

Lipidmediatoren

Quantifizieren ohne Nachweisgrenze?

In der Flüssigkeitschromatographie müssen Substanzen eindeutige Peaks liefern, um zweifelsfrei nachgewiesen werden zu können. Manche Forschende beachten dies nicht. Untaugliche Methoden stellen nun ein ganzes Forschungsfeld infrage.

Was muss erfüllt sein, damit in einer gas- oder flüssigkeitschromatographischen Methode ein Peak ausgewertet werden kann? Und sich damit also das Vorhandensein einer Verbindung in einer Probe belegen lässt (Nachweisgrenze)? Welche Bedingungen sind darüber hinaus zu erfüllen, damit dieser Peak integriert und so die Konzentration ermittelt werden kann (Bestimmungsgrenze)?

Zentrales Kriterium ist das Verhältnis der Signalhöhe des Peaks (Signal) und der des Rauschens (Noise) neben weiteren Validierungsparametern: Ist ein chromatographischer Peak erkennbar, der sich vom Hintergrundsignal abhebt (Abbildung 1)?

Richtlinien legen das minimale Signal/Rausch-Verhältnis (s/n) fest. Üblicherweise gilt die Substanzkonzentration, die zu einem Peak mit $s/n > 3$ führt, als Nachweisgrenze. Für die Bestimmungsgrenze liegt das minimale s/n zwischen 5 und 9.

Dieses Wissen ist Teil der Ausbildung der Chemiestudierenden im

Fach Analytische Chemie. Mit gutem Grund. Denn die Analytik von Pestizidrückständen in Lebensmitteln, Drogen- oder Dopinganalytik wäre beliebig, wenn jeder nach Gutdünken etwas im Chromatogramm integrieren und die so bestimmten mutmaßlichen Konzentrationen zur Grundlage von Befunden machen würde, die auch rechtlich hochrelevant sind.

In der biomedizinischen Grundlagenforschung zur Oxylinpin/Eicosanoid-Analytik scheint dieses Wissen in Vergessenheit geraten zu sein – zumindest bei der Messung von Fettsäurederivaten, die als specialized pro-resolving mediators (SPMs) bekannt wurden, etwa Resolvin E1 (Abbildung 1).

Die Gruppe der als SPMs bezeichneten Verbindungen ist über die Jahre gewachsen: Zunächst wurden Lipoxine beschrieben, es folgten Resolvine und schließlich Verbindungen wie Neuroprotektine und Maresine.¹⁾

Lipoxine und der Großteil der Resolvine sind dreifach hydroxylierte mehrfach ungesättigte Fettsäuren. Dazu gehören die Resolvine E1, E2, D1, D2. In jüngeren Jahren kamen zweifach hydroxylierte Verbindungen dazu, etwa Resolvin E3, E4, D5 und Protectin Dx.

Produktion von SPM durch deren mutmaßliche Rezeptoren. Demnach lässt sich mit den derzeitigen analytischen Methoden nicht nachweisen, dass dreifach hydroxylierte SPMs wie Resolvin E1 im menschlichen Körper – also in Körperflüssigkeiten, Geweben oder Zellen – oder in tierischen Modellsystemen vorkommen.¹⁾ Die Tatsache, dass genau diese SPMs dennoch in etlichen Publikationen beschrieben werden, geht auf eine irreguläre Praxis zur Bestimmung der Nachweisgrenze zurück.²⁾ *Science* und die *Nachrichten aus der Chemie* berichteten darüber (doi: 10.1126/science.abq8439 beziehungsweise 10.1002/nadc.20224132822).

Ein aktueller Artikel bestätigt diese Kritik:²⁾ „Failure to apply standard limit-of-detection or limit-of-quantitation criteria to specialized pro-resolving mediator analysis incorrectly characterizes their presence in biological samples“, lautet der Titel des Matters-Arising-Artikels in *Nature Communications*.²⁾ Wird das international akzeptierte s/n-Verhältnis zur Bestimmung genutzt, lässt sich somit nicht belegen, dass viele der SPMs in Proben vorkommen oder gar mit einer biologischen Wirkung im Zusammenhang stehen.

Betrachtet man die Situation differenzierter, scheinen sich die SPMs in zwei Klassen einteilen zu lassen: Für dreifach hydroxylierte SPMs fehlen Belege für Bildungswege, Signalwirkung und Vorhan-

Was ist messbar, was nicht?

In einem Review beschäftigten wir uns vor rund zwei Jahren mit Bildung, Nachweis und Signaltrans-

Diesen Beitrag haben Dieter Steinhilber, Karsten-H. Weylandt und Nils Helge Schebb verfasst. Steinhilber ist Professor für pharmazeutische Chemie an der Universität Frankfurt. Weylandt ist Professor für Gastroenterologie und arbeitet am Universitätsklinikum Ruppin-Brandenburg sowie der Fakultät für Gesundheitswissenschaften der Medizinischen Hochschule Brandenburg. Schebb leitet den Lehrstuhl für Lebensmittelchemie der Universität Wuppertal.

densein. Von den zweifach hydroxylierten Fettsäuren RvE3, RvE4 sowie RvD5 und PDx lassen sich – beispielsweise in humanen Makrophagen – zumindest geringe Mengen finden.³⁾

Reaktionen auf die Kritik

In ihrer Antwort auf den Matters-Arising-Artikel in *Nature Communications* beteuern die Autoren weiterhin, dreifach hydroxylierte SPMs bestimmen zu können.⁴⁾ Dabei zeigen sie allerdings Peaks, die schwerlich auswertbar sind (Abbildung 2). Ebenso nutzen sie ein nicht adäquates Mittel, um das Signal-zu-Rausch-Verhältnis zu bestimmen. Bei den gezeigten Chromatogrammen muss man kein Experte für analytische Chemie sein, um zu erkennen, dass sich die Fläche unter derartigen Peaks unmöglich reproduzierbar integrieren lässt.

Kritik an einer einzelnen Publikation und den darin enthaltenen Methoden ist in der Wissenschaft normal. Trotz hoher Standards der Review-Prozesse können manche Fehler und Fehlinterpretationen erst durch die Kritik der wissenschaftlichen Gemeinschaft korrigiert werden. Eben dafür gibt es Rubriken wie Matters Arising oder den Letter to the Editor.

Die Folgen für die Interpretation

Bei der SPM-Analytik ist aber nicht nur eine, sondern es sind zahlreiche Arbeiten betroffen und damit fast ein gesamtes Forschungsfeld. Dieses fiel über Jahre hinweg nicht auf, da mehrere Gruppen statt realer LC-MS-Daten Illustrationen als Abbildungen publizierten (Abbildung 2): Viele Arbeiten mussten nun als Folge der Diskussion korrigiert werden. Dabei wurden aber in den meisten Fällen die kritisierten Abbildungen lediglich entfernt.⁵⁻⁸⁾ Die in der Korrektur einer anderen Arbeit⁹⁾ immerhin gezeigt

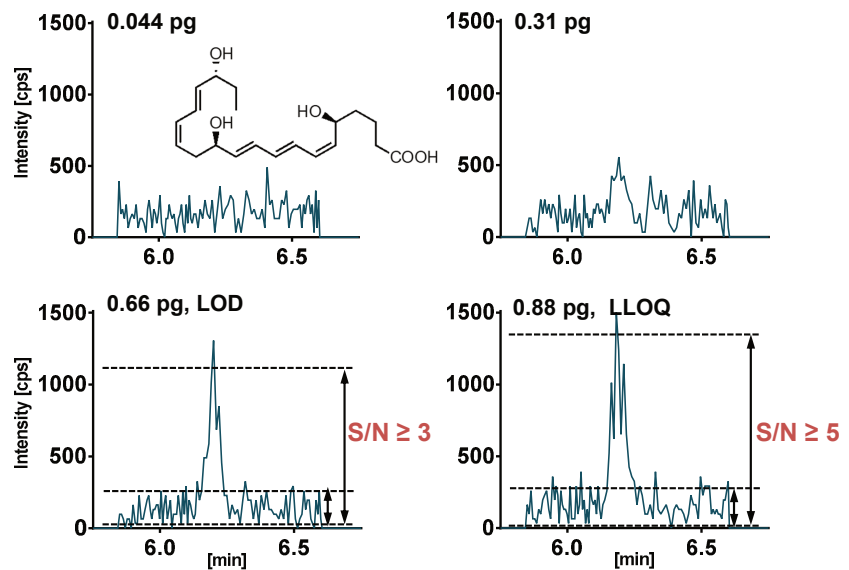
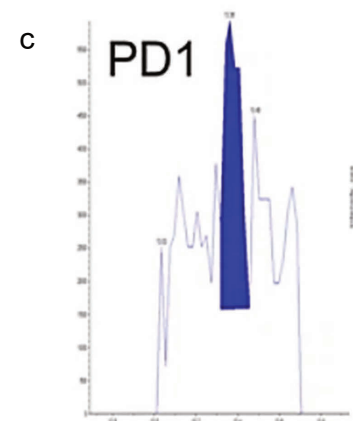
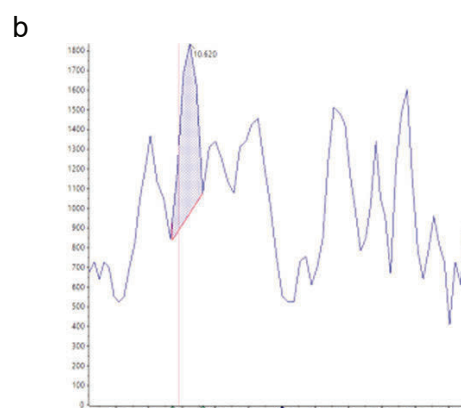
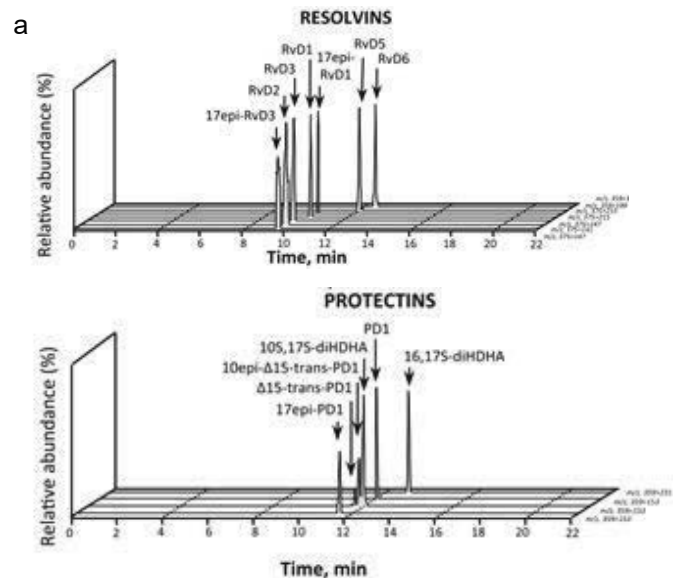


Abb. 1. LC-MS/MS-Chromatogramme zur Verdeutlichung des Signal/Rausch-Verhältnisses (s/n). Es wurden steigende Konzentrationen des Resolvins E1 (RvE1) injiziert. Dabei ist zunächst kein Peak zu erkennen. Bei einem s/n von 3 wird die Nachweisgrenze festgelegt, bei einem s/n > 5 die Bestimmungsgrenze.¹¹⁾ Zusätzlich ist die Strukturformel von RvE1 gezeigt.

Abb. 2. Vermeintliche Detektion von specialized proresolving lipid mediators (SPMs) in biologischen Proben.

a) Typische Illustration, die statt realer LC-MS-Chromatogramme in vielen Publikationen verwendet wurde und jetzt Gegenstand von Publikationskorrekturen ist (aus Lit. 12).

b, c) Reale LC-MS/MS-Daten (b: Resolvin D2⁴⁾ und c: Protectin PD1⁹⁾, die in Korrekturen zweier Arbeiten gezeigt sind, um das Vorkommen und die Relevanz von SPMs in biologischen Proben zu belegen.



ten Rohdaten-Peaks erscheinen aber – wie in der diskutierten Antwort in *Nature Communications* –⁴⁾ unmöglich valide quantitativ auswertbar (Abbildung 2).

Basierend auf der vermeintlichen Quantifizierung der SPMs zogen die Autor:innen in diesen beiden Publikationen Schlüsse zur Bedeutung von SPMs bei der Krankheitsentstehung von Rheuma⁴⁾ und HIV⁹⁾. Andere Arbeiten beschreiben in ähnlicher Weise die Rolle der SPMs bei einer Vielzahl pathophysiologischer Prozesse.

Klar ist: Viele Interpretationen lassen sich nicht aufrechterhalten, wenn die zugrundeliegende SPM-Analytik nicht valide ist.

Im Hinblick auf den wissenschaftlichen Fortschritt und unser Verständnis der Wirkung von Lipidmediatoren und ihrer Rolle in der (Patho-)Physiologie ist nun die

wissenschaftliche Gemeinschaft gefordert: Sie muss prüfen, welche Verbindungen tatsächlich vorkommen und aktive Lipidmediatoren sind.

Diesem Anspruch folgend wurde bereits eine Studie¹⁰⁾ im Hinblick auf die biologische Bedeutung der SPMs neu interpretiert. Dazu wurden die SPM-Chromatogramme unter Anwendung der international anerkannten Vorgaben nochmals ausgewertet (Preprint: doi: 10.1101/2023.03.06.530669): Die Autoren halten die SPM-Beobachtungen nun nicht mehr für wissenschaftlich belastbar.

Eine umfassende Neubewertung, welche Bedeutung die dreifach hydroxylierten SPMs haben und ob sie Botenstoffe der Entzündungslösung sind, steht aber noch aus. Hierbei gilt es nicht nur, sie in in biologischen Proben nachzuweisen, sondern auch die Bildungswege und die Signaltransduktion über Rezeptoren kritisch zu prüfen.

Vor diesem Hintergrund sollten Wissenschaftler:innen das SPM-Paradigma nicht unkritisch in die eigenen Texte übernehmen. Denn möglicherweise hat sich das SPM-Paradigma über die Jahre über solche Zitationsketten etabliert, weil problematische Originaldaten durch zahlreiche Reviews verstetigt und vervielfältigt wurden. So wurde ein für Außenstehende at-

traktives Konzept in der Literatur aufgebaut, obwohl es vielen auf diesem Gebiet Forschenden seit Jahren aufgrund der fragwürdigen Datenbasis problematisch erschien. ■

- 1) N. H. Schebb, H. Kuhn, A. S. Kahnt et al., *Front. Pharmacol.* 2022, 13, 838782, doi: 10.3389/fphar.2022.838782
- 2) V. B. O'Donnell, N. H. Schebb, G. L. Milne et al., *Nat. Commun.* 2023, 14(1), 7172, doi: 10.1038/s41467-023-41766-w
- 3) A. S. Kahnt, N. H. Schebb, D. Steinhilber, *Prostaglandins Other Lipid. Mediat.* 2023, 166, 106726, doi: 10.1016/j.prostaglandins.2023.106726
- 4) J. Dallı, E. A. Gomez, *Nat. Commun.* 2023, 14(1), 7293, doi: 10.1038/s41467-023-41767-9
- 5) K. S. Rathod, V. Kapil, S. Velmurugan et al., *J. Clin. Invest.* 2023, 133(2), doi: 10.1172/JCI168068
- 6) L. V. Norling, S. E. Headland, J. Dallı et al., *JCI Insight* 2023, 8(3), doi: 10.1172/jci.insight.168728
- 7) N. Chiang, S. Libreros, P. C. Norris, X. de la Rosa, C. N. Serhan, *J. Clin. Invest.* 2023, 133(2), doi: 10.1172/JCI168084
- 8) M. B. Flak, R. A. Colas, E. Munoz-Atienza et al., *JCI Insight* 2022, 7(20), doi: 10.1172/jci.insight.165600
- 9) N. T. H. Mai, N. Dobbs, N. H. Phu et al., *Elife* 2023, 12, doi: 10.7554/eLife.87888
- 10) M. P. Motwani, J. Newson, S. Kwong et al., *PLoS One* 2017, 12(10), e0186964, doi: 10.1371/journal.pone.0186964
- 11) L. Kutzner, K. M. Rund, A. I. Ostermann et al., *Front. Pharmacol.* 2019, 10, 169, doi: 10.3389/fphar.2019.00169
- 12) R. A. Colas, M. Shinohara, J. Dallı, N. Chiang, C. N. Serhan, *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 2014, 307(1), C39–54, doi: 10.1152/ajpcell.00024.2014

AUF EINEN BLICK

Bestimmten Fettsäurederivaten, den specialized proresolving mediators, wird eine biologische Funktion zugeschrieben.

Wie Forschungsergebnisse zeigen, basiert diese Annahme häufig auf wissenschaftlich falsch interpretierten Messergebnissen. Eine Neubewertung der Bedeutung dieser Substanzen ist nötig.

Ältere Publikationen sollten daher vor einer Zitation kritisch geprüft werden.

LEBENSWERKE
IN DER
CHEMIE




REAKTIONEN:

„Um es gleich vorweg zu nehmen – dieses Buch ist ein Pageturner“
M. Schnell, *Angew. Chem.*
[l-i-c.org/reviews](https://www.l-i-c.org/reviews)



AWARD:

Die Buchreihe wurde von der Stiftung Buchkunst ausgezeichnet.
[l-i-c.org/awards](https://www.l-i-c.org/awards)



NEU 2023:

Franz Effenberger: Von Aromaten zur Bio- und Nanotechnologie
Gerhard Ertl: My Life with Science (extended English ed.)
Horst Kessler: NMR – Mein Kompass in der Organischen Chemie

GDCh

FACHGRUPPE
GESCHICHTE
DER CHEMIE

twitter.com/livesinchem

HIER
BESTELLEN:
[l-i-c.org/order](https://www.l-i-c.org/order)

[L-I-C.ORG](https://www.l-i-c.org)