical outcome and cost-comparison analysis in surgical patients. *Crit. Care Med. 25:1489-96.*

327. Rustan, A. C., Hustvedt, B. E., and Drevon, C. A.. 1998. Postprandial decrease in plasma unesterified fatty acids during n-3 fatty acid feeding is not caused by accumulation of fatty acids in adipose tissue. *Biochim. Biophys. Acta 1390:245-57.*

328. Lovegrove, J. A., Brooks, C. N., Murphy, M. C., Gould, B. J., and Williams, C. M.. 1997. Use of manufactured foods enriched with fish oil as a means of increasing long-chain n-3 polyunsaturated fatty acid intake. *Br. J. Nutr. 78:223-36.*

329. Grimminger, F., Mayser, P., Papavassilis, C., Thomas, M., Schlotzer, E., Heuer, K. H., Führer, D., Hinsch, K. D., Walmrath, D., Schill, W. B., and Seeger, W.. 1993. A double-blind, randomized, placebo-controlled trial of n-3 fatty acid based lipid infusion in acute, extended guttate psoriasis. Rapid improvement of clinical manifestations and changes in neutrophil leuktoriene profile. *Clin. Investig. 71:634-43.*

330. Grimminger, F., Führer, D. Papavassilis, C., Schlotzer, E., Mayer, K., Heuer, K. U., Kiss, L., Walmrath, D., Piberhofer, D., Lübbecke, F., Krämer, H. J., Stevens, J., Schütterle, G., and Seeger, W.. 1993. Influence of intravenous n-3 lipid supplementation on fatty acid profiles and lipid mediator generation in a patient withsevere ulcerative colitis. *Eur. J. Clin. Invest. 23:706-15.*

331. Bjornsson, E. s., Urbanavicius, V., Eliasson, B., Attvall, S., Smith, U., and Abrahamsson, H.. 1994. Effects of hyperglycemia on interdigestive gastrointestinal motility in humans. *Scand. J. Gastroenterol. 29:1096-104.*

332. Bone, R. C. 1996. Sir Isaac Newton, sepsis, SIRS and CARS. *Crit. Care Med. 24:1125-8.*

333. Docke, W. D., Randow, F., Syrbe, U., Krausch, D., Asadullah, K., Reinke, P., Volk, H. D., and Kox, W.. 1997. Monocyte deactivation in septic patients: restoration by IFN-gamma treatment. *Nat. Med. 3:678-81.*

334. Kox, W. J., Bone, R. C., Krausch, D., Docke, W. D., Kox, S. N., Wauer, H., Egerer, K., Querner, S., Asadullah, K., von Baehr R., and Volk, H. D.. 1997. Interferon gamma-1b in the treatment of compensatory anti-inflammatory response syndrome. A new approach: proof of principle. *Arch. Intern. Med. 157:389-93.*

335. Solomkin, J. S., Cotta, L. A., Brodt, J. K., Hurst, J. W., and Ogle, C. K.. 1984. Neutrophil dysfunction in sepsis. III. Degranulation as a mechanism for nonspecific deactivation. *J. Surg. Res. 36:407-12.*

336. Pittet, D., Thievent, B., Wenzel, R. P., Li, N., Auckenthaler, R., and Suter, P. M.. 1996. Bedside prediction of mortality from bacteremic sepsis. A dynamic analysis of ICU patients. *Am. J. Respir. Crit. Care Med. 153:684-93.*

337. Hollenberg, N. K., and Nickerson, M.. 1970. Changes in pre- and postcapillary resistance in pathogenesis of hemorrhagic shock. *Am. J. Physiol. 219:1483-9.*

338. Freeman, B. D., and Cobb, J. P.. 1998. Nitric oxide synthase as a therapeutic target in sepsis – more question than answers? *Crit. Care Med. 26:1469-10.*

339. Grover, R., Zaccardelli, D., Colice, G., Guntupalli, K., Watson, D., and Vincent, J. L.. 1999. An open-label dose escalation study of the nitric oxide synthase inhibitor, N(G)-methyl-L-arginine hydrochloride (546C88), in patients with septic shock. Glaxo Wellcome International Septic Shock Study Group. *Crit. Care Med. 27:913-22.*

340. Rivers, E., Nguyen, B., Havstad, S., Ressler, J., Muzzin, A., Knoblich, B., Peterson, E., and Tomlanovich, M.. 2001. Early goal-directed therapy in the treatment of severe sepsis and septic shock. *N. Engl. J. Med. 245:1368-77.*

341. Zeni, F., Freeman, B., and Natanson, C.. 1997. Anti-inflammatory therapies to treat sepsis and septic shock: a reassessment. *Crit. Care Med. 25:1095-100.*

342. Annane, D.. 2001. Replacement therapy with hydrocortisone in catecholamine-dependent septic shock. *J. Endotoxin Res. 7:305-9.*

343. Anel. R. L., and Kumar, A.. 2001. Experimental and emerging therapies for sepsis and septic shock. *Expert Opin. Invest. Drugs 10:1471-85.*

344. Annane, D., Sebille, V., Charpentier, C., Bollaert, P. E., Francois, B., Korach, J. M., Capellier, G., Cohen, Y., Azoulay, E., Troche, G., Chaumet-Riffaut, P., and Bellissant, E.. Effect of treatment with low doses of hydrocortisone and fludrocortisone on mortality in patients with septic shock. *JAMA 21:862-71.*

345. Bernard, G. R., Wheeler, A. P., Russel, J. A., Schein, R., Summer, W. R., Steinberg, K. P., Fulkerson, W. J., Wright, P. E., Christman, B. W., Dupont, W. D., Higgins, S. B., and Swindell, B. B.. 1997. The effects of ibuprofen on the physiology and survival of patients with sepsis. The Ibuprofen in Sepsis Study Group. *N. Engl. J. Med. 336:912-8.*

346. Bernard, G. R., Vincent, J. L., Laterre, P. F., LaRosa, S. P., Dhainaut, J. F., Lopez-Rodriguez, A., Steingrub, J. S., Garber, G. E., Helterbrand, J. D., Ely, E. W., and Fisher, C. J.. For the Recombinant Human Activated Protein C Worldwide Evaluation in Severe Sepsis (PROWESS) Study Group. Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for severe sepsis. *N. Engl. J. Med. 344:699-709.*

347. Dhainaut, J.-F. A., Tenaillon, A., Le Tulzo, Y., Schlemmer, B., Solet, J.-P., Wolff, M., et al.. 1994. Platelet acitvating factor receptor antagonist BN 52021 in the treatment of severe sepsis: a randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter clinical trial. *Crit. Care med. 22:1720-1728.*

348. Rodell, T. C., Scharschmidt, L. A., Knaus, W. A., and the CP-0127 SIRS and Sepsis Study Group. 1995. Results of a multi-center, randomized placebo-controlled trial of CP-0127, anovel bradykinin antagonist, in patients with SIRS and sepsis (abstract). *Shock 3(suppl):60*

349. Semmler, J., Gebert, U., Eisenhut, T., Moeller, J., Schonharting, M. M., Allera, A., and Endres, S.. 1993. Xanthine derivates: comparison between suppression of tumor necrosis factor-alpha production and inhibition of cAMP phosphodiesterase activity. *Immunology 78:520-5.*

350. Mayer, K., Seeger, W., and Grimminger, F.. 1998. Clinical use of lipids to control inflammatory disease. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care. 1:179-84*.

351. Grimminger, F., and Mayser, P.. 1995. Lipid mediators, free fatty acids and psoriasis. *Prostaglandins Leukot. and Essent. Fatty Acids 52:1-15.*

352. van der Heide, J. J., Bilo, H. J., Donker, J. M., Wilmink, J. M., and Tegzess, A. M.. 1993. Effect of dietary fish oil on renal function and rejection in cyclosporine-treated recipients of renal transplants. *N. Engl. J. Med. 329:769-73.*

353. Czermak B. J., Sarma, V., Pierson, C. L., Warner, R. L., Huber-Lang, M., Bless, N. M., Schmal, H., Friedl, H. P., and Ward, P. A.. 1999. Protective effects of C5a blockade in sepsis. *Nat. Med. 5: 788-92*.

Erklärung

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

Lebenslauf

Persönliche Daten

5. Juli 1969	Geburt in Bad Nauheim als Tochter von Maria und Günter Fegbeutel

Schulbildung

1976 – 1980	Grundschule in Ober-Rosbach, Hessen
1980 – 1989	Gymnasium St. Lioba in Bad Nauheim, Abschluss mit Abitur im Mai 1989

Hochschulbildung

10/1989 – 9/1990	Studium der Diplom-Biologie an der JLU Gießen
10/1990 – 4/1997	Studium der Humanmedizin an der JLU Gießen
3/1992	Ärztliche Vorprüfung
3/1993	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
10/1993 – 9/1995	Experimenteller Teil der Dissertation in der Klinischen Forschergruppe am Zentrum für Innere Medizin der JLU Gießen unter der Betreuung von Herrn Prof. Dr. Dr. F. Grimminger
3/1996	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
4/1997	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Berufliche Weiterbildung

9/1997 – 3/1999	Tätigkeit als Ärztin im Praktikum in der Medizinischen Klinik und Poliklinik II der JLU Gießen, Direktor Prof. Dr. W. Seeger
seit 3/1999	Tätigkeit als Assistenzärztin in der Medizinischen Klinik und Poliklinik II der JLU Gießen
21. April 2004	Internistischen Facharztprüfung

Publikationsverzeichnis

1. Mayer, K., Fegbeutel, C., Hattar, K., Sibelius, U., Kramer, H. J., Heuer, K. U., Temmesfeld-Wollbruck, B., Gokorsch, S., Grimminger, F., and Seeger, W.. 2003. Omega-3-vs. omega-6 lipid emulsions exert differential influence on neutrophils in septic shock patients: impact on plasma fatty acids and lipid mediator generation. *Intensive Care Med. 29: 1472-81.*
2. Schulz, R., Fegbeutel, C., Althoff, A., Traupe, H., Grimminger, F., and Seeger, W.. 2003. Central sleep apnoea and unilateral diaphragmatic paralysis associated with vertebral artery compression of the medulla oblongata. *J. Neurol. 250:503-5.*
3. Mayer, K., Gokorsch, S., Fegbeutel, C., Hattar, K., Rosseau, S., Walmrath, D., Grimminger, F., and Seeger, W.. 2003. Parenteral nutrition with fish oil modulates cytokine response in patients with sepsis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med. 167:1321-8.*
4. Schulz, R., Fegbeutel, C., Olschewski, H., Rose, F., Schäfers, H. J., and Seeger, W.. 2004. Reversal of nocturnal periodic breathing in primary pulmonary hypertension after lung transplantation. *Chest 125:344-7.*
5. Schulz, R., Fegbeutel, C., Hackstein, N., and Seeger, W.. 2002. Obstructive sleep apnoea secondary to superior vena cava thrombosis in a patient with activated protein C resistance. *Somnologie 6:173-5.*

Danksagung

Allen, die mich bei der Anfertigung dieser Arbeit unterstützten, möchte ich sehr herzlich danken.

Herrn Prof. Dr. Dr. Grimminger danke ich für das interessante und Patienten-orientierte Promotionsthema und für seine Anregungen und Motivation, die den Fortgang der Arbeit stets förderten. Ebenso möchte ich ihm dafür danken, dass er mir die Gelegenheit gab, in seiner Forschergruppe Erfahrungen mit einer engagierten, klinisch orientierten Grundlagenforschung zu sammeln.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. K. Mayer für seine engagierte Betreuung, verbunden mit beständiger wissenschaftlicher Diskussion. Seine Erfahrungen und Ideen bildeten eine wichtige Grundlage meiner Arbeit.

Des Weiteren möchte ich Frau K. Fietzner, Frau A. Tschuschner und Frau C. Diewisch sowie allen ungenannten Mitarbeitern des Teams danken, deren routinierte technische Unterstützung einen entscheidenden Beitrag zu dieser Arbeit leisteten.

Ein besonderer Dank gilt allen Studienpatienten, die das Gelingen der Arbeit letztendlich erst ermöglicht haben.

Herrn Prof. Dr. W. Seeger danke ich für seine Geduld, Ideen und Motivation.