

Aus der Klinik für Innere Medizin I
mit den Schwerpunkten Gastroenterologie, Hepatologie, Pneumologie, internistische
Intensivmedizin, Endokrinologie, Infektiologie, Rheumatologie, Ernährungs- und
Alterungsmedizin
(Direktor: Prof. Dr. med. S. Schreiber)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**Untersuchungen der Serum-Konzentrationen des
proinflammatorischen Glykoproteins wnt-5a
und seines antiinflammatorischen Inhibitors sFRP-5
bei an Sepsis erkrankten Patienten im Verlauf**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

Dominik Kragelund

aus Flensburg

Kiel 2015

1. Berichterstatter: Prof Dr. med. Matthias Laudes
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Regine Gläser
Tag der mündlichen Prüfung: 22.09.2016
Zum Druck genehmigt, Kiel, den 25.03.2016

gez.: Prof. Dr. Johann Roider
(Vorsitzender des Ausschusses für Promotion)

Meinen Eltern und Großeltern

**„Persönlichkeiten werden nicht durch schöne Reden geformt,
sondern durch Arbeit und eigene Leistung.“**

Albert Einstein

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung.....	7
2	Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen.....	9
3	Einleitung.....	11
3.1	Bedeutung von Stoffwechsel und Entzündung.....	11
3.2	Das Glykoprotein wnt-5a und sein Inhibitor sFRP-5.....	16
3.3	Sepsis (Definition und klinische Kriterien).....	18
3.4	Zielsetzungen dieser Studie.....	20
4	Material & Methoden.....	21
4.1	Studientyp und Studienpopulation.....	21
4.2	Einverständniserklärung.....	22
4.3	Ethik Kommission.....	22
4.4	Definition der Sepsis.....	23
4.5	Studienprotokoll.....	24
4.6	Blutparameter.....	25
4.7	Bestimmung der Insulinresistenz.....	25
4.8	Ernährung.....	25
4.9	Bestimmung der wnt-5a/sFRP-5 – Konzentration mittels ELISA.....	26
4.10	Verwendete Reagenzien & Material.....	28
4.11	Datenverarbeitung / Statistik.....	29
5	Ergebnisse.....	30
5.1	Sepsis-Manifestation und Behandlung.....	30
5.2	Die Entzündungsparameter der eingeteilten Gruppen im Verlauf.....	31
5.3	Die wnt-5a-Werte der Sepsis-Patienten sind gegenüber denen der Kontrollgruppe signifikant erhöht.....	31
5.4	Die Serumkonzentration des wnt-5a sinkt bei Besserung der Sepsis.....	32
5.5	Fehlende Kompensation durch ausbleibende Induktion des sFRP5 bei Sepsis.....	32
5.6	Die wnt5a-Serumkonzentrationen korrelieren positiv mit der Anzahl der Leukozyten.....	33
5.7	Die wnt-5a-Serumkonzentration ist assoziiert mit Insulinresistenz bei Sepsis-Patienten.....	38
5.8	Bei enteral ernährten Sepsis-Patienten sinken die wnt-5a-Werte schneller als bei parenteral ernährten Sepsis-Patienten.....	39

6	Diskussion.....	40
6.1	Die Sepsis-Therapie	40
6.2	Bei an Sepsis erkrankten Menschen ist wnt-5a erhöht	41
6.3	Die Herkunft des wnt-5a	42
6.4	wnt-5a korreliert mit Insulinresistenz.....	42
6.5	wnt-5a in Korrelation zu den klassischen Entzündungsmarkern	43
6.6	Das antiinflammatorische sFRP-5 bei Sepsis	43
6.7	Parenterale vs. enterale Ernährungsform	44
6.8	Fazit	45
7	Literaturverzeichnis	46
8	Verzeichnis der Tabellen.....	52
9	Verzeichnis der verwendeten Abbildungen	53
10	Abstract.....	54
11	Anhang.....	55
11.1	Verwendete Reagenzien & Material.....	55
11.2	Auswertung der Daten bezüglich „enteraler vs. parenteraler Ernährung“ hinsichtlich des Verlaufs der wnt-5a-Serumkonzentration	56
11.3	Patientencharakteristika Teil 1	57
11.4	Patientencharakteristika Teil 2	58
12	Lebenslauf.....	59
13	Publikation.....	60
14	Danksagungen	61

1 Zusammenfassung

Entzündung und Stoffwechsel sind für den menschlichen Organismus von essentieller Bedeutung. In jüngsten Studien konnten Verbindungen zwischen diesen beiden Systemen gezeigt werden. So wurden das proinflammatorische wnt-5a und sein spezifischer Inhibitor sFRP-5 bei adipösen Patienten mit Typ 2 Diabetes Mellitus im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen vermehrt im Blutserum nachgewiesen [16].

Da es sich bei Typ 2 Diabetes Mellitus um eine chronische, „kalte“ Entzündung handelt, erschien es sinnvoll, diese Parameter auch bei Patienten, die unter einer systemischen, "heißen" Entzündungsreaktion des Körpers litten, zu untersuchen. Sepsis ist das Musterbeispiel einer systemischen, „heißen“ Inflammation. Sowohl Typ 2 Diabetes Mellitus als auch die Sepsis zeigen eine metabolische Störung in Form einer Insulinresistenz.

In der vorliegenden Promotion sollten nun das proinflammatorische wnt-5a und dessen spezifischer Inhibitor, sFRP-5, quantitativ und longitudinal bei an Sepsis erkrankten Patienten gemessen werden, um einen möglichen Pathomechanismus zwischen Entzündung und metabolischen Störungen auch bei "heißen" Entzündungen zu beschreiben.

Es wurden 60 Patienten der internistischen, chirurgischen und anästhesiologischen Intensivstationen der Universitätsklinik Kiel für diese Studie rekrutiert; 37 Männer und 23 Frauen, das mittlere Alter lag bei 66,9 Jahren.

Als Kontrollgruppe wurde eine Kohorte von 30 gesunden Individuen eingesetzt. Diese wurden im gleichen Zeitraum im Rahmen der „Food Chain Plus“ (FoCus)-Studie rekrutiert und wurden aus dem Gesamtkollektiv passend nach Alter und Geschlecht zu den Patienten ausgewählt.

In dieser monozentrischen nicht-interventionellen, prospektiven Beobachtungs-Studie wurden Patienten, die an einer systemisch-inflammatorischen Reaktion erkrankt waren, eingeschlossen. Den Patienten wurde bei Aufnahme auf die Intensivstation sowie am 5. Folgetag arterielle Blutproben entnommen. Aus diesen

wurden die Serumkonzentrationen des wnt-5a und des sFRP-5 quantitativ mittels ELISA bestimmt.

Die wnt-5a-Serumkonzentration wurde bei allen 60 Patienten gegenüber Werten gesunder Kontrollpatienten erhöht gemessen. Bei den wnt-5a Werten an Tag 0 fand sich eine signifikante positive Korrelation zu der Leukozyten-Konzentration.

Zeigte die Inflammations-Reaktion innerhalb der 5 Beobachtungstage einen günstigen Verlauf, so fiel auch das wnt-5a signifikant ab. Bei zunehmender Inflammation zeigte sich hingegen eine nicht signifikante wnt-5a Erhöhung.

Der wnt-5a Inhibitor sFRP-5 zeigte keine signifikante Veränderung und blieb unverändert im normalen Bereich.

Diese Untersuchung konnte zeigen, dass wnt-5a und sFRP-5 nicht nur bei „kalten“, chronischen Inflammationen, sondern ebenso bei der „heißen“ systemischen Entzündungsreaktion ein wichtiges System zum Zweck der Regulation zu sein scheint. Das wnt-5a/sFRP-5-System kann somit ein pharmakologisches Target für ein innovatives Konzept bei der Therapie von systemischen Entzündungen und ihren metabolischen Störungen darstellen.

2 Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

ACCP American College of Chest Physicians

BMI Body-Mass-Index

Ca⁺ Calcium

CAU Christian-Albrecht-Universität

cm Zentimeter

CRP C-reaktives Protein

DSG Deutsche Sepsis Gesellschaft

ELISA enzyme-linked immuno sorbent assay

ent enterale Ernährungsweise

FiO₂ Fraktion des inhalierten Sauerstoffs

FZD5 Frizzled-5-Rezeptor

HOMA Homeostatic Model Assessment index

ICU Intensive Care Unit

IRS Insulinrezeptorsubstrate

Kcal Kilokalorien

kg Kilogramm

ng Nanogramm

NNI Nebenniereninsuffizienz

ns nicht signifikant

paCO₂ arterieller Kohlendioxidpartialdruck

paO₂ arterieller Sauerstoffpartialdruck

par parenterale Ernährungsweise

PCT Procalcitonin

SCCM Society of Critical Care Medicine

SEM standard error of the mean

sFRP5 secreted frizzled-related protein 5

SIRS systemic inflammatory response syndrome

vs versus

wg Wingless-Gen

3 Einleitung

3.1 Bedeutung von Stoffwechsel und Entzündung

Stoffwechsel und Entzündung haben für den Menschen gleichermaßen eine physiologische als auch pathophysiologische Bedeutung [1].

Der Stoffwechsel umfasst die Gesamtheit der chemischen Prozesse, die zur Umwandlung von Molekülen führen. Man subsumiert unter diesem Begriff somit Vorgänge wie die Aufnahme, den Transport und den chemischen Ab- und Umbau von Stoffen, sowie die Elimination von Metaboliten. Hauptziel ist die Energiegewinnung, um den Aufbau des Organismus und die Erhaltung der Körperfunktionen zu gewährleisten.

Entzündung ist definiert als Gewebe-Reaktion auf potenziell schädigende Reize. Diese Reize können sowohl äußerlich als auch innerhalb des Körpers vorliegen und durch diverse Noxen hervorgerufen werden, die sowohl physikalischer, chemischer als auch biologischer Natur sein können. Der Körper versucht mit Hilfe der Entzündungsreaktion die den Reizen zugrunde liegenden Schadstoffe oder Mikroorganismen zu beseitigen bevor ein Schaden eintreten kann [2]. Eine biochemische Kaskade von Prozessen führt zur Entzündungsreaktion, bei der das Gefäßsystem, das Immunsystem und unterschiedliche Zellen im betroffenen Gewebe involviert sind. Es kann sich sowohl um einen lokal-umschriebenen Prozess, als auch eine systemischen Mitreaktion des Körpers handeln. Klinisch imponiert sie durch die klassischen Symptome: Rötung, Überwärmung, Schwellung, Schmerz und Funktionsbeeinträchtigung bzw. -verlust [3].

Es gibt verschiedene Arten der Entzündungsreaktion. Es wird zwischen akuten und chronischen Entzündungen unterschieden.

Akute Entzündungen sind definiert als eine sofortige und frühe Antwort auf einen Entzündungsreiz. Es zeigt sich hierbei eine Vasodilatation und Steigerung der Gefäßpermeabilität. Auf zellulärer Ebene werden Entzündungszellen (z.B. Leukozyten) rekrutiert und aktiviert [4].

Eine chronische Entzündung ist definiert als permanente Entzündung, die Wochen bis Jahre andauern kann. Es kann zu Gewebsuntergang oder Heilung kommen. Ursachen können virale/bakterielle Infekte, als auch autoimmune oder metabolische

Prozesse darstellen [4].

Man kann die Klassifizierung der Entzündungsreaktionen auch über die Begriffe „kalte“ und „heiße“ Entzündung vornehmen (Abbildung 1 und 2). Bei einer heißen Entzündung, ausgelöst durch Pathogene oder Verletzungen, kommt es analog zu der akuten Entzündung, zu einem raschen Anstieg der Zytokine. Dem schließt sich eine Modifizierung der Gewebe mit Ausprägung der klassischen Symptome an. Diese Vorgänge können pathophysiologisch zu Stoffwechsel-Störungen führen.

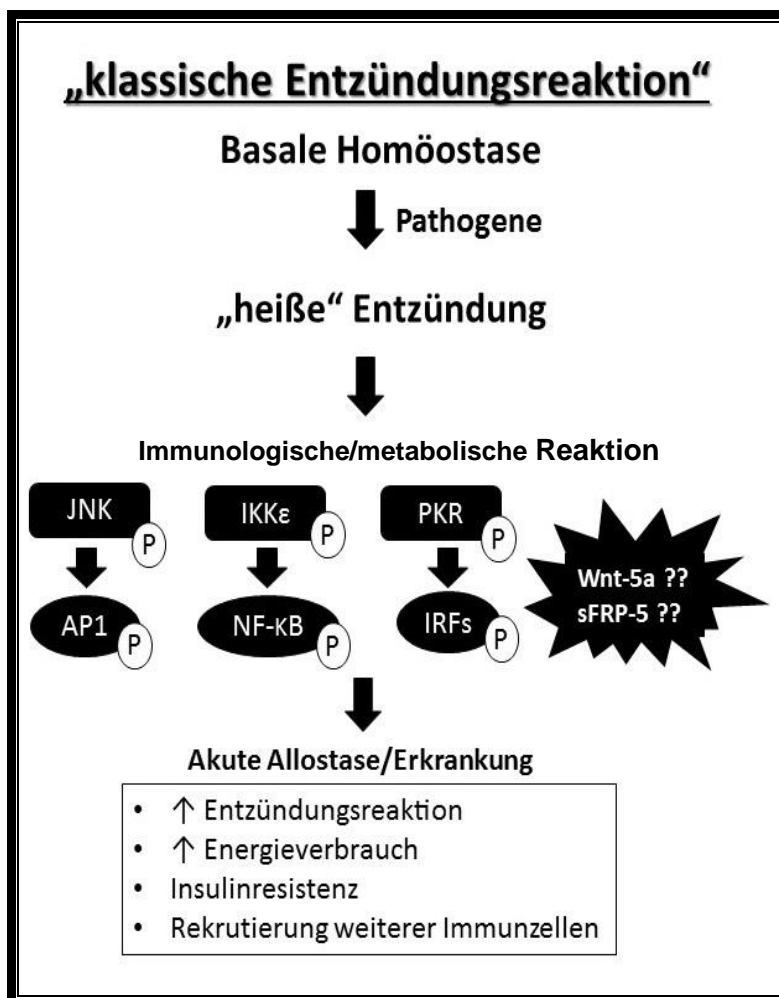


Abbildung 1: Die klassische Entzündung oder „hot inflammation“

Modifiziert nach Calay & Hotamisligil, Nature, 2013

und Egger G., Dixon J, Obes Rev, 2009

Demgegenüber sind Stoffwechsel-Störungen in den meisten Fällen der Auslöser für die kalte Entzündung, die auch als Metaflammation bezeichnet wird. Diese verläuft überwiegend diskreter und in Form einer chronischen Entzündungsreaktion über einen längeren Zeitraum. Sie kann in ihrem Verlauf kritische bis fatale Folgen haben.

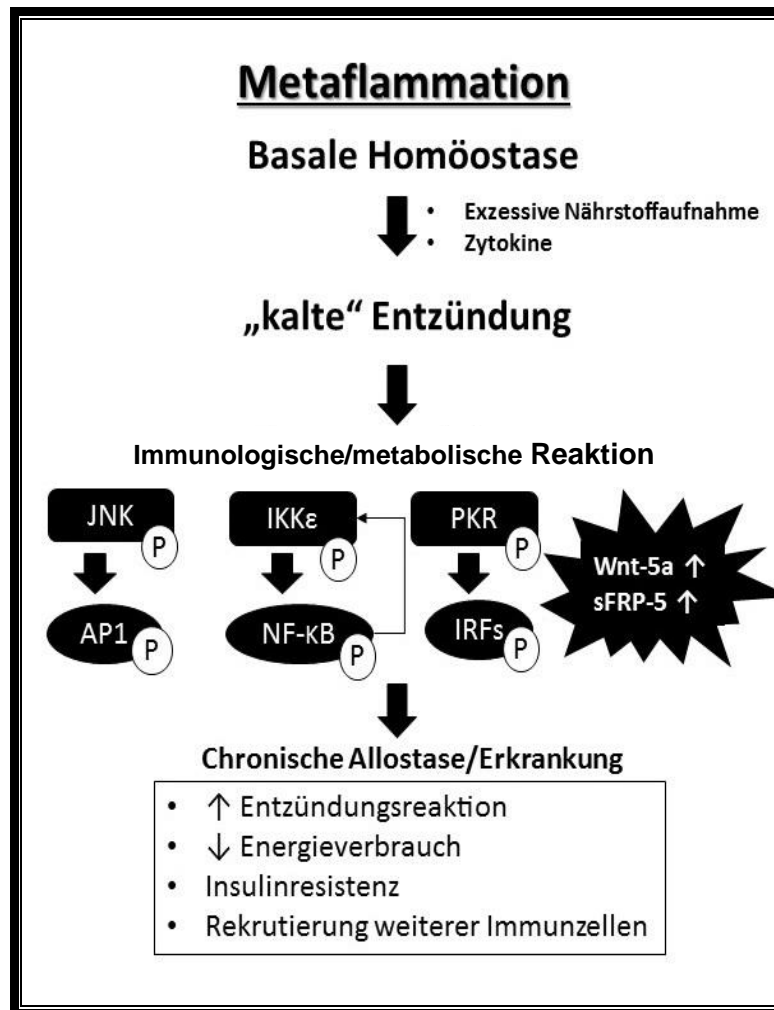


Abbildung 2: Die Metaflammation oder „cold inflammation“.

Modifiziert nach Calay & Hotamisligil, Nature, 2013

und Egger G., Dixon J, Obes Rev, 2009

Kommt es beispielsweise zu einem Überangebot an Nährstoffen, wie der Glukose, kann dies zu einer Störung des Stoffwechsels führen. Physiologisch führt dieser Umstand zu einer kompensatorischen Umwandlung und Ablagerung der Glukose in Form von Triglyceriden in das Fettgewebe. Wenn jedoch keine weitere Energie mehr in Lipozyten gespeichert werden kann, kommt es einerseits zur Akkumulation von

Lipiden in anderen Organen, wie der Leber und den Muskeln, oder zu einer Hypertrophie der Lipozyten, die im Vollbild einer Adipositas entspricht. Diese Hypertrophie löst ihrerseits eine biochemische Kettenreaktion aus, aus welcher sich dann eine chronische, kalte Entzündung entwickeln kann. Auch die ektopische Fettablagerung kann bereits als die Initiierung eines Entzündungsprozesses eingeordnet werden. Diese Entzündung kann weiter zu Stoffwechselstörungen wie dem Typ 2 Diabetes Mellitus mit zum Teil gravierenden Komplikationen führen [5].

Die Insulinresistenz stellt die gemeinsame Endstrecke der klassischen "heißen" und der "kalten" Entzündung dar. Die aus ihr resultierende Hyperglykämie ist im Rahmen einer Sepsis ein äußerst eindrückliches Beispiel für die klassische Entzündungsreaktion und deren lebensbedrohliche Wirkung [6].

Trotz ihrer wichtigen Rolle für das Leben stellen chronische Störungen des Stoffwechsels und chronische Entzündungen eine der größten Bedrohungen des menschlichen Lebens und der Gesundheit weltweit dar [1].

Die evolutionstheoretische Perspektive ermöglicht uns zu verstehen, wie eng die Systeme des Metabolismus und der Immunologie vernetzt sind und auf welche Weise sie interagieren oder welche Informationen auszutauschen sie vermögen [7]. So konnte bereits in Studien gezeigt werden, dass bei der schwarzbäuchigen Fruchtfliege „*drosophila melanogaster*“ ein sogenannter „fat body“ sämtliche Funktionen des Stoffwechsels und der Abwehr in sich vereint. Übertragen auf die Körperfunktionen des Menschen, fand man in besagtem „fat body“ ein Äquivalent zu der menschlichen Leber, dem Fettgewebe und dem Immunsystem.

Es gibt bisher keine rationale Intervention bei dieser pathophysiologischen Interaktion von Entzündung und Metabolismus, die bereits im frühen Stadium des Entzündungsgeschehens ansetzt.

Darum ist es von umso größerer Relevanz, innovative antiinflammatorische Strategien zu entwickeln, um die Therapie schwerer, systemischer, heißer wie kalter Entzündungen voranzubringen und so ihre lebensbedrohlichen metabolischen Konsequenzen zu minimieren.

Basierend auf ihrem gemeinsamen Phänotyp ist es vorstellbar, dass gemeinsame oder überlappende Stoffwechselwege existieren und somit sowohl metabolische als

auch immunologische Funktionen durch wichtige Schlüssel-Enzyme und Signalwege gemeinsam reguliert werden können. Darum sollte das Augenmerk der wissenschaftlichen Forschung nicht ausschließlich auf den bekannten mit Entzündungen assoziierten Molekülen liegen, sondern auch auf den para-inflammatorischen Prozessen [8], die durch Makrophagen induziert werden.

Para-Inflammation beschreibt die Komposition von Reaktionen im Rahmen einer sekundären Antwort des adaptiven Immunsystems und lokalen Gewebe-Reaktionen auf Belastungen oder (metabolische) Störungen, die alle darauf ausgerichtet sind die Gewebefunktion wiederherzustellen [8]. Frühere Arbeiten haben gezeigt, dass das Signalmolekül wnt-5a einen para-inflammatorischen Regenerations-Prozess auch bei verschiedenen Erkrankungen des Fettgewebes aktivieren kann. In einem Modell kalter Entzündung wurde gezeigt, dass über wnt-5a als wichtiges Signal-Molekül die Makrophagen des Fettgewebes die Adipozyten negativ beeinflussen (Abbildung 3), indem sie die Insulinresistenz bedingen und Adipogenese-Aktivität auf parakrinem Weg reduzieren [2,9].

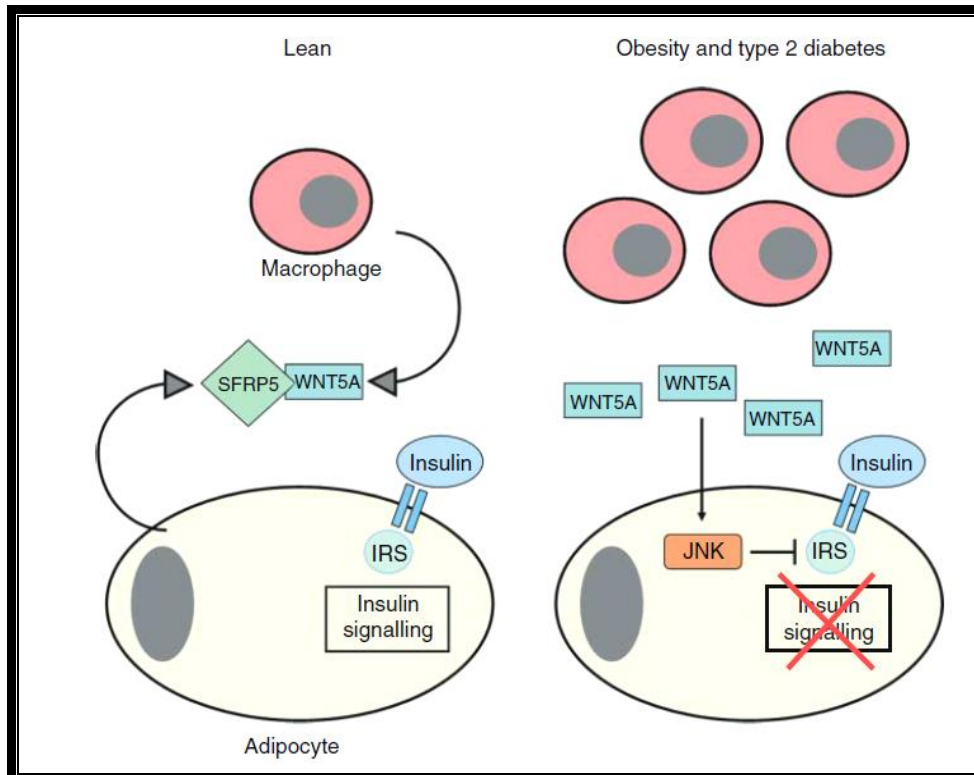


Abbildung 3: wnt-5a/sFRP-5-Signalweg bei der „kalten Inflammation“,
 Laudes, M., J Mol Endocrinol, 2011 (Review)

3.2 Das Glykoprotein wnt-5a und sein Inhibitor sFRP-5

Wnt-5a ist ein Mitglied der wnt-Familie. Erstmals beschrieben wurde das erste wnt-Gen im Jahr 1982. Zu dieser Zeit wurde es noch Int1 benannt und wurde als Protoonkogen in viral induzierten Brusttumoren der Maus identifiziert [10]. Int1 hatte die gleiche Struktur wie das schon früher in *Drosophila* beschriebene Wingless-Gen (Wg). Dessen Funktion war die Regulation der Embryonalentwicklung [11]. Wg und Int wurden zu WNT zusammengefasst, um diese neue Protein-Familie zu beschreiben [12].

Wnt-Proteine sind sezernierte, cysteinreiche Glykoproteine. In ihrer Funktion als Signalmoleküle sind sie unter anderem in die embryonale Entwicklung, in die Differenzierung der weißen Blutzellen bei der Hämatopoese und in das Tumorwachstum involviert [13].

Der wnt- Signalweg (Abbildung 4) ist als immunologisch-metabolisches System genetisch hoch konserviert.

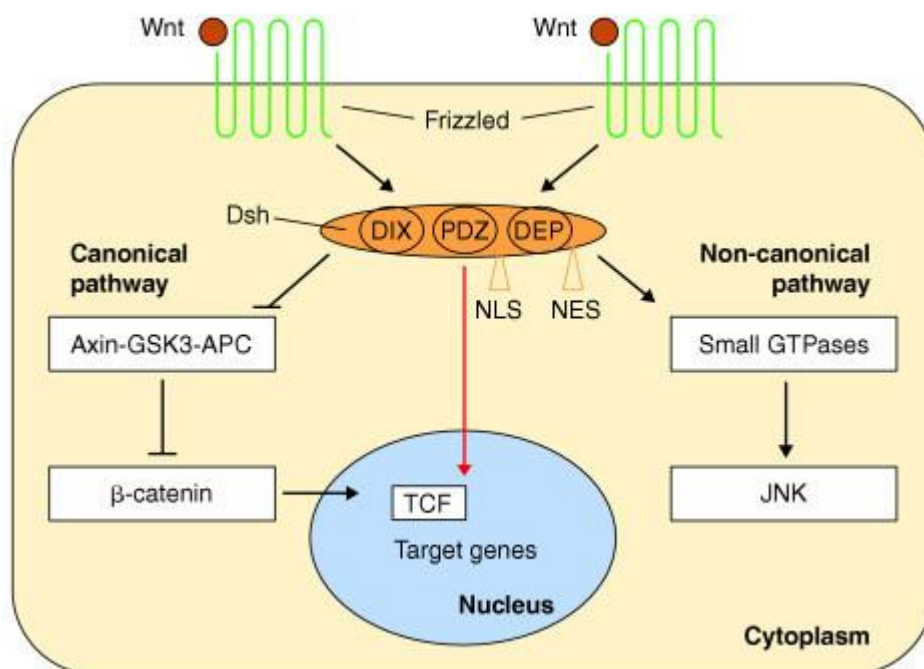


Abbildung 4: Wnt-Signalweg über „kanonischen“ und „nicht-kanonischen“ Signalweg, Weitzman JB - J. Biol. (2005)

Alle wnt-Proteine besitzen charakteristische gemeinsame Eigenschaften, wie ein Molekulargewicht von ca. 40 kDa, die Signalsequenz für die Sekretion, viele Glykosylierungsstellen, mehrere hochgeladene Aminosäurereste und ein fast gleichbleibendes Muster von 23 Cysteinresten [14].

Die Modulation der Wirkung des Wnt-5a wird über den spezifischen Inhibitor, das "secreted frizzled-related protein" (sFRP) -5 [15,39,40] reguliert, welches von gesunden, nicht lipidüberladenen Adipozyten ausgeschüttet wird (Abbildung 3).

Wnt-5a und sein Rezeptor Frizzled-5 (FZD5) sind in die Regulation und die Reaktion auf mikrobielle Stimulationen humaner mononukleärer Phagozyten eingebunden [15]. Die Wirkung des wnt-5a erfolgt über den nicht-kanonischen Signalweg (Abbildung 5).

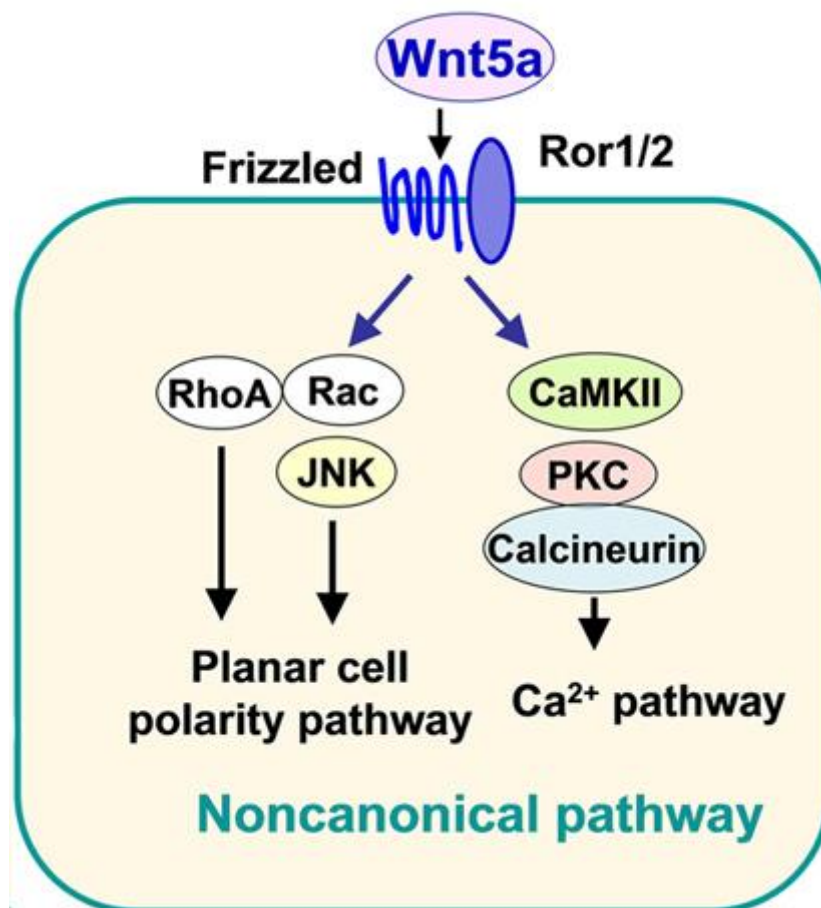


Abbildung 5: Der „nicht-kanonische“ wnt-5a-Signalweg, nach „Regulatory Mechanism of Osteoclastogenesis by RANKL and Wnt Signals“, Naoyuki Takahashi et al., 2011

In einer vorangegangenen Studie konnte gezeigt werden, dass adipöse Menschen mit einer chronischen, kalten Inflammation höhere wnt5a-Spiegel im Gegensatz zu schlanken Individuen einer Kontrollgruppe aufweisen [16].

Weiterhin konnte in mehreren Studien eine Dysbalance des wnt-5a/sFRP-5 – Systems zugunsten des wnt-5a als pathogenetischer Einflussfaktor auf die Entstehung des Typ 2 Diabetes Mellitus nachgewiesen werden [17].

3.3 Sepsis (Definition und klinische Kriterien)

Sepsis ist ein geeignetes Beispiel für eine systemische „heiße“ Inflammation und ist potentiell lebensbedrohlich. Sie stellt sich häufig als systemisch inflammatorische Reaktion des Körpers sehr komplex dar und kann eine vielgestaltige Symptomatik aufweisen.

Die auslösenden Erreger sind in den meisten Fällen grampositive und gramnegative Bakterien, aber auch Viren, Pilze und Protozoen können eine Sepsis initiieren. Es können im Unterschied zu einer lokalen Entzündungsreaktion alle Organe zugleich betroffen sein. Die Prävalenz wurde im Rahmen einer Studie an 3877 Patienten unter Intensivpatienten mit 11% beobachtet, die Inzidenz wurde mit 52000-75000/Jahr beziffert. Eine 90-Tage-Sterblichkeit von 54% konnte bei den beobachteten Patienten festgestellt werden [18]. Auf Deutschland hochgerechnet bedeutet dies, dass pro Jahr 75.000 Einwohner (110 von 100.000 Einwohnern) an einer schweren Sepsis bzw. einem septischen Schock erkranken [19].

Es handelt sich pathophysiologisch bei der Sepsis um eine überschießende Antwort des Immunsystems. Bei der gramnegativen Sepsis sind die Makrophagen maßgeblich beteiligt. Bakterielle Endotoxine (Lipopolysaccharide) aktivieren den CD14-Rezeptor und Toll-like-Rezeptor 4, was zur Synthese von Interleukinen, Zytokinen (wie TNF-alpha), Lipidmediatoren (wie Thromboxanen) und Prostaglandinen führt [20]. Es wird ein Zytokin-Kaskadensystem aktiviert, das durch positive Verstärkungs-Rückkopplungen, z.B. durch Lymphozyten und die Stagnation hemmender Systeme begünstigt wird. Grampositive Erreger lösen diese Kaskade über Exotoxine (Zellwandbestandteile) aus. Auch diese wirken auf Rezeptoren (z.B. TLR 2) und lösen somit ebenfalls eine Signaltransduktionskette aus [20,21].

Definitionsgemäß wird eine Wirtsreaktion nicht infektiöser Ätiologie als systemisches Inflammationssyndrom (systemic inflammatory response syndrome, SIRS) bezeichnet [21] (Definitionskriterien, Tabelle 3).

Die Therapie des SIRS und der Sepsis umfasst laut der S-2 Leitlinien der Deutschen Sepsis-Gesellschaft (DSG) die Fokussanierung, die zügige Antibiotikagabe, sowie eine supportive und adjuvante Therapie [22] (Abbildung 14 in der Diskussion).

Die Sepsis hat eine sehr hohe Mortalitätsrate und zeigt ein häufiges Auftreten von akuten endokrinologischen und metabolischen Entgleisungen [23]. Insbesondere das Auftreten von Insulinresistenz und Hyperglykämie reduzieren erheblich die Überlebenschancen [6] (Abbildung 6).

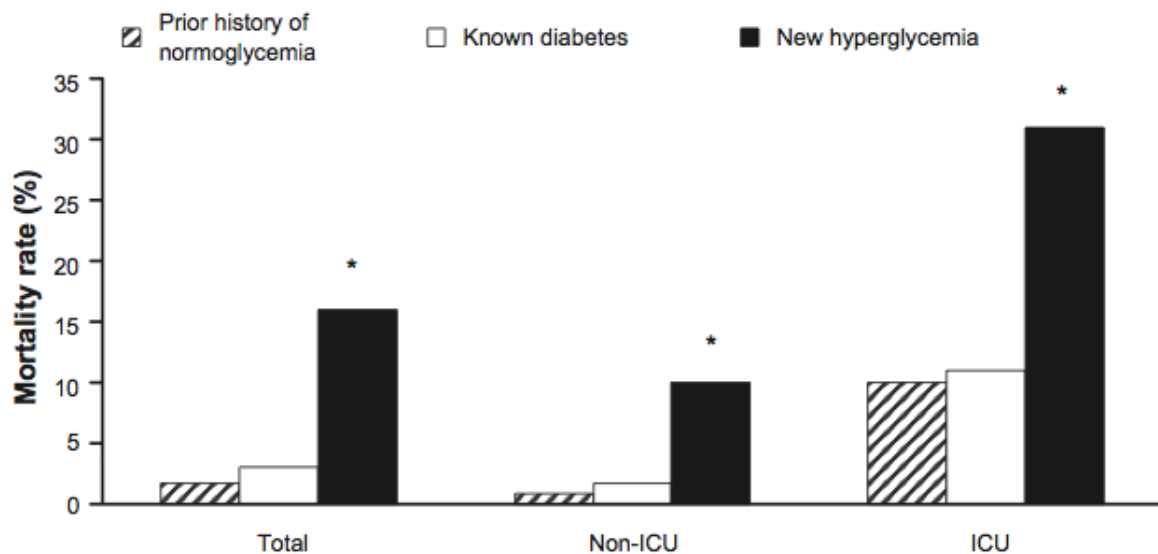


Abbildung 6: Effekt von Hyperglykämie auf die Mortalität von Patienten, die nicht auf der Intensivstation behandelt werden mussten (Non-ICU) und intensivpflichtigen Patienten (ICU),
Samer Ellahham, Vascular Health and Risk Management 2010:6

3.4 Zielsetzungen dieser Studie

Bei an einer Sepsis erkrankten Patienten konnte bislang mittels Immunopräzipitation und densitometrische Analysen herausgefunden werden, dass die Serumkonzentration des wnt-5a höher ist im Vergleich zu gesunden Subjekten einer Kontrollgruppe [19].

Das Ziel dieser Studie ist die Bestimmung der wnt-5a/sFRP-5-Serumkonzentration in einer größeren Kohorte von an einer Sepsis erkrankten Patienten mittels ELISA.

Es soll somit gezeigt werden, dass wnt-5a nicht nur bei kalten Inflammationen gegenüber Kontrollen erhöht ist, sondern auch bei einer akuten, heißen Entzündungsform. Diese Untersuchung soll weiter zum Verständnis der Rolle dieses Zytokins in der Verbindung zwischen Entzündung und Stoffwechsel beitragen.

Weiter sollte untersucht werden, ob diese Parameter über die Dauer der Sepsis Schwankungen unterliegen und, ob es möglich ist, diese als neue Verlaufparameter für metabolische Entgleisungen zu verwenden.

Zusätzlich sollte der Einfluss der Ernährungsformen (enteraler vs. parenterale Ernährung) auf die Serumkonzentrationen von wnt-5a und sFRP-5 untersucht werden.

4 Material & Methoden

4.1 Studientyp und Studienpopulation

Die Untersuchung wurde als monozentrische, nicht-interventionelle, prospektive Observations-Studie durchgeführt.

In der Zeit von Januar bis Dezember 2012 wurden insgesamt 60 an einer Sepsis erkrankte Patienten auf den medizinischen, chirurgischen und anästhesiologischen Intensivstationen der Universitätsklinik Kiel rekrutiert.

Die Einschlusskriterien lauteten: Männliche oder weibliche Patienten im Alter zwischen 20 und 80 Jahren, gestellte SIRS/Sepsis-Diagnose, Einwilligung vorliegend.

Ausgeschlossen wurden Patienten mit bekannter HIV, HBV oder HCV Infektion. Patienten, die vor Ablauf der Studie verstarben oder in andere Krankenhäuser verlegt wurden, wurden von der Auswertung ausgeschlossen.

Von den 60 rekrutierten Patienten wurden 48 Patienten in der Studie ausgewertet [Tabelle 1]

Gesamtzahl der Patienten (n=60)	Gesamt (♂:♀)
Zahl rekrutierter Patienten	60 (37:23)
Zahl der ausgewerteten Patienten	48 (28:20)
Alter (Jahre)	68 (59,5:62)
Gewicht [kg]	78,5 (81,8:72,4)
Größe [m]	173,21(177,85:164,67)
BMI [kg/qm]	26,17 (25,81:26,65)
„drop out“	
Verstorbene Patienten	7 (5:2)
Entlassene/Verlegte Patienten zwischen Tag 0 und Tag 5	5 (4:1)

Tabelle 1: Klinische Parameter der rekrutierten Patienten
n = Gesamtzahl (männlich:weiblich)

Ein Gesamtüberblick über die relevanten Charakteristika des Patienten-Kollektivs ist im Anhang unter 12.3 und 12.4 zu finden.

Als Kontrollgruppe wurde eine Kohorte von 30 gesunden Individuen eingesetzt. Diese wurden im gleichen Zeitraum im Rahmen der „Food Chain Plus“ (FoCus)-Studie rekrutiert und wurden aus dem Gesamtkollektiv passend nach Alter und Geschlecht zu den Patienten der vorliegenden Studie ausgewählt [Tabelle 2]. Die populationsbasierte FoCus-Studie ist ein Verbundprojekt, in dem an einer Kohorte von 2000 Probanden mittels klinischer und genetischer Untersuchungen Ernährungsmuster und Nahrungsmittel identifiziert werden sollen, die eine entzündungshemmende Wirkung entfalten.

	Kontrolle	Sepsis	p-Wert
Alter (Jahre)	67,17	66,92	0,9216
BMI (kg/m ²)	26,04	26,36	0,3688
männlich:weiblich	13:17	29:19:00	0,8149
CRP (mg/L)	5,04	199.7	<0.0001

Tabelle 2: Gegenüberstellung antropometrischer und klinischer Parameter der Kontrollgruppe und der Gruppe an Sepsis erkrankter Patienten mit jeweiliger Angabe des p-Wertes

4.2 Einverständniserklärung

Die Aufklärung der Patienten auf den Intensivstationen über Durchführung und Zielsetzung der Studie erfolgte mündlich und schriftlich durch ärztliches Personal. Die Patienten erklärten schriftlich ihr Einverständnis entweder selbst mittels Unterschrift, oder, wenn sie sediert oder nicht entscheidungsfähig waren, durch ihre gesetzlichen Vertreter bzw. durch ihre Angehörigen.

4.3 Ethik Kommission

Die klinische Studie wurde der Ethik-Kommission der Medizinischen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität Kiel vorgestellt und genehmigt (Nr. A161/11, Dezember 2011)

4.4 Definition der Sepsis

Die Diagnose einer SIRS/Sepsis wurde nach international gültigen Leitlinien und Standards gestellt (Tabelle 3). Die Leitlinien zur Diagnose und Therapie der SIRS/Sepsis werden wie folgt definiert und klassifiziert:

ACCP/SCCM-Diagnosekriterien für Sepsis, schwere Sepsis und septischen Schock.	
I Nachweis der Infektion	Diagnose einer Infektion über den mikrobiologischen Nachweis oder durch klinische Kriterien
II SIRS (mindestens 2 der nebenstehenden Kriterien)	Fieber ($\geq 38^{\circ}\text{C}$) oder Hypothermie ($\leq 36^{\circ}\text{C}$), bestätigt durch eine rektale oder intravasale oder vesikale Messung
	Tachykardie: Herzfrequenz $\geq 90/\text{min}$
	Tachypnoe (Frequenz $\geq 20/\text{min}$) oder Hyperventilation ($\text{paCO}_2 \leq 4,3 \text{ kPa}$ bzw. $\leq 33 \text{ mmHg}$)
	Leukozytose ($\geq 12.000/\text{mm}^3$) oder Leukopenie ($\leq 4000/\text{mm}^3$) oder $\geq 10\%$ unreife Neutrophile im Differenzialblutbild
III Akute Organdysfunktion (mindestens 1 Kriterium)	Akute Enzephalopathie: eingeschränkte Vigilanz, Desorientiertheit, Unruhe, Delirium
	Relative oder absolute Thrombozytopenie: Abfall der Thrombozyten um mehr als 30% innerhalb von 24 h oder Thrombozytenzahl $\leq 100.000/\text{mm}^3$
	Eine Thrombozytopenie durch akute Blutung oder immunologische Ursachen muss ausgeschlossen sein.
	Arterielle Hypoxämie: $\text{paO}_2 \leq 10 \text{ kPa}$ ($\leq 75 \text{ mmHg}$) unter Raumluft oder ein $\text{paO}_2/\text{FiO}_2$ -Verhältnis von $\leq 33 \text{ kPa}$ ($\leq 250 \text{ mmHg}$) unter Sauerstoffapplikation
	Eine manifeste Herz- oder Lungenerkrankung muss als Ursache der Hypoxämie ausgeschlossen sein.
	Renale Dysfunktion: Diurese $\leq 0,5 \text{ ml/kg/h}$ für wenigstens 2 h trotz ausreichender Volumensubstitution
	und/oder ein Anstieg des Serumkreatinins > 2 -fach oberhalb des lokal üblichen Referenzbereichs
	Metabolische Azidose: „base excess“ $\leq -5 \text{ mmol/l}$ oder Laktatkonzentration $> 1,5$ -fach oberhalb des lokal üblichen Referenzbereichs
Diagnose	
Sepsis	Kriterien I und II
Schwere Sepsis	Kriterien I, II und III
Septischer Schock	Kriterien I und II sowie für wenigstens 1 h ein systolischer arterieller Blutdruck $\leq 90 \text{ mmHg}$ bzw. ein mittlerer arterieller Blutdruck $\leq 65 \text{ mmHg}$ oder notwendiger Vasopressoreinsatz, um den systolischen arteriellen Blutdruck $\geq 90 \text{ mmHg}$ oder den arteriellen Mitteldruck $\geq 65 \text{ mmHg}$ zu halten
	Die Hypotonie besteht trotz adäquater Volumengabe und ist nicht durch andere Ursachen zu erklären.

Tabelle 3: Diagnosekriterien der Sepsis nach „International Sepsis Forum Definition of Infection in the ICUCC“ [24]

Es wurden alle Patienten eingeschlossen, die unseren Einschluss-Kriterien entsprachen (siehe 3.3) und dem Symptomkomplex einer systemischen Inflammation entsprechend zumindest eine SIRS (Kriterien-Klasse II der Tabelle 3) zeigten.

4.5 Studienprotokoll

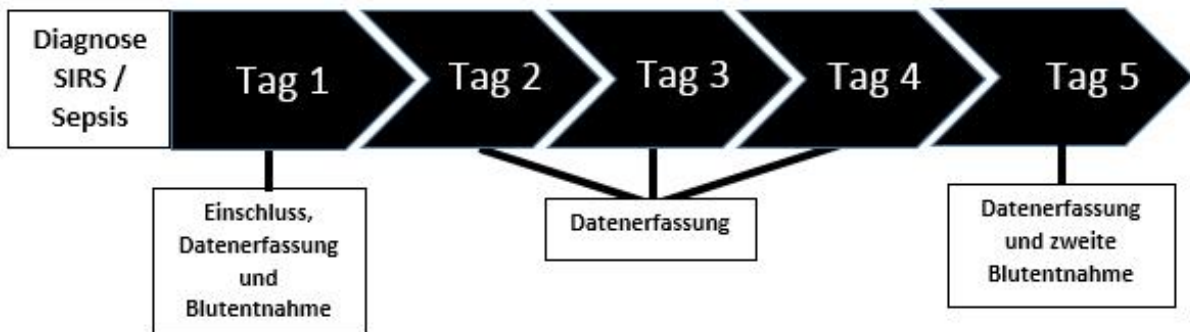


Abbildung 7: Studienprotokoll der Untersuchungen der Serum-Konzentrationen des proinflammatorischen wnt-5a und seines antiinflammatorischen Inhibitors sFRP-5 bei an Sepsis erkrankten Patienten im Verlauf

Wurde ein neuer Patient auf die Intensivstation aufgenommen, der den Kriterien der Sepsis entsprach, erfolgte die Aufklärung, Datenerfassung und die labortechnische Bearbeitung und Asservierung einer arteriellen Blutprobe innerhalb von 24 Stunden. Die Datenerfassung wurde dann vom zweiten bis zum fünften Tag fortgeführt. Am Tag 5 erfolgte eine erneute arterielle Blutentnahme.

Die Daten beinhalteten antropometrische Angaben (Alter, Geschlecht, Gewicht, Größe, Diagnose, Vorerkrankungen und Operationen), die aktuelle Medikation sowie die wichtigsten Laborparameter.

Die arteriellen Blutproben wurden 5 Minuten lang bei 677 x g zentrifugiert, aliquotiert und im Eisschrank bei – 80 °C asserviert.

Die klassischen Entzündungsmarker zeigten in ihren Verläufen über die fünf Beobachtungstage Veränderungen, nach denen die Patienten in zwei Gruppen eingeteilt werden konnten. Die Gruppenzugehörigkeit wurde über die Parameter CRP, PCT und Leukozyten bestimmt. Kam es zu einem 30%-igen Abfall mindestens einer dieser Marker innerhalb des Beobachtungszeitraumes, wurden die Patienten in

die Gruppe „abnehmende Inflammation“ (n=38 Patienten) eingeteilt. Patienten, deren Entzündungsparameter einen solchen Abfall nicht anzeigten, oder bei denen es zu einer Aggravierung des Krankheitsbildes mit steigenden Parametern kam, wurden in die Gruppe „zunehmende Inflammation“ (n=10 Patienten) eingeteilt. Die Gruppe mit „abnehmender Inflammation“ wird im Folgenden als „Gruppe A“ bezeichnet, während die Gruppe, die eine „zunehmende Inflammation“ zeigte „Gruppe B“ genannt wird.

4.6 Blutparameter

Je nach Verfügbarkeit wurden folgende Blutparameter über die 5 Tage protokolliert: Leukozyten, Erythrozyten, Hämoglobin, Thrombozyten, Natrium, Kalium, Kreatinin, GOT, GPT, Gamma-GT, Bilirubin, Harnstoff, CRP, alkalische Phosphatase, Procalcitonin, Glukose, Triglyceride.

Die Bestimmung dieser Parameter wurde im Zentrallabor der Universitätsklinik der CAU Kiel mittels Analyseautomaten durchgeführt.

Die Parameter wnt-5a und sFRP-5 wurden per ELISA bestimmt (siehe Abschnitt ELISA).

4.7 Bestimmung der Insulinresistenz

Der „Homeostatic Model Assessment index“ (HOMA) wurde wie folgt berechnet: $\text{Insulin } (\mu\text{U/ml}) \times \text{Glukose (mg/dl)} / 405$ [25]. Der HOMA-Index wird verwendet, um die Insulinresistenz einzuschätzen. Eine normale Insulin-Sensitivität ist bei Werten unter 3 gegeben, eine moderate Insulinresistenz zeigt sich bei Werten zwischen 3 und 5, eine schwere Insulinresistenz geht mit Werten über 5 einher [26].

4.8 Ernährung

Sepsispatienten sind selten in der Lage sich selbstständig zu ernähren. Daher sollte zusätzlich noch untersucht werden, welche intensivmedizinische Ernährungsform (enteral vs parenteral) den wnt-5a- Serumspiegel positiv beeinflussen könnte.

Es wurde ermittelt, auf welchem Weg der überwiegende Teil (> 50 %) der Kalorienzufuhr verabreicht/ eingenommen wurde (parenteral vs. enteral/ oral).

Der Kalorienbedarf der Patienten wurde mit Hilfe der Harris-Benedict-Formel [27] errechnet:

Männer

Grundumsatz [kcal/24 h] = 66,47 + (13,7 × Körpergewicht [kg]) + (5 × Körpergröße [cm]) – (6,8 × Alter [Jahre])

Frauen

Grundumsatz [kcal/24 h] = 655,1 + (9,6 × Körpergewicht [kg]) + (1,8 × Körpergröße [cm]) – (4,7 × Alter [Jahre])

Die Patienten wurden in zwei Gruppen eingeteilt. In die Gruppe „parenterale Ernährung“ wurden Patienten eingeteilt, bei denen der Grundumsatz überwiegend durch eine parenterale Ernährung abgedeckt wurde. Analog hierzu erfolgte die Aufnahme der Patienten, die vorwiegend selbstständig bzw. mit Hilfe von Pflegekräften oral ernährt wurden, oder durch eine Sondenkost enteral ernährt wurden, in die Gruppe „orale/enterale Ernährung“. Vier Patienten, die vor Ablauf der Beobachtungszeit verstarben und ein Patient, der in ein anderes Krankenhaus verlegt wurde, mussten von dieser Analyse bedingt durch fehlende Daten ausgeschlossen werden (n=55 Patienten) (Tabelle 11.2 im Anhang)

4.9 Bestimmung der wnt-5a/sFRP-5 – Konzentration mittels ELISA

Die Bestimmung der wnt-5a/ sFRP-5-Serumkonzentration erfolgte mittels eines kommerziell erhältlichen „enzyme-linked immunosorbent assay“ (ELISA). Nachfolgend die Angaben zu den verwendeten ELISAs.

ELISA-KIT für Wingless Type MMTV Integration Site Family, Member 5A (WNT5A):

Usn Life Science Inc., Bestellnummer E83549Hu, analytische Empfindlichkeit: 0.051 ng/ml. Laut Angaben des Herstellers hohe Spezifität ohne bekannte Kreuzreaktionen oder Interferenzen; Meßbereich 15.6-1,000pg/ml

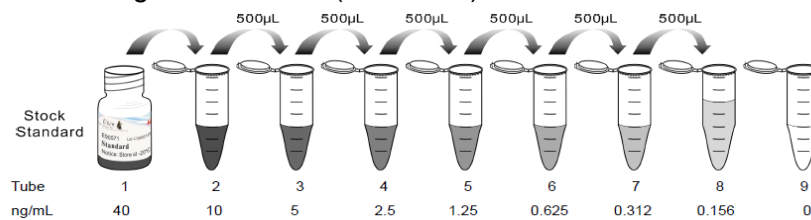
ELISA Kit für Secreted Frizzled Related Protein 5 (SFRP5):

Uscn Life Science Inc., Bestell-Nummer E92842Hu, analytische Empfindlichkeit: 0.64 ng/ml. Laut Angaben des Herstellers hohe Spezifität ohne bekannte Kreuzreaktionen oder Interferenzen; Meßbereich 1.56-100ng/mL

Die Vorbereitung der Serumproben und die Durchführung des ELISA-Verfahrens, sind in Tabelle 3 und 4 dargestellt.

Reagens-Vorbereitung

1. Alle Proben auf Raumtemperatur bringen
2. Standard-Lösung mit 1 ml Standard-Verdünnung wiederherstellen, nach 10 Minuten bei Raumtemperatur leicht schütteln. Standard-Lösung (40 ng/ml) auf 10 ng/ml verdünnen. 7 Mikroreaktionsgefäße mit jeweils 0,5 ml Standard-Verdünnung vorbereiten und verdünnte Standards für eine doppelte Verdünnungsreihe nutzen (siehe Bild).



Jedes Mikroreaktionsgefäß kurz schütteln.

10 ng/ml, 5 ng/ml, 1,25 ng/ml, 0,625 ng/ml, 0,312 ng/ml, 0,156 ng/ml & 0 (leer)

3. 6 ml Untersuchungs-Verdünnungs-Konzentrat A & B (Assay Diluent) mit 6 ml destilliertem Wasser verdünnen, um 12 ml Untersuchungs-Verdünnung A oder B zu erhalten (präzise pipettieren).
4. Detektions- Reagenz A&B kurz durchschütteln, um sie dann zur Arbeits-Konzentration mit Untersuchungs-Verdünnung-A oder B (1:100) zu verdünnen.
5. 20 ml Wasch-Lösungs-Konzentrat mit 500 ml destilliertem Wasser verdünnen. Wir erhalten 600 ml Wasch-Lösung.
6. TMB-Substrat – Die benötigte Dosis der Lösung mit sterilen Pipetten aufnehmen (Überschuss nicht zurückschütten!)

Tabelle 4: Anleitung zur Vorbereitung der Proben für das ELISA-Verfahren angelehnt an die Herstellerangaben von Uscn Life Science Inc

Untersuchungs-Vorbereitung

1. Vertiefungen als Standard, leer & Probe einteilen. 7 für Standard, 1 für leer. 100 µl von jeder Verdünnung des Standards hinzufügen, auch leer und die Proben. Mit Abdeckung versehen und 2 Stunden bei 37°C inkubieren.
2. Flüssigkeit jeder Vertiefung entfernen. NICHT waschen.
3. 100 µl Detektions-Reagenz A zu jeder Vertiefung hinzufügen und 1 Stunde bei 37°C nach Abdecken inkubieren.
4. Lösung aspirieren & mit 350 µl Wasch-Lösung waschen, die per multi-channel-Pipette hinzugefügt wird, dann 1-2 Minuten ruhen lassen. Alle Rückstände mit Löschpapier entfernen. Dreimal auf diese Weise waschen. Nach letztem Mal entfernen jeglichen Waschpuffern mittels einsaugen oder umfüllen. Platte umdrehen & gegen Löschpapier halten.
5. 100 µl Detektions- Reagenz B in jede Vertiefung. Nach Abdecken für 30 min bei 37°C inkubieren.
6. Die Wasch-Prozedur wie in Punkt 4 fünfmal durchführen.
7. 90 µl Substrat-Lösung (TMB) in jede Vertiefung. Mit einer neuen Abdeckung für 15-25 Min. bei 37°C inkubieren (30 Min. NICHT überschreiten). Vor Licht schützen. Die Flüssigkeit wird blau nach Substrat-Beigabe.
8. 50 µl Stopp- Lösung zu jeder Vertiefung hinzufügen. Flüssigkeit wird gelb. Durchmischen, indem man Plattenseite leicht rüttelt. (Farben alle gleich? Sonst nochmal leicht rütteln).
9. Jeden Tropfen und/ oder Fingerabdruck von Boden der Platte entfernen und sicherstellen, dass keine Blasen an der Oberfläche der Flüssigkeit sind.
10. Mikroplatten-Leser aktivieren und Messung bei 450nm sofort durchführen.

Tabelle 5: Anleitung zur Durchführung des ELISA-Verfahrens und Messung der Parameter angelehnt an die Herstellerangaben von Usco Life Science Inc

4.10 Verwendete Reagenzien & Material

Eine Liste der verwendeten Materialien ist im Anhang unter 9.2 zu finden.

4.11 Datenverarbeitung / Statistik

Die statistische Analyse wurde unter Verwendung der Software GraphPad Prism 5.01 durchgeführt. Zusammenhänge zwischen kategorischen Variablen wurden mittels Chi-Quadrat-Test untersucht. Bezüglich der kontinuierlichen Daten wurde durch den Kolmogorov-Smirnov und Shapiro-Wilk-Test überprüft, ob eine Normalverteilung vorlag. War dies der Fall wurde der student's T-Test angewandt. Nichtparametrische Daten wurden entweder durch den Mann-Whitney U-Test (bei zwei Gruppen) oder dem Kruskal-Wallis Test (bei mehr als zwei Gruppen, Dunn's Post-Hoc-Test zum Mehrfachvergleichstest) analysiert, während für die Korrelationsanalyse der Spearman Korrelations-Koeffizient genutzt wurde. Werte von $p < 0,05$ wurden als statistisch signifikant betrachtet.

5 Ergebnisse

5.1 Sepsis-Manifestation und Behandlung

Es wurden 60 Patienten für die Studie rekrutiert. Ausgewertet wurden die Daten von 48 Patienten. Es verstarben während der Beobachtungszeit sieben Patienten und fünf Patienten wurden in andere Krankenhäuser verlegt. Dieses ergibt eine „dropout“-Rate von 20 %. Bei 13 Patienten konnte der septische Fokus im Gastrointestinaltrakt gefunden werden, bei 10 Patienten in den Lungen, in 5 Fällen im Urogenitaltrakt, in der Leber bei 2 Patienten und in den unteren Extremitäten in 1 Fall. Bei 17 Patienten konnte kein definitiver Sepsis-Herd gefunden werden. Antibiotika wurden in verschiedenen Kombinationen gegeben (Tabelle 6).

Antibiotika	Gruppe A	Gruppe B
Vancomycin	6	4
Erythromycin	5	3
Piperacillin & Tazobactam	8	2
Ceftriaxone	3	2
Metronidazol	11	4
Ciprofloxacin	10	1
Meropenem	9	1
Cefotaxim	2	3
Clarithromycin	5	0
Sulfamicillin	1	0
Imipenem	1	1
Clindamycin	2	0
Cefuroxim	1	0
Gentamycin	1	1
Rifampicin	1	0
Neomycin	1	0
Ceftazidim	1	0
Diflucan	1	1

Tabelle 6: Übersicht über die eingesetzten Antibiotika bei den beobachteten Sepsis-Patienten, Gruppeneinteilung nach Verlauf der Entzündungsparameter:

Gruppe A= Patienten, bei denen sich die Sepsis im Verlauf besserte,
Gruppe B= Patienten, bei denen sich die Sepsis im Verlauf verschlechterte

5.2 Die Entzündungsparameter der eingeteilten Gruppen im Verlauf

Die CRP-Werte der Gruppe A zeigten einen Abfall von 200.4 ± 18.1 auf 84.9 ± 10.3 mg/l ($p < 0.0001$), während in Gruppe B die CRP-Werte von 197.2 ± 33.8 auf 258.8 ± 37.5 mg/l ($p = 0.4484$) anstiegen. Die Anzahl der Leukozyten reduzierte sich bei den Patienten der Gruppe A von 13.9 ± 1.0 auf $10.5 \pm 0.8 \cdot 10^9/l$ (0.0114). Bei der Gruppe B wurden an Tag 0 $16.1 \pm 2.4 \cdot 10^9/l$ Leukozyten gezählt und an Tag 5 $18.7 \pm 2.5 \cdot 10^9/l$ ($p = 0.5414$). Die Procalcitonin-Werte der Gruppe A fielen im Beobachtungszeitraum von 7.7 ± 1.6 auf 1.7 ± 0.5 ng/ml ($p = 0.0357$) und veränderten sich bei Gruppe B von 37.0 ± 31.6 zu 22.7 ± 18.9 ng/ml ($p = 0.7618$).

5.3 Die wnt-5a-Werte der Sepsis-Patienten sind gegenüber denen der Kontrollgruppe signifikant erhöht

Das wnt-5a im Serum der Sepsis-Patienten zeigte sich in unserer Studie bereits an Tag 0 signifikant erhöht im Vergleich zu der Kontrollgruppe (Abbildung 8).

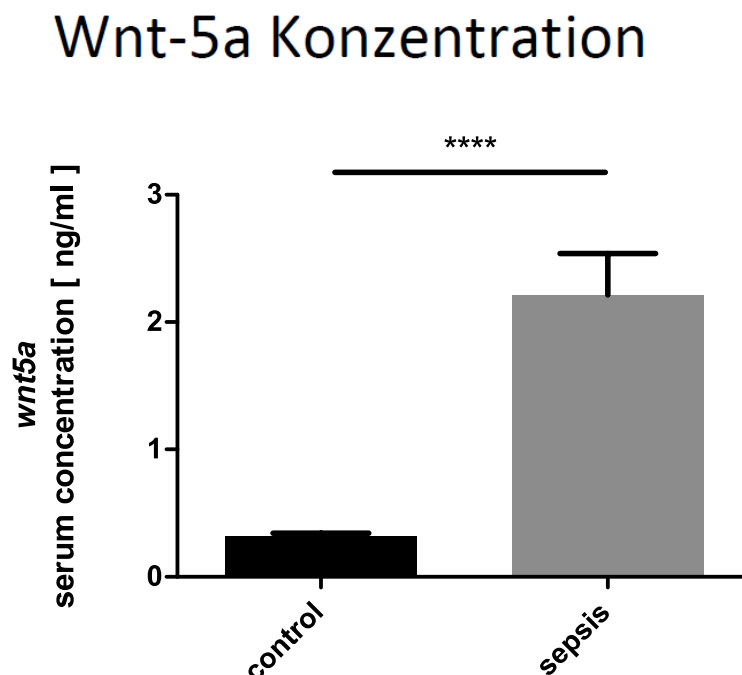


Abbildung 8: wnt-5a Serum-Konzentration im Vergleich zwischen der Gruppe der Sepsispatienten und der Kontrollgruppe an Tag 0
 Daten: Mittelwert \pm SEM, **** $p < 0.0001$

Bei Gruppe A ergab sich an Tag 0 eine wnt-5a-Serumkonzentration von 2.17 ± 0.38 ng/ml und bei der Gruppe B eine Serumkonzentration von 2.34 ± 0.59 ng/ml. Zwischen den Gruppen zeigte sich also an Tag 0 in Hinblick auf die wnt-5a-Serumkonzentration im Mittel kein signifikanter Unterschied (Abbildungen 11 und 12).

5.4 Die Serumkonzentration des wnt-5a sinkt bei Besserung der Sepsis

Weiterhin wurde der Verlauf der wnt-5a-Serumspiegel zwischen dem 0. und 5. Tag bei den Sepsis-Patienten unter leitliniengerechter Sepsistherapie untersucht. In der Gruppe A sank die wnt-5a Konzentration signifikant zwischen Tag 0 (2.17 ± 0.38 ng/ml) und Tag 5 (1.03 ± 0.28 ng/ml, $p=0.018$) (Abbildung 11). Bei Gruppe B nahmen die wnt-5a-Werte zu, was allerdings keine Signifikanz erreichte [Tag 0 (2.34 ± 0.59 ng/ml) und Tag 5 (3.25 ± 1.02 ng/ml), $p=0,451$] (Abbildung 12).

5.5 Fehlende Kompensation durch ausbleibende Induktion des sFRP5 bei Sepsis

Die Konzentration des antiinflammatorischen sFRP-5 der Sepsis-Patienten konnte an Tag 0 mit 19.72 ± 3.06 ng/ml gemessen werden. Dieser Wert unterscheidet sich nicht signifikant von dem Wert der bei den Individuen der Kontrollgruppe gemessen wurde (Abbildung 9), was eine fehlende Induktion der sFRP-5- Sezernierung bei Sepsis vermuten lässt. Patienten der Gruppe B zeigten anfangs niedrigere sFRP-5-Serumwerte (14.49 ± 3.43 ng/ml versus 21.10 ± 3.75 ng/ml). Dieser Effekt erreichte jedoch keine statistische Signifikanz. Am Ende des Beobachtungszeitraums konnte das sFRP-5 mit einem Wert von 18.54 ± 3.63 ng/ml bei der Gruppe A und von 15.57 ± 5.18 ng/ml bei der Gruppe B gemessen werden. Diese Werte unterschieden sich nicht signifikant von den Anfangswerten. Die im Verlauf erhobenen Messwerte des sFRP-5 erreichten bei beiden Gruppen somit keine statistische Signifikanz (Abbildungen 11 und 12).

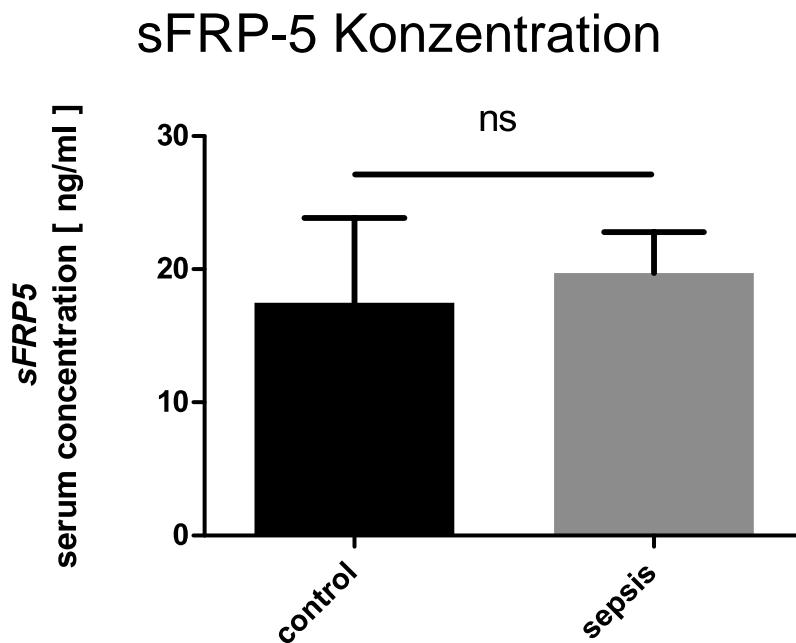


Abbildung 9: sFRP-5 Serum-Konzentration im Vergleich zwischen der Gruppe der Sepsispatienten und der Kontrollgruppe an Tag 0
Daten: Mittelwert \pm SEM, ns= nicht signifikant

5.6 Die wnt5a-Serumkonzentrationen korrelieren positiv mit der Anzahl der Leukozyten

Der wnt-5a- Serumspiegel und die Anzahl der Leukozyten im Serum korrelierten an Tag 0 positiv miteinander ($r_s = 0.3797$, $p = 0.0039$) (Tabelle 7, Abbildung 10), was auf eine pathophysiologische Verbindung zwischen den Zellen des Immunsystems und der Sekretion von wnt-5a hindeutet.

Korrelation wnt5a und Leukozyten

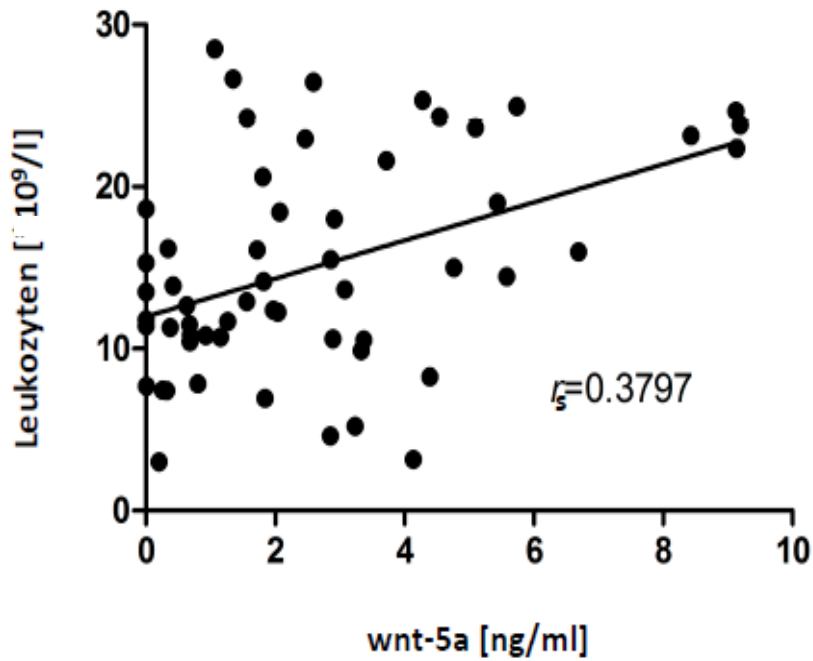


Abbildung 10: Korrelation der Konzentration von wnt5a und der Leukozytenzahl bei Patienten mit Sepsis an Tag 0

Weitere Korrelationen zwischen den Entzündungsmarkern CRP, PCT und den parainflammatorischen Signalmolekülen (wnt-5a als proinflammatorisches Zytokin, sFRP-5 als antiinflammatorisches Zytokin) erreichten keine Signifikanz (Tabelle 7).

Ergebnisse

	Tag 0:			Tag 5:		
	Korrelations Koeffizient	p-Wert	Anzahl XY Paare	Korrelations Koeffizient	p-Wert	Anzahl XY Paare
wnt-5a vs. Leukozyten	0.3797	0.0039	56	0.2264	0.1493	42
wnt-5a vs. CRP	0.0172	0.9059	50	0.1433	0.3906	38
wnt-5a vs. PCT	0.3550	0.0638	28	0.4048	0.3268	8
sFRP-5 vs. Leukozyten	0.2128	0.1154	56	-0.0986	0.5344	42
sFRP-5 vs. CRP	0.0879	0.5437	50	-0.2011	0.2260	38
sFRP-5 vs. PCT	0.1629	0.4077	28	-0.4524	0.2675	8

Tabelle 7: Korrelations-Analyse von wnt5a und sFRP-5 mit Leukozyten und Entzündungsparametern an Tag 0 und Tag 5. C-reaktives Protein – CRP, Procalcitonin – PCT, wingless-related integration site (wnt)-5a, secreted frizzled-related protein (sFRP)-5. Spearman r_s , $p < 0.05$ = signifikant, $p > 0.05$ = nicht signifikant.

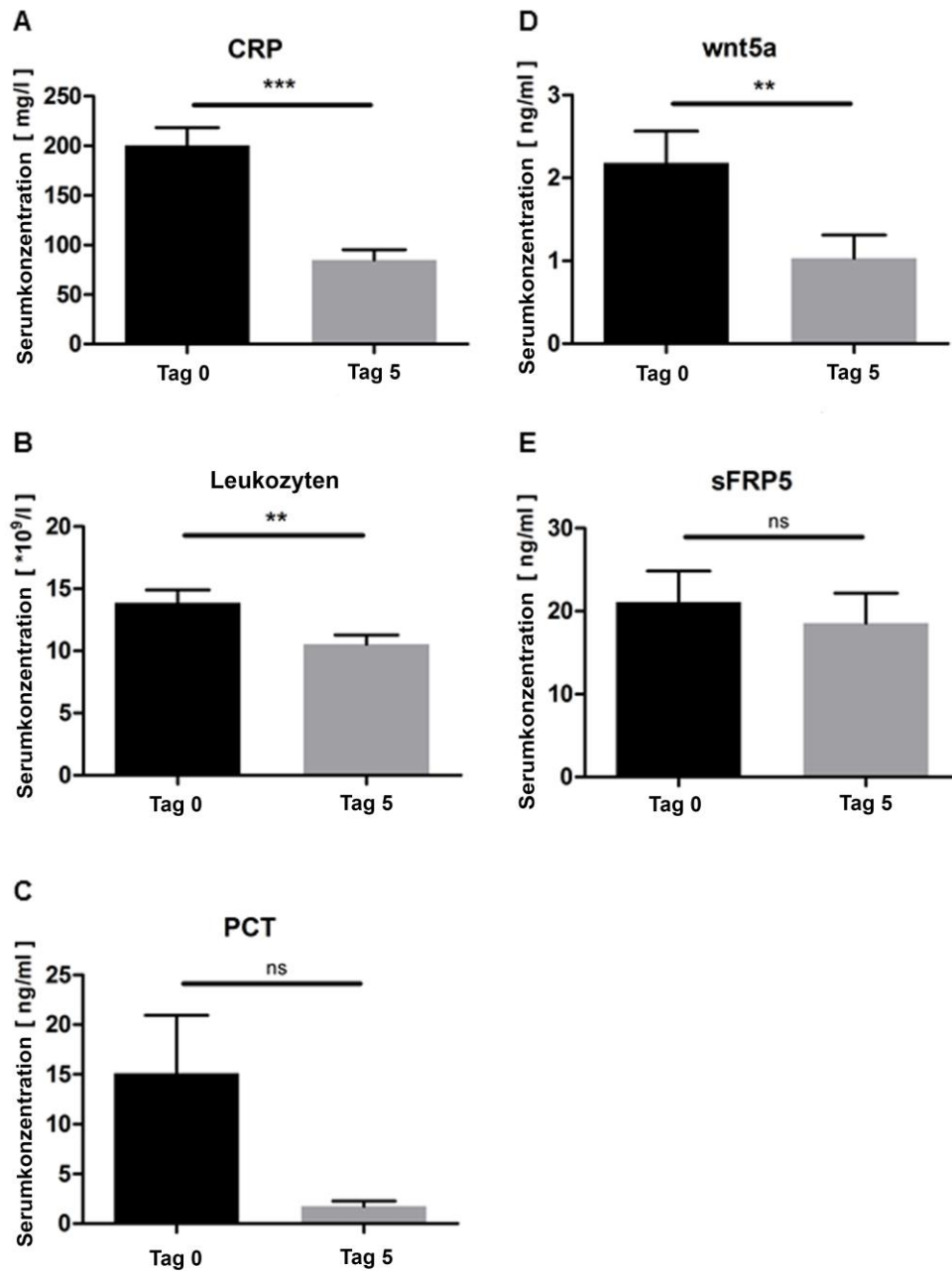


Abbildung 11: Vergleich von CRP (mg/l), Leukozytenzahl ($10^9/l$), PCT (ng/ml), wnt-5a (ng/ml) und sFRP-5 (ng/ml) bei Patienten der Gruppe A (n=38) an Tag 0 und Tag 5 nach Diagnose einer Sepsis

Daten: Mittelwert \pm SEM, *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$, $p < 0.05$ = signifikant, $p > 0.05$ = nicht signifikant

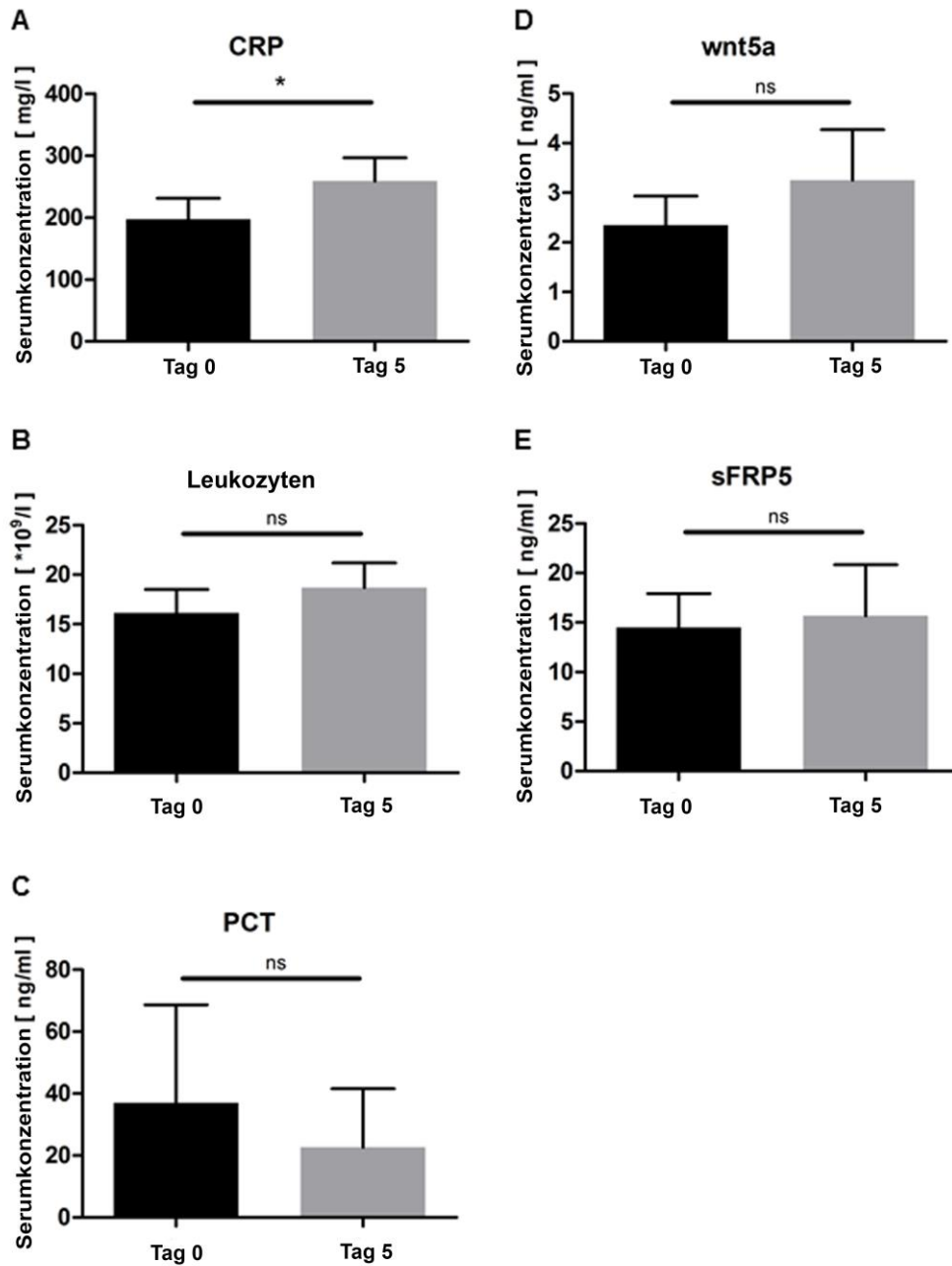


Abbildung 12: Vergleich von CRP (mg/l), Leukozytenzahl ($10^9/l$), PCT (ng/ml), wnt-5a (ng/ml) und sFRP-5 (ng/ml) bei Patienten der Gruppe B (n=10) an Tag 0 und Tag 5 nach Diagnose einer Sepsis
Daten: Mittelwert \pm SEM, ns= nicht signifikant, $p < 0.05$ = signifikant, $p > 0.05$ = nicht signifikant

5.7 Die wnt-5a-Serumkonzentration ist assoziiert mit Insulinresistenz bei Sepsis-Patienten

Die Glukose- und Insulin-Serumkonzentration der Sepsispatienten zum Zeitpunkt des Einschlusses in die Studie wurden zur Bestimmung der Insulinresistenz verwendet. Diese Berechnung erfolgte mittels HOMA-Index (Zur Berechnung, siehe 4.7). Für diese Analyse wurde die Kohorte in zwei Gruppen aufgeteilt. In die erste Gruppe wurden Patienten eingeteilt, die eine milde Insulinresistenz aufwiesen (HOMA ≤ 5). Der zweiten Gruppe wurden Patienten zugeteilt, bei denen eine schwere Insulinresistenz (HOMA >5) vorlag. Anschließend wurden die HOMA-Werte im Vergleich zu den bestimmten wnt-5a Serumkonzentrationen analysiert. Es zeigte sich, dass Patienten mit einer schweren Insulinresistenz signifikant höhere wnt-5a-Serumkonzentrationen im Gegensatz zu den Patienten mit leichter Insulinresistenz aufwiesen. In der Korrelations-Analyse von wnt5a und dem HOMA-Index zeigte sich eine signifikant positive Korrelation von wnt-5a und HOMA bei Sepsispatienten mit schwerer Insulinresistenz ($r_s=0.46$, $p=0.014$).

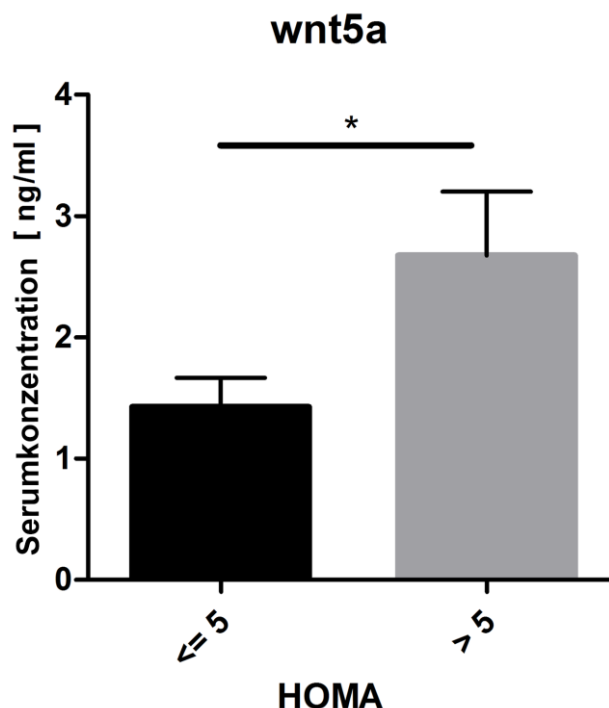


Abbildung 13: wnt5a – Serumkonzentration bei Sepsispatienten und Kontrollen mit normaler Glukosetoleranz oder milder Insulinresistenz (HOMA ≤ 5) vs. schwerer Insulinresistenz (HOMA > 5). Für die statistische Analyse wurde der Mann-Whitney U Test verwendet. Daten: Mittelwert \pm SEM, * $p < 0.05$.

5.8 Bei enteral ernährten Sepsis-Patienten sinken die wnt-5a-Werte schneller als bei parenteral ernährten Sepsis-Patienten

Am Tag 0 konnte kein wesentlicher Unterschied zwischen den Gruppen der enteral und der parenteral ernährten Patienten in Hinblick auf das wnt-5a beobachtet werden ($p=0,098$). Am Tag 5 waren die wnt-5a Serumspiegel der enteral ernährten Patienten signifikant niedriger (1.08 ± 0.27 ng/ml vs. 4.19 ± 1.03 ng/ml). Eine Gesamtübersicht über die Daten zu dieser Fragestellung ist unter 11.3 im Anhang zu finden.

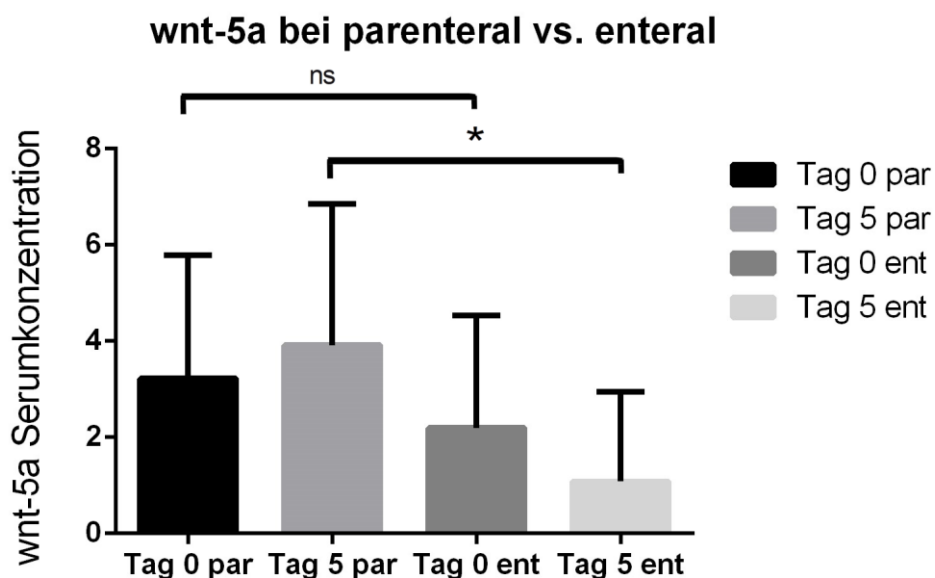


Abbildung 14, Vergleich der wnt-5a-Serumkonzentration bei Sepsis Patienten, die entweder vorwiegend (> 50 % des Grundumsatzes) enteral/oral (Tag 0 n=45, Tag 5 n=41) oder parenteral (Tag 0 n=10, Tag 5 n=7) ernährt wurden
 „par“= parenterale Ernährungsform, „ent“= enterale/orale Ernährungsform

6 Diskussion

6.1 Die Sepsis-Therapie

Die gängige Therapie des SIRS und der Sepsis umfasst laut der S-2k Leitlinien der Deutschen Sepsis-Gesellschaft (DSG) die Herdsanierung, die zügige Antibiotikagabe, die Stabilisierung des Kreislaufs, die Sauerstoffgabe, die Gabe von Infusionen, Einsatz von Medikamenten (insbesondere Katecholaminen) und ein erweitertes Monitoring [22] (Abbildung 15).

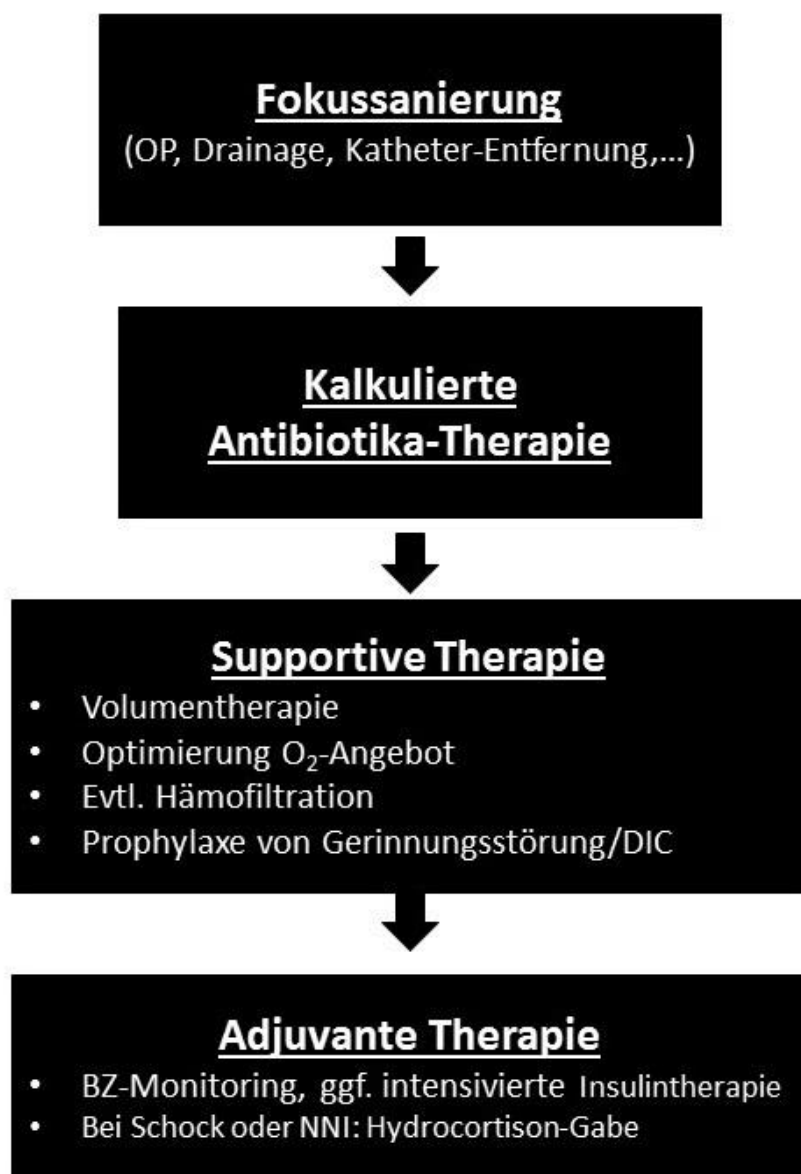


Abbildung 15: Therapie-Schema der Sepsis, erstellt in Anlehnung an die Leitlinie der „Deutschen Sepsis Gesellschaft (DSG)“ [22]

Von einer Therapie mit kausalem Ansatz ist man bei der Behandlung der Sepsis noch weit entfernt [28].

Sämtliche Studien zu neuen Behandlungsansätzen erbrachten negative Resultate, so dass ein Umdenken und eine Umorientierung zu gänzlich neuen Ansätzen notwendig erscheint, um neue Interventionsmöglichkeiten zu etablieren. Wichtige Gründe für das Scheitern dieser Therapieansätze, die sich thematisch mit innovativen Wirkstoffen auseinandersetzten, stellten Probleme im Studien-Design oder bei der Durchführungen der Studien dar [29-34]. Die basalen pathophysiologischen Mechanismen, die der Sepsis zugrunde liegen, wurden hierbei entweder nicht vollkommen verstanden oder fanden keine angemessene Berücksichtigung [35].

Die meisten bisherigen Therapieansätze der Sepsis betreffen das klassische Immunsystem und den Zytokinsturm. Neuere Überlegungen umfassen ein Biomarker-fundiertes therapeutisches Vorgehen und supportive Maßnahmen für das Immunsystem im Hinblick auf das T-Zell- „Erschöpfungs-Syndrom“ [36]. Andere Studien suggerieren die Unterdrückung von Apoptosen als einen neuen Behandlungsansatz [37].

Die hohe Mortalität ist nicht auf die Sepsis allein zurückzuführen, sondern auch auf die damit zusammenhängenden endokrinen und metabolischen Störungen [38]. Insbesondere die Insulinresistenz mit ihrer resultierenden Hyperglykämie scheint in kausalem Zusammenhang zu dem ausbleibenden klinischen Erfolg bei diesen Sepsispatienten zu stehen [6].

Darum besteht erhöhter Bedarf, die pathophysiologischen Mechanismen im Verlauf einer Sepsis-Erkrankung zu verstehen, die diese Verknüpfung von Immunsystem und Metabolismus nachweisen.

6.2 Bei an Sepsis erkrankten Menschen ist wnt-5a erhöht

Das proinflammatorischen wnt-5a und das anti-inflammatorische sFRP-5 [39,40] haben für die kalte Entzündung eine große Bedeutung [16]. Dabei konnte gezeigt werden, dass Konzentrationen von wnt-5a-Serumspiegel mittels ELISA quantitativ

gemessen werden können. In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals quantitativ gezeigt werden, dass es einen signifikanten Unterschied hinsichtlich des wnt-5a-Ausgangswertes zwischen den an Sepsis erkrankten Patienten und den Kontrollpersonen gab (Abbildung 8). Dieses Resultat entspricht dem lediglich qualitativem Ergebnis einer Publikation mit erhöhten wnt-5a Serumspiegeln bei Patienten mit schwerer Sepsis oder septischem Schock verglichen mit Kontrollen bei Nutzung von Immunpräzipitation und densitometrischen Analysen (Western Blot) [19].

6.3 Die Herkunft des wnt-5a

Unsere Studie kann nicht vollständig erklären, woher das wnt-5a stammt. Hinlänglich bekannt ist jedoch, dass die Makrophagen eine entscheidende Rolle in der primären Entzündungsreaktion bei Sepsis innehaben [41]. In einer früheren Studie konnte gezeigt werden, dass die proinflammatorischen Makrophagen wnt-5a sezernieren [9]. Daher ist anzunehmen, dass das wnt-5a aus dem Serum der an Sepsis Erkrankten mit einem Überschuss an aktivierten Gewebemakrophagen einhergeht [42]. Dieses wird noch durch die Tatsache bekräftigt, dass die wnt-5a Serumspiegel positiv mit den Leukozyten-Serumspiegeln an Tag 0 korrelierten (Abbildung 10). Diese Erkenntnis suggeriert, dass Leukozyten als Quelle für das erhöhte wnt-5a bei Patienten mit Sepsis angesehen werden können, was folglich als Beweis für die Verbindung von Immunzellen und wnt-5a gelten kann.

6.4 wnt-5a korreliert mit Insulinresistenz

Das erhöhte wnt-5a am Tag der Diagnose ist assoziiert mit der Insulinresistenz der Sepsis-Patienten [43,44]. Die Ergebnisse anderer Studien lassen vermuten, dass wnt5a die intrazelluläre Signaltransduktion von Insulinrezeptoren inhibieren kann [45]. Dieses wäre ein weiterer Beweis für die entscheidende Rolle des wnt-5a bei der Verknüpfung zwischen metabolischen und inflammatorischen Reaktionen in Hinblick auf die Sepsis.

In der vorliegenden Arbeit konnte durch die Analyse der Insulinresistenz mittels HOMA-Index gezeigt werden, dass es einen Zusammenhang zwischen wnt-5a-Serumspiegeln und der Insulinresistenz gibt. Der wnt-5a Konzentration zeigte sich bei Patienten mit schwerer Insulinresistenz signifikant erhöht gegenüber Patienten mit nur leichter Insulinresistenz. Dieses unterstützt abermals die Hypothese, dass wnt-5a ein entscheidender Faktor bei der Entstehung der kalten, metabolischen Inflammation ist.

6.5 wnt-5a in Korrelation zu den klassischen Entzündungsmarkern

Ein signifikanter Abfall der klassischen proinflammatorischen Marker wie Leukozyten, CRP und PCT zeigten einen guten Verlauf bzw. eine adäquate Therapie der Sepsis an. Auch die Wnt-5a Serumspiegel zeigten in diesen Fällen einen signifikanten Rückgang (Abbildung 11). Wnt-5a zeigt also die gleichen Verläufe wie die klassischen inflammatorischen Marker an. Hinzu kommt, dass der fallende wnt-5a-Serumspiegel eine sukzessive Beseitigung fehlgeleiteter metabolischer und inflammatorischer Reaktionen anzeigt, was seine Rolle in der Pathogenese der Sepsis und die damit verbundenen metabolischen Komplikationen erneut akzentuiert.

6.6 Das antiinflammatorische sFRP-5 bei Sepsis

Im Gegensatz hierzu zeigten die Serumkonzentrationen des sFRP-5 keine Veränderungen. Legt man die Reaktionen bei kalten Inflammationen zugrunde [16], hätte man bei den antiinflammatorischen Proteinen in der Gruppe der guten Sepsis-Verläufe mit einem Anstieg der Serumspiegel gerechnet (Abbildung 9). Das antiinflammatorische System scheint durch die akute, gravierende Entzündungsreaktion jedoch derartig destabilisiert zu sein, dass es weder steigende noch fallende Verläufe anzuzeigen vermag. Das sFRP-5, das als Inhibitor des wnt-5a fungiert, vermag seine Funktion bei Sepsis-Patienten nicht angemessen ausführen zu können. Bei Patienten mit Diabetes Mellitus Typ 2, also einer kalten, chronischen Entzündung, fand sich bei signifikant erhöhtem wnt-5a stets ein signifikant erhöhtes

sFRP-5, das als Kompensationsmechanismus angesehen wurde [17]. Dieser Effekt zeigte sich bei der Sepsis als Beispiel einer heißen Entzündung nicht.

Es führen also zwei pathophysiologische Faktoren zu einer Störung des metabolischen Systems: (1) Der Anstieg des wnt-5a und (2) die fehlende Kompensation durch den Inhibitor sFRP-5.

6.7 Parenterale vs. enterale Ernährungsform

Sepsis-Patienten sind in den seltensten Fällen in der Lage sich eigenständig zu ernähren [46]. Hinzu kommt, dass der kritische Gesundheitszustand bedingt durch die metabolischen Veränderungen den Bedarf einer adäquaten, situativ angepassten Ernährungsform zusätzlich erhöht. Die enterale Ernährung ist wegen des Erhalts der Darmzotten die anzustrebende intensivmedizinische Maßnahme. Sie ist nach Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Ernährungsmedizin (DGEM) gegenüber der parenteralen Ernährungsweise (PE) zu bevorzugen, da sie der physiologischere Weg der Ernährung ist, in der Regel mit geringeren Kosten verbunden ist und andererseits – mit Ausnahme einer Studie – auch keine spezifischen Vorteile für die PE aufgezeigt werden konnten [47]. Sofern also keine Kontraindikationen wie eine gestörte gastrointestinale Motilität vorliegen, ist die enterale Ernährungsweise indiziert [48]. Zudem konnte in einer Studie sogar eine reduzierte Mortalitätsrate unter enteraler Ernährung bei lebensbedrohlichem Gesundheitszustand gezeigt werden [49].

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit betonen nochmals die Wichtigkeit einer enteralen Ernährungsform und sind einer rein parenteralen Ernährung vorzuziehen. Dieses entspricht ebenfalls den Leitlinien der „Gesellschaft für die Ernährung kritisch kranker Patienten“ [50].

Somit lässt sich festhalten, dass Sepsispatienten unter enteraler Ernährung eine schnellere Reduktion des wnt-5a Serumspiegels erreichen, verglichen mit den Patienten, die parenteral ernährt werden. Jedoch ist in dieser Arbeit die Analyse limitiert durch die Tatsache, dass lediglich sieben der beobachteten Patienten parenteral ernährt wurden, während 41 Patienten enteral ernährt wurden bzw. sich selbstständig oral ernährten. Die parenteral ernährten Patienten gehörten in Mehrzahl (50%) der Gruppe an, bei der sich in den 5 Tagen keine Besserung bzw.

Verschlechterung der Erkrankung zeigte, während zu der Gruppe der enteral ernährten vorwiegend Patienten mit sich im Verlauf bessernden Parametern zeigten und nur wenige (9%) eine Verschlechterung zeigten.

6.8 Fazit

Die Therapiemöglichkeiten der Sepsis beschränken sich in ihrer Mehrzahl auf einen rein symptomatischen Ansatz. Möchte man neue Therapien erschließen, die die metabolischen Reaktionen der systemischen Inflammationsreaktion ebenfalls erfassen, so bleibt es unausweichlich die pro-/antiinflammatorischen Zytokine weiter zu untersuchen, um somit neue Ansätze für Therapien zu erhalten. Weitere Untersuchungen in Hinblick auf einen wnt-5a-Antikörper sollten durchgeführt werden, dessen modifizierende Wirkung auf den Krankheitsverlauf bei Patienten mit SIRS/Sepsis es dann zu analysieren gilt. Es könnte sich hierbei um ein potentielles therapeutisches Angriffsziel handeln, das möglicherweise den klinischen Erfolg der an Sepsis erkrankten Patienten verbessern könnte. Auch die Applikation des Gegenspielers sFRP-5 in rekombinanter Form wäre ein möglicher innovativer pharmakologischer Ansatz auf dem Weg zu einer kausalen Therapie der Sepsis.

Zusammengefasst konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die wnt-5a-Serumkonzentration im Verlauf einer Sepsis sinkt, wenn die Entzündungsreaktion einen rückläufigen Verlauf nimmt. Das sFRP-5 verliert bei Sepsispatienten seine in Hinblick auf die wnt-5a-Konzentration gegenregulierende Funktion. Das wnt-5a/sFRP-5-System stellt somit ein interessantes Thema für kommende wissenschaftliche Arbeiten und potentielles Angriffsziel für neue pharmakologische Therapien bei Sepsis dar.

7 Literaturverzeichnis

1. Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders. *Nature* 2006;444(7121):860-867.
2. Bilkovski R, Schulte DM, Oberhauser F, et al. Role of WNT-5a in the determination of human mesenchymal stem cells into preadipocytes. *The Journal of biological chemistry* 2010;285(9):6170-6178.
3. Tony L. Yaksh. Mediators and Mechanisms of Inflammatory Pain. In: Serhan CN, Ward PA, editors. *Fundamentals of Inflammation*. Cambridge; 2010. p. 217-233
4. Peter A. Ward. Acute and Chronic Inflammation. In: Serhan CN, Ward PA, editors. *Fundamentals of Inflammation*. Cambridge; 2010. p. 1-16
5. Calay ES, Hotamisligil GS. Turning off the inflammatory, but not the metabolic, flames. *Nature medicine* 2013;19(3):265-267.
6. Van Cromphaut SJ, Vanhorebeek I, Van den Berghe G. Glucose metabolism and insulin resistance in sepsis. *Current pharmaceutical design* 2008;14(19):1887-1899.
7. Sondergaard L. Homology between the mammalian liver and the *Drosophila* fat body. *Trends in genetics : TIG* 1993;9(6):193.
8. Medzhitov R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature* 2008;454(7203):428-435.
9. Bilkovski R, Schulte DM, Oberhauser F, et al. Adipose tissue macrophages inhibit adipogenesis of mesenchymal precursor cells via wnt-5a in humans. *International journal of obesity* 2011;35(11):1450-1454.

10. Nusse R, van Ooyen A, Cox D, Fung YK, Varmus H (1984). "Mode of proviral activation of a putative mammary oncogene (int-1) on mouse chromosome 15". *Nature* 307 (5947): 131–6
11. Nüsslein-Volhard C, Wieschaus E. Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature*. 1980 Oct 30;287(5785):795-801
12. Nusse, Roel; Varmus, Harold E. (1 June 1992). "Wnt genes". *Cell* 69 (7): 1073–1087
13. Brennan KR, Brown AM.J. Wnt proteins in mammary development and cancer, *Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2004 Apr;9(2):119-31.
14. Mason, J.O., Kitajewski, J., and Varmus, H.E. (1992). Mutational analysis of mouse Wnt-1 identifies two temperature-sensitive alleles and attributes of Wnt-1 protein essential for transformation of a mammary cell line. *Mol Biol Cell* 3, 521-533
15. Laudes M. Role of WNT signalling in the determination of human mesenchymal stem cells into preadipocytes. *Journal of molecular endocrinology* 2011;46(2):R65-72.
16. Schulte DM, Muller N, Neumann K, et al. Pro-inflammatory wnt5a and anti-inflammatory sFRP5 are differentially regulated by nutritional factors in obese human subjects. *PLoS one* 2012;7(2):e32437.
17. Lu YC, Wang CP, Hsu CC, Chiu CA, Yu TH, Hung WC, Lu LF, Chung FM, Tsai IT, Lin HC, Lee YJ. Circulating secreted frizzled-related protein 5 (Sfrp5) and wingless-type MMTV integration site family member 5a (Wnt5a) levels in patients with type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Metab Res Rev*. 2013 Oct;29(7):551-6.

18. Engel C, Brunkhorst FM, Bone HG et al. Epidemiology of sepsis in Germany: results from a national prospective multicenter study. *Intensive Care Med* 2007; 33: 606–618
19. Pereira C, Schaer DJ, Bachli EB, et al. Wnt5A/CaMKII signaling contributes to the inflammatory response of macrophages and is a target for the antiinflammatory action of activated protein C and interleukin-10. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2008;28(3):504-510.
20. Ursula Müller-Werdan, H.-P. Schuster. Abriss der Pathophysiologie als Grundlage der Therapie. In Werdan, Schuster, Müller, Werdan. *Sepsis und MODS*, 4. Aufl. Heidelberg; 2005. p. 23-61.
21. Reinhart K, Bloos F, Meier-Hellmann A et al. Sepsis und septischer Schock. In: Van Aken H, Reinhart K, Zimpfer M, Welte T, Hrsg. *Intensivmedizin*. 2. Aufl. Stuttgart: Thieme; 2007: 825–854
22. Reinhart K, Brunkhorst FM, Bone HG, et al. [Prevention, diagnosis, treatment, and follow-up care of sepsis. First revision of the S2k Guidelines of the German Sepsis Society (DSG) and the German Interdisciplinary Association for Intensive and Emergency Care Medicine (DIVI)]. *Der Anaesthesist* 2010;59(4):347-370.
23. Hillenbrand A, Weiss M, Knippschild U, Wolf AM, Huber-Lang M. Sepsis-Induced Adipokine Change with regard to Insulin Resistance. *International journal of inflammation* 2012; 2012:972368.).
24. Calandra T, Cohen J, International Sepsis Forum Definition of Infection in the ICUCC. The international sepsis forum consensus conference on definitions of infection in the intensive care unit. *Critical care medicine* 2005;33(7):1538-1548.
25. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from

- fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 1985; 28:412-9.
26. Rehman J, Considine RV, Bovenkerk JE, Li JL, Slavens CA, Jones R, March KL. Obesity is associated with increased levels of circulating hepatocyte growth factor. *J Am Coll Cardiol* 2003; 41:1408-13.
27. Harris, J. & Benedict F. (1918). A Biometric Study of Human Basal Metabolism. In: *Proc Sci U S a.*,4 (12), S. 370-373
28. Kotsaki A, Giamarellos-Bourboulis EJ. Emerging drugs for the treatment of sepsis. *Expert opinion on emerging drugs* 2012;17(3):379-391.
29. Cohen J, Opal S, Calandra T. Sepsis studies need new direction. *The Lancet infectious diseases* 2012;12(7):503-505.
30. Wenzel RP, Edmond MB. Septic shock--evaluating another failed treatment. *The New England Journal of Medicine* 2012;366(22):2122-2124.
31. Williams SC. After Xigris, researchers look to new targets to combat sepsis. *Nature medicine* 2012;18(7):1001.
32. Dolgin E. Trial failure prompts soul-searching for critical-care specialists. *Nature Medicine* 2012;18(7):1000.
33. Angus DC. The search for effective therapy for sepsis: back to the drawing board? *JAMA : the Journal of the American Medical Association* 2011;306(23):2614-2615.
34. Vincent JL. The rise and fall of drotrecogin alfa (activated). *The Lancet infectious diseases* 2012;12(9):649-651.
35. Ward PA. New approaches to the study of sepsis. *EMBO molecular medicine* 2012;4(12):1234-1243.

36. Hotchkiss RS, Monneret G, Payen D. Immunosuppression in sepsis: a novel understanding of the disorder and a new therapeutic approach. *The Lancet infectious diseases* 2013;13(3):260-268.
37. Harjai M, Bogra J, Kohli M, et al. Is suppression of apoptosis a new therapeutic target in sepsis? *Anaesthesia and intensive care* 2013;41(2):175-183.
38. Khardori R, Castillo D. Endocrine and metabolic changes during sepsis: an update. *The Medical Clinics of North America* 2012;96(6):1095-1105.
39. Rauch A, Mandrup S. Lighting the fat furnace without SFRP5. *The Journal of clinical investigation* 2012;122(7):2349-2352.
40. Mori H, Prestwich TC, Reid MA, et al. Secreted frizzled-related protein 5 suppresses adipocyte mitochondrial metabolism through WNT inhibition. *The Journal of clinical investigation* 2012;122(7):2405-2416.
41. Pereira CP, Bachli EB, Schoedon G. The wnt pathway: a macrophage effector molecule that triggers inflammation. *Current atherosclerosis reports* 2009;11(3):236-242.
42. Schaale K, Neumann J, Schneider D, et al. Wnt signaling in macrophages: augmenting and inhibiting mycobacteria-induced inflammatory responses. *European journal of cell biology* 2011;90(6-7):553-559.
43. Dhar A, Castillo L. Insulin resistance in critical illness. *Current opinion in pediatrics* 2011;23(3):269-274.
44. De La Rosa G, Vasquez EM, Quintero AM, et al. The potential impact of admission insulin levels on patient outcome in the intensive care unit. *The Journal of trauma and acute care surgery* 2013;74(1):270-275.

45. Ouchi N, Higuchi A, Ohashi K, Oshima Y, Gokce N, Shibata R, Akasaki Y, Shimono A, Walsh K. Sfrp5 is an anti-inflammatory adipokine that modulates metabolic dysfunction in obesity. *Science*. 2010, 329:454-457
46. Jeejeebhoy KN. Parenteral nutrition in the intensive care unit. *Nutrition reviews* 2012;70(11):623-630.
47. Kreymann G, Adolph M, Druml W, Jauch KW (2007) Leitlinie Parenterale Ernährung der DGEM: Intensivmedizin. *Akt Ernähr Med* 32:S89–S92
48. K.Mayer. Ernährung. In: G. Marx et al., Hrsg. *Die Intensivmedizin*. 12. Aufl. Heidelberg: Springer; 2015: 453–461
49. Codner PA. Enteral nutrition in the critically ill patient. *The Surgical clinics of North America* 2012;92(6):1485-1501.
50. Kreymann KG, Berger MM, Deutz NE, et al. ESPEN Guidelines on Enteral Nutrition: Intensive care. *Clinical nutrition* 2006;25(2):210-223.s

8 Verzeichnis der Tabellen

Tabelle 1	Klinische Parameter der rekrutierten Patienten	Seite 21
Tabelle 2	Gegenüberstellung antropometrischer und klinischer Parameter	Seite 22
Tabelle 3	Diagnosekriterien der Sepsis	Seite 23
Tabelle 4	Anleitung zur Vorbereitung der Proben für das ELISA-Verfahren	Seite 27
Tabelle 5	Anleitung zur Durchführung des ELISA-Verfahrens und Messung der Parameter	Seite 28
Tabelle 6	Übersicht über die eingesetzten Antibiotika	Seite 30
Tabelle 7	Korrelations-Analyse von wnt5a und sFRP-5 mit Leukozyten und Entzündungsparametern an Tag 0 und Tag 5	Seite 35

9 Verzeichnis der verwendeten Abbildungen

Abbildung 1	Die klassische Entzündungsreaktion und ihre Auswirkungen	Seite 12
Abbildung 2	Die Metaflammation und ihre Auswirkungen	Seite 13
Abbildung 3	wnt-5a/sFRP-5-Signalweg bei der „kalten Inflammation“	Seite 15
Abbildung 4	Wnt-Signalweg über „kanonischen“ und „nicht-kanonischen“ Signalweg	Seite 16
Abbildung 5	Der „nicht-kanonische“ wnt-5a-Signalweg	Seite 17
Abbildung 6	Effekt von Hyperglykämie auf die Mortalität von Patienten, die nicht auf der Intensivstation behandelt werden mussten (Non-ICU) und intensivpflichtigen Patienten (ICU)	Seite 19
Abbildung 7	Studienprotokoll	Seite 24
Abbildung 8	Wnt-5a Konzentration im Vergleich zwischen der Gruppe der Sepsispatienten und der Kontrollgruppe	Seite 31
Abbildung 9	sFRP-5 Konzentration im Vergleich zwischen der Gruppe der Sepsispatienten und der Kontrollgruppe	Seite 33
Abbildung 10	Korrelation der Konzentration von wnt5a und der Leukozytenzahl bei Sepsis an Tag 0	Seite 34
Abbildung 11	Vergleich von CRP (mg/l), Leukozytenzahl ($10^9/l$), PCT (ng/ml), wnt-5a (ng/ml) und sFRP-5 (ng/ml) bei Patienten der Gruppe A	Seite 36
Abbildung 12	Vergleich von CRP (mg/l), Leukozytenzahl ($10^9/l$), PCT (ng/ml), wnt-5a (ng/ml) und sFRP-5 (ng/ml) bei Patienten der Gruppe B	Seite 37
Abbildung 13	wnt5a – Serumkonzentration bei Sepsispatienten und Kontrollen mit normaler Glukosetoleranz oder milder Insulinresistenz ($HOMA \leq 5$) vs. schwerer Insulinresistenz ($HOMA > 5$)	Seite 38
Abbildung 14	Vergleich der wnt-5a-Serumkonzentration unter parenteraler vs. enteraler Ernährung bei Sepsis	Seite 39
Abbildung 15	Therapie-Schema der Sepsis, erstellt in Anlehnung an die Leitlinie der „Deutschen Sepsis Gesellschaft (DSG)“	Seite 40

10 Abstract

Sepsis and type 2 diabetes exhibit insulin resistance as a common phenotype. In type 2 diabetes we and others have recently provided evidence that alterations of the pro-inflammatory wnt5a/anti-inflammatory sFRP5 system are involved in the pathogenesis of insulin resistance. The aim of the present study was to investigate whether this novel cytokine system is dysregulated in human sepsis which may indicate a potential mechanism linking inflammation to metabolism.

In this single-centre prospective observational study, critically ill adult septic patients were examined and pro-inflammatory wnt5a and wnt5a inhibitor sFRP5 were measured in serum samples by ELISA at admission to the intensive care unit (ICU) and 5 days later. 60 sepsis patients were included and 30 healthy individuals served as controls.

Wnt5a levels were found to be significantly increased in septic patients compared to healthy controls (2.21 ± 0.33 ng/ml vs. 0.32 ± 0.03 ng/ml, $p < 0.0001$). In contrast, sFRP5 was not significantly altered in septic patients (19.72 ± 3.06 ng/ml vs. 17.48 ± 6.38 ng/ml, $p = 0.07$). On admission to the ICU, wnt5a levels exhibited a significant positive correlation with the leukocyte count ($r_s = 0.3797$, $p = 0.004$). Interestingly, in patients recovering from sepsis, wnt5a levels significantly declined within 5 days (2.17 ± 0.38 ng/ml to 1.03 ± 0.28 ng/ml, $p < 0.01$). In contrast, if sepsis was worsening, wnt5a levels increased in the same time period by trend (2.34 ± 0.59 ng/ml to 3.25 ± 1.02 ng/ml, $p > 0.05$). sFRP5 levels did not significantly change throughout the study period. The wnt5a/sFRP5 system is altered in human sepsis and might therefore be of interest for future studies on molecular pathophysiology of this common human disease.

11 Anhang

11.1 Verwendete Reagenzien & Material

Blutentnahme

Desinfektion: Neo – Kodan™ farblos Spray, der Firma S. und M. Schülke & Mayr, Ch.-B.: 1037059

Adapter: Multiadapter, der Firma Sarstedt Aktiengesellschaft & Co. Nümbrecht, Ch.-B.: 9220744 und 10990744

Monovetten: 10 ml S-Monovette™ 9 NC, der Firma Sarstedt Aktiengesellschaft & Co. Nümbrecht, Ch.-B.: 9196507C und 1002991C

Zentrifugation/ Bearbeitung der Serumproben

Zentrifuge: Heraeus Multifuge 1S-R (Temp.: 37°C, T: 1x 10 min.), der Firma Thermo Electron

Pipetten: Research Plus 500 ml und 1000 ml, der Firma Eppendorf

Pipetten-Spitzen: Quality Pipette Tips 100-1000 µl, der Firma Sarstedt

Lagerung

Reagiergefäße: 1ml aus PP, der Firma Sarstedt

Eisschrank: Thermo Scientific Herafreeze Basic, Temperatur -80°C (Model Nr.HFU486BASIC)

Messungen

ELISA Auswertung

Microplate washer: Thermo scientific

Absorptions-Messung: Berthold Technologies, Mithras LB 940

Auswertung: Graphpad Prism Version 6

Inkubator: Hera Cell 150, der Firma Thermo Electron ; Sterikult 200, der Firma Labotec, Göttingen

**11.2 Auswertung der Daten bezüglich „enteraler vs. parenteraler Ernährung“
hinsichtlich des Verlaufs der wnt-5a-Serumkonzentration**

Gruppe der enteral/oral ernährten Sepsis-Patienten			
n	wnt5a Tag 0	wnt5a Tag 5	Grundumsatz
1	5,737	6,949	1704,3
2	182	0,495	1049,8
3	3,717	0	1216,8
4	1264	0,407	1423,3
5	9,135	0	1787,9
6	5,582		1340
8	1808	0,012	1451,9
9	0,201	0	1001,4
11	2,043	0,426	1317,1
12	3,234	0	1513,4
15	0	0	937,6
16	0	0	1447,7
17	0,418	0	1485,7
18	4,135	0	970,8
20	0	0	1246,1
21	0,261	0	1382,3
22	0,317	0,475	1313,9
23	0,008	0,144	1624,9
24	1842	0,994	2034,5
25	2,068		1512,5
26	0,68	0,519	1170,8
28	1,722	0,055	1092,8
30	0,687	0,476	2122,9
31	2,859	0,019	2036,2
32	0,673	0,132	1042,2
33	0,004	0	2041,3
34	3,329	1,711	2268,9
35	0,178	0,123	1414,3
37	0,804	0,192	1589,1
38	1,348	0,466	970
39	0,339	0,496	1032
41	0,196		1451,9
42	1,561	1,382	1333,2
43	4,762	1,334	1559,3
44	4,541		1767,5
46	9,192	6,182	1707,7
47	0,377	0,029	1347,4
48	1,566	0,657	1693,7
49	3,372	5,661	1127
52	2,889	1,398	1672,7
54	4,389		1190,6
56	1,151	3,632	1178,8
58	6,691	5,644	1685,1
59	0	0,498	1127,2
60	1,969	2,754	1326,5
MW	2,19708889	1,08155	
STABW	2,30990778	2,0618232	
	0,34434072	0,3260029	
	n=45	n=40	

Gruppe der parenteral ernährten Sepsis-Patienten			
n	wnt5a Tag 0	wnt5a Tag 5	Grundumsatz
7	1,035	7,654	1223,6
10	0,925	0,671	1090
14	2,592	0	1466,9
19	4,283	7,019	1561,9
27	0,631		1432,5
29	5,436	4,996	1552,1
36	2,912		1387,1
50	2,853	2,888	1730,1
53	9,126		1921,9
57	2,462	4,187	1017,8
MW	3,2255	4,187	
STABW	2,42618694	2,72100337	
	0,76722767	1,02844261	
	n=10	n=7	

TTEST Tag0	TTEST Tag5
0,26451687	0,04358927

Einheiten: wnt-5a (ng/ml), Grundumsatz (kcal)

Anhang

n	m/w	Alter (Jahre)	Gewicht (kg)	Größe (cm)	„dropout“	Leukos Tag 0	Leukos Tag 5	CRP Tag 0	CRP Tag 5	PCT Tag 0	PCT Tag 5	wnt5a Tag 0	wnt5a Tag 5	sFRP5 Tag 0	sFRP5 Tag 5	Inf.fokus
1	m	64	85	180		24,95	29,85	224,2		100		5,737	6,949	23,324	24,809	Leber
2	w	69	60	160		14,17	11,8	86	115,9			1,82	0,495	4,79	2,14	Lunge
3	w	74	80	165		21,6	9,31	276,9				3,717	0	1,01	1,27	unklar
4	m	69	70	172		11,7	11,32	221	161,9	0,88		1,264	0,407	1,63	7,14	unklar
5	m	72	95	180		22,37	5,78	257,9	75,6			9,135	0	60,89	5,23	Lunge
6	w	70	90	165	gestorben	14,47		10,1		5,65		5,582		13,57		unklar
7	w	73	80	165			22,65		227,5		3,75	1,035	7,654	4,107	5,551	GIT
8	m	67	70	175		20,6	14,09		40,4	42,29		1,808	0,012	1,18	1,10	Niere
9	w	62	50	160		3,02	11,01	50,8	103,3	11,02		0,201	0	1,78	5,60	GIT
10	w	54	53	163		10,8	7,55	45,1	216,9	0,34		0,925	0,671	1,784	5,596	GIT
11	m	73	65	170		12,26	7,54	169,9		11,96		2,043	0,426	1,89	0,53	unklar
12	w	73	110	166		5,22	11,29	42,3	84,4	15,28	4	3,234	0	3,28	3,69	GIT
13	m	52	76	176	verlegt					12,84		3,624		10,691		Niere
14	m	67	70	178		26,46	23,98	342	320,8			2,592	0	21,852	4,292	Leber
15	w	84	58	165		15,32	16,99	210,3	72,9			0	0	1,56	3,30	unklar
16	m	82	76	178		11,78	4,05	175,1				0	0	12,12	9,74	untere Extremität
17	m	86	80	180		13,9	9,74	305	66,1	4,68		0,418	0	4,68	3,39	unklar
18	w	74	54	167		3,16	9,87		59,1			4,135	0	2,42	1,91	unklar
19	m	77	80	183		25,34	16,68	317,8	394,9	10,7	41,59	4,283	7,019	11,951	8,948	Niere
20	m	79	61	175		11,42	19,68	104,7	188,3			0	0	3,175	5,836	Lunge
21	m	73	69	172		7,44	7,05	165,1	30,4			0,261	0	8,44	5,50	GIT
22	m	72	65	168		7,42	6,8	80,1	53,1			0,317	0,475	40,68	43,03	unklar
23	m	72	85	175		7,69	8,35	313,6	168,4			0,008	0,144	23,31	22,41	Lunge
24	m	30	90	186		6,94	6,26		159,1	3,63	1,17	1,842	0,994	13,10	7,78	GIT
25	m	78	78	180	gestorben	18,44		178,1		0,67		2,068		14,944		Lunge
26	w	52	60	163		10,45	8,32	271,5	47,4	18,41		0,68	0,519	40,66	30,46	unklar
27	m	69	90	186	verlegt	12,67		227,8				0,631		7,205		GIT
28	w	64	60	165		16,1	17,68	63,9	56	0,28	0,11	1,722	0,055	11,22	10,34	GIT
29	m	58	75	169		19,02	14,4	323,6	244,3	12,38	1,97	5,436	4,996	21,92	43,55	Lunge

11.3 Patientencharakteristika Teil 1

Einheiten: CRP (mg/l), Leuko.= Leukozytenzahl (10⁹/l), PCT (ng/ml), wnt-5a (ng/ml), sFRP-5 (ng/ml)

(par= parenterale Ernährung, ent= enteral/orale Ernährung, Inf.fokus= Fokus der Infektion, m=männlich, w=weiblich)

Anhang

n	m/w	Alter (Jahre)	Gewicht (kg)	Größe (cm)	„dropout“	Leukos Tag 0	Leukos Tag 5	CRP Tag 0	CRP Tag 5	PCT Tag 0	PCT Tag 5	wnt5a Tag 0	wnt5a Tag 5	sFRP5 Tag 0	sFRP5 Tag 5	Inf.fokus
30	m	72	120	178		10,84		310,3		0,77		0,687	0,476	14,10	21,24	GIT
31	w	51	150	160		15,5		287		16,51		2,859	0,019	13,58	2,68	Niere
32	w	83	68	166		11,48		214				0,673	0,132	11,66	7,90	unklar
33	m	22	88	182		18,63	10,03	168,4	59,2			0,004	0	10,98	12,75	GIT
34	m	52	120	180		9,9		185,4				3,329	1,711	34,943	55,568	unklar
35	m	74	70	177				215,3				0,178	0,123	13,919	8,18	Niere
36	m	78	70	177	verlegt	18,02		81,3		3,3		2,912		45,367		unklar
37	m	73	80	183		7,84	4,96	6,3	17,1			0,804	0,192	18,33	17,09	GIT
38	w	75	55	165		26,66	5,35		52,9			1,348	0,466	7,51	4,95	Lunge
39	w	80	65	165		16,18	13,34	323,1	35,1	11,48		0,339	0,496	43,40	54,83	unklar
40	m	68	90	185	gestorben	23,63		78,1		6,48		5,096		58,437		Niere
41	m	67	70	175	verlegt							0,196		11,043		unklar
42	w	71	90	165		12,92	13,17		104,2			1,561	1,382	21,47	46,31	Niere
43	m	56	72	176		15	11,85		82,4	99		4,762	1,334	54,29	15,04	unklar
44	m	75	95	180		24,31	17,02	330,9	224,7			4,541		54,38		unklar
45	m	65	100	180	gestorben	28,51		44,8				1,063		39,589		Leber
46	m	46	80	170		23,82	4,12		12,6			9,192	6,182	80,00	79,48	GIT
47	w	81	98	168		11,3	11,02	290,7	114,7			0,377	0,029	4,38	2,50	unklar
48	m	44	78	170		24,23	6,6	328	145,1			1,566	0,657	29,25	21,78	Lunge
49	m	88	80	168		10,54	11,73	249,3	348,6			3,372	5,661	7,74	9,234	unklar
50	m	46	78	180		4,61	4,04	60,1	27,5	2,34	1,99	2,853	2,888	82,93	82,97	GIT
51	w		65	165	gestorben	13,66		128,2				3,077		11,322		unklar
52	m	69	83	186		10,61	9,36	190,1	31,8	2,7	1,14	2,889	1,398	0,36	48,58	Lunge
53	m	58	96	185	gestorben	24,66		226,3		8,14		9,126		4,496		GIT
54	w	58	65	170	verlegt	8,27		51,7		3,5		4,389		10,53		unklar
55	m	72	83	185	gestorben	23,16		180,8		>100		8,429		14,243		unklar
56	w	72	75	163		10,72	14,54	250,6	75,1			1,151	3,632	34,76	5,44	unklar
57	w	73	58	168		22,95	15,72	188,4	115,3	3,44		2,462	4,187	5,29	4,30	GIT
58	m	53	80	175		15,98	22,35	71,1	42			6,691	5,644	58,17	46,53	Lunge
59	w	66	65	165		13,52	13,67	179,4	37,4			0	0,498	0,32	3,58	Lunge
60	m	70	95	185		12,4	17,27	91	114,7			1,969	2,754	22,092	28,558	unklar

11.4 Patientencharakteristika Teil 2

Einheiten: CRP (mg/l), Leuko.= Leukozytenzahl (10⁹/l), PCT (ng/ml), wnt-5a (ng/ml), sFRP-5 (ng/ml)
 (par= parenterale Ernährung, ent= enteral/orale Ernährung, Inf.fokus= Fokus der Infektion, m=männlich, w=weiblich)

12 Lebenslauf

Name, Vorname: Kragelund, Dominik
Geburtsdatum/-ort: 06.07.1983 / Flensburg

Schulbildung: 1990 - 1994, Grundschule Ramsharde, Flensburg
1994 - 2000, Goethe Schule – allgemeines Gymnasium, Flensburg
2000 -2003, Hannah-Arendt Schule, Fachgymnasium für Ernährungsphysiologie Flensburg

Zivildienst: Zivildienst am Kreiskrankenhaus Rendsburg in der stationären Krankenpflege, Station „Innere Medizin, Schwerpunkt Diabetologie“
von/bis: 01.07.2003 – 30.04.2004

Berufstätigkeit 2004-2008 Servicekraft, freiberuflicher Tanzlehrer und als Sanitätshelfer bei der Johanniter-Unfall-Hilfe Kiel, seit 2010 als Extrawache im Schlaflabor des UKSH

Ehrenamtliche Arbeit Ausbilder in der Breitenausbildung (Erste-Hilfe-Ausbilder) und von Betriebshelfern bei der Johanniter- Unfall- Hilfe Kiel 2006-2009

Studium: Studium der Humanmedizin an der Christian-Albrechts-Universität Kiel
von/bis: 18.10.2008 – voraussichtlich Mai 2015

Praktisches Jahr: 1. Terial: Universitätsklinik Kiel, Radiologie
2. Terial: Westküstenklinikum Heide, Innere Medizin
3. Terial: Diakonie/Franziskus Klinikum Flensburg, Chirurgie
von/bis: Mai 2014 – April 2015

13 Publikation

Dominik M Schulte, **Dominik Kragelund**, Nike Müller, Gunnar Elke, Andrea Titz, Dirk Schädler, Jennifer Schumacher, Norbert Weiler, Burkhard Bewig, Stefan Schreiber, Matthias Laudes. (2014). The wnt5a/sFRP5 system is dysregulated in human sepsis. Clin Exp Immunol. 2014 Nov 10. doi: 10.1111/cei.12484. [Epub ahead of print]

Präsentation:

“Examination of the pro-inflammatory glycoprotein wnt-5a and its anti-inflammatory inhibitor sFRP-5 in patients suffering from sepsis”

15th Annual Meeting of "Young Active Research in Endocrinology" (YARE) in Hamburg, Oktober 2014

14 Danksagungen

Ich danke allen, die am Zustandekommen dieser Arbeit beteiligt waren.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, Prof. Dr. med. Matthias Laudes, für das in mich gesetzte Vertrauen bei der Überlassung des Themas, sowie für seine menschlich und wissenschaftlich stets hervorragende und freundliche Betreuung und Unterstützung.

Dr. med. Dominik Schulte danke ich für die ständige Hilfsbereitschaft, die fortlaufende Unterstützung, sowie für die gute Zusammenarbeit und Förderung.

Allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe danke ich für die Anregungen, die Hilfsbereitschaft und den regen wissenschaftlichen Austausch.

Bei allen Mitarbeitern der Klinik bedanke ich mich für die Hilfsbereitschaft, die gute Zusammenarbeit und die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Meinen Eltern, Großeltern und dem Rest meiner Familie danke ich für die Wertschätzung meiner Ausbildung und Arbeit, sowie für ihre liebevolle Unterstützung, welche mir alles bisher in meinem Leben Erreichte möglich gemacht hat.

Zu guter Letzt möchte ich meiner Verlobten, Wiebke Werner, danken, da sie zu jeder Zeit meines Studiums und meiner Dissertation, in Höhen und Tiefen, stets liebevoll zu mir gehalten hat.