

4 Untersuchung der Zielverbindungen

4.1 Biochemische Testsysteme

4.1.1 Bestimmung der Enzymhemmung

Allen Testsystemen gemeinsam ist die Messung der spezifischen Enzymreaktion unter Ermittlung der Konzentrationsänderung mindestens eines Reaktionspartners. Hierzu wird entweder die Abnahme der Substrat- oder die Zunahme mindestens einer Produktkonzentration beobachtet. Die Reaktionen lassen sich an den isolierten Enzymen oder aber an intakten Zellen verfolgen.

Vorteile der von mir gewählten zellulären Tests lassen sich aus der Einordnung derselben ersehen. Man besitzt hier Testsysteme, die eine Stellung zwischen *in vitro*- und *in vivo*-Modellen einnehmen. Wie bei einem *in vivo* Test wird bei physiologischen pH-Werten gearbeitet. Durch das Fehlen der anderen Blutbestandteile (Albuminbindung), den unphysiologischen Zellstimulus und die Anwesenheit von DMSO kommen gleichzeitig auch *in vitro*-Bedingungen zum Tragen, welche durch eine verminderte Komplexität eine leichtere Auswertung der erhaltenen Daten ermöglichen. Da intakte Zellen aber trotz alledem komplexere Gebilde sind als isolierte Enzyme, lassen sich gleichzeitig Rückschlüsse für das *in vivo*-Verhalten der Inhibitoren ziehen. Eine erfolgte Hemmung des Enzyms ist immer auch mit der Information verbunden, dass der Hemmstoff in der Lage ist in die Zellen zu penetrieren und somit biologische Membranen zu überwinden. Diese für einen Inhibitor, der auch *in vivo* angewendet werden soll, unverzichtbare Eigenschaft lässt sich am isolierten Enzym nicht feststellen.

Von Nachteil bei den verwendeten Testsystemen ist jedoch, dass eine vermeintlich positive Hemmung auch über andere Mechanismen vermittelt worden sein kann. Ebenso kann eine unterbliebene Hemmung allein auf der Tatsache beruhen, dass die Verbindung die Mem-

bran nicht passieren kann. Letzteres kann zu einer Verzerrung der Struktur-Wirkungsbeziehungen führen, ist aber mit dem Ziel *in vivo* wirksame Verbindungen zu entwickeln gut vertretbar. Durch die Messung einer breiten Auswahl an Enzymen der AA-Kaskade, konnte die Fehlerquelle durch falsch positive Hemmung minimiert werden, da ein komplexeres Bild über den Hemmstoff entsteht als bei der Bestimmung nur eines Enzyms der Kaskade. Zusätzliche Messungen unter Zusatz von AA konnten auch Aufschluss über die Beeinflussung der nachfolgenden Enzyme bei gleichzeitiger cPLA₂-Hemmung bringen.

Die Verwendung humaner Ressourcen ist als vorteilig anzusehen, da die Daten aus Tests mit tierischen Zellen aufgrund der unterschiedlichen Enzymstrukturen nicht ohne weiteres auf den Menschen übertragbar sind.

4.1.2 Gewinnung der humanen Granulozyten und Thrombozyten

Als Quelle für die Blutzellen wurde das Citrat-Blut einer Probandin oder Eigenblut verwendet, da sich zeigte, dass insbesondere für den 12-LO/COX-1-Assay das wenige Stunden alte Citrat-Blut aus einem Pool von 20 Patienten des Benjamin Franklin Krankenhauses nicht geeignet war. Dieses beruht mit einer hohen Wahrscheinlichkeit auf der Medikation der Patienten, bei denen durch Gabe von NSAR bereits im Vorfeld in die AA-Kaskade eingegriffen wurde. Außerdem könnte auch das Alter der Blutproben eine Rolle gespielt haben. Die erzielten Ergebnisse des Bluts nur einer Probandin entsprachen für die 5-LO-Hemmung weitgehend denen des Bluts aus dem Pool. Das Problem des Nichterfassens interindividueller Schwankungen kann somit zwar nicht gänzlich ausgeschlossen werden, konnte aber damit als gering eingestuft werden. Neben der Nichteinnahme von NSAR war von weiterem Vorteil, dass das Blut sofort nach der Entnahme für die weitere Bearbeitung verfügbar war.

Die Gewinnung der Thrombozyten für die 12-LO/COX-1- und cPLA₂-Assays erfolgte in Anlehnung an die Arbeiten von Lehr [193]. Um das plättchenreiche Plasma zu gewinnen, wurde das Blut zunächst zentrifugiert. Das plättchenreiche Plasma wurde abgenommen und der Rückstand für die Gewinnung der Granulozyten beiseite gestellt. Aus dem plättchenreichen Plasma konnten dann in wenigen Arbeitsschritten die Thrombozyten isoliert werden.

Die Isolierung der Granulozyten erfolgte aus dem Rückstand der ersten Zentrifugation über ein käufliches Dichtemedium (Polymorphprep[®]), mit dem schnell, unter geringem Aufwand und geringer Belastung der Zellen in einem weiteren Zentrifugationsschritt die Granulozyten von den anderen Blutbestandteilen getrennt werden konnten.

4.1.3 Testsystem für die Bestimmung der 5-LO-Hemmung an humanen Granulozyten

Für die Bestimmung der 5-LO-Aktivität wurde das von Schwandt [146] für den Arbeitskreis etablierte Testsystem unter Verwendung humaner Granulozyten herangezogen. Granulozyten werden sehr häufig für derartige Untersuchungen verwendet [194][195][196], so dass eine gute Vergleichbarkeit der eigenen mit den publizierten Daten besteht. Neutrophile lassen sich nur mit größerem Aufwand von eosinophilen Granulozyten trennen. Aus diesem Grund werden für die Assays natürliche Gemische aus ca. 95% Neutrophilen und ca. 5% Eosinophilen verwendet. Diese beiden Zellarten werden in der Literatur als polymorphkernige Leukozyten (PMNL) zusammengefasst.

Als hauptsächliche LO-Produkte bilden neutrophile Granulozyten LTB₄ und 5-HETE. Daneben entstehen durch nichtenzymatische Hydrolyse in kleineren Mengen zwei all-*trans*- LTB₄-Isomere (6-*trans*- und 12-*epi*-6-*trans*-LTB₄) sowie 5,6-DiHETE-Gemische. Lehr [193] zeigt, dass durch gemeinsames Einwirken der 5-LO und der 12-LO von Thrombozyten, die als Verunreinigung in der Granulozyten-Präparation enthalten sein können, 5*S*,12*S*-DiHETE entsteht (**Abb. 4.1**). Hauptabbauprodukte sind in humanen Neutrophilen, im Gegensatz zu den meisten anderen Zellarten, 20-Hydroxy- und 20-Carboxy-LTB₄. Der 5-LO-Weg ist in PMNL der eindeutig dominierende Weg des AA-Stoffwechsels. Eosinophile produzieren im Unterschied zu Neutrophilen vor allem LTC₄. Der Anteil Eosinophiler an den PMNL ist jedoch vergleichbar gering, so dass LTC₄ im Testsystem keine Rolle spielt.

Die Enzymreaktion wird nach Vorinkubation einer Granulozyten-Suspension mit einer Calciumchlorid-Lösung durch Zugabe des Calciumkanalöffners Calciumionophor A23187 gestartet. Zum Abbruch der LT-Synthese wurde dann eine 1:1 Mischung Methanol/Acetonitril hinzugesetzt, die zusätzlich das starke Antioxidans NDGA sowie den inter-

nen Standard PGB₂ für die quantitative HPLC-Auswertung enthält. Die Aufarbeitung der Proben erfolgte nach der Methode von Verhagen [197] mit Hilfe von RP₁₈-Extraktions-säulen. Hierbei werden wässrig-polare Bestandteile des Testansatzes von der in reinem Methanol löslichen organischen Fraktion abgetrennt. Die im Methanoleluat enthaltene Menge an LTB₄ wurde anschließend durch RP₁₈-HPLC/UV-Analyse bestimmt. Auf das bei vielen Methoden beschriebene Einengen und die damit verbundene Wärmebelastung der Proben kann verzichtet werden, wenn man das Eluat vor der HPLC-Trennung mit demselben Anteil Wasser verdünnt. Dies führt dazu, dass die Elutionsstärke der erhaltenen Lösung deutlich geringer ist als die des verwendeten Fließmittels. Die fettlöslichen LT können sich so trotz der großen Probenauftragsmenge (2 mL) am Anfang der RP-Säule konzentrieren.

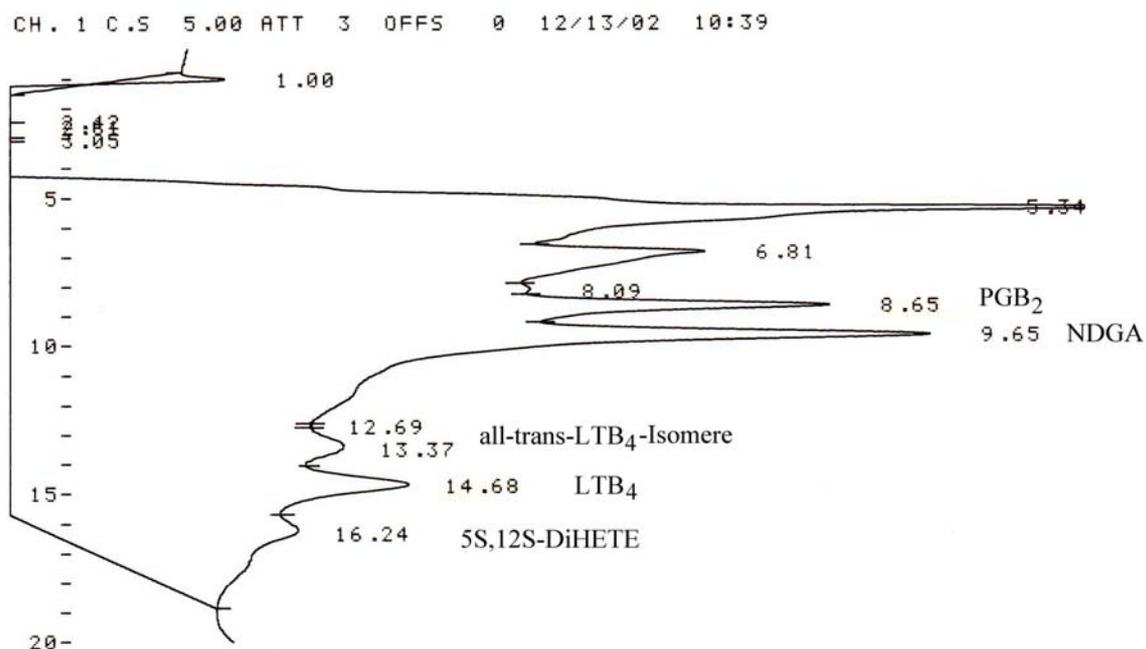


Abb. 4.1: RP₁₈-HPLC-Chromatogramm der von humanen Granulozyten nach Stimulierung mit Calciumionophor produzierten AA-Metaboliten: Fließmittel: THF/MeOH/H₂O/AcOH (25:30:45:0.1), mit 3N-NH₃ auf pH 5.5 eingestellt. Flussrate: 1.0 mL/min, Absorption bei 280 nm.

4.1.4 Etablierung eines Testsystems zur Bestimmung der 12-LO- und COX-1-Hemmung an humanen Thrombozyten

Als Vorlage für die Etablierung eines Testsystems zur Bestimmung der 12-LO- und COX-1-Hemmung diente eine Methode von Lehr an Rinderthrombozyten [193], welche auf humane Thrombozyten übertragen werden sollte. In Abweichung von vielen anderen Anwendung findenden Verfahren [198][199] wurde nicht PGE₂ als Messgröße herangezogen sondern 12-HHT. Es handelt sich hierbei um die einzige Verbindung des COX-Weges, die aufgrund eines konjugierten Diensystems bei höherer Wellenlänge (232 nm) detektiert werden kann. Es konnte daher wie zuvor bei der LTB₄-Bestimmung ein HPLC/UV-Verfahren angewendet werden [200].

In Thrombozyten sind Thromboxan B₂ (TXB₂) und 12-HHT die Hauptprodukte des COX-Weges. Sie entstehen aus PGH₂, in einer durch die Thromboxansynthase katalysierten Reaktion, annähernd im Verhältnis 1:1. Etwas 12-HHT kann außerdem beim nichtenzymatischen Zerfall von PGH₂ gebildet werden. Die primären Prostaglandine PGE₂, PGD₂ und PGF_{2α} werden in den Thrombozyten nur in geringen Mengen produziert. Simultan produzieren die Thrombozyten auch 12-HETE, welches das bei gleicher Wellenlänge detektierbare Produkt des 12-LO-Weges darstellt.

Im Gegensatz zur 5-LO der Granulozyten müssen die COX-1 und 12-LO der Thrombozyten nicht speziell aktiviert werden. Voraussetzung für die Enzymreaktion ist allein das Vorhandensein von AA. Der Zusatz von Calciumionophor A23187 dient somit nur der Aktivierung der Phospholipasen zur Freisetzung endogener AA.

Die Initiierung der Enzymreaktion und die Isolierung der gebildeten Eicosanoide erfolgten auf die gleiche Weise wie bei der Bestimmung der 5-LO-Hemmung. Die Inkubationszeit wurde von fünf auf drei Minuten verkürzt. Experimente von Lehr [193] zur Bildungskinetik von 12-HHT und 12-HETE zeigten in Übereinstimmung mit entsprechenden Versuchen an Pferdethrombozyten [201], dass die Konzentrationszunahme dieser Metaboliten nur in der ersten Minute nach dem Start linear erfolgt. Eine Reaktionszeit von einer Minute erwies sich allerdings als unpraktikabel, so dass sie auf drei Minuten ausgedehnt wurde, wobei keine deutlichen Abweichungen bei den ermittelten Hemmwerten auftraten. Der bei dem von mir verwendeten Verfahren ermittelte IC₅₀-Wert für Indometacin beträgt 0.0049 μM (0.0030-0.0079 μM) und liegt damit in der gleichen Größenordnung wie der von Lehr ermittelte IC₅₀-Wert von 0.0025 μM. Um die Synthese des von Lehr verwendeten

internen Standards zu umgehen, wurde nach einem anderen geeigneten käuflichen internen Standard gesucht. Wichtig für die Auswahl eines internen Standards sind folgende Kriterien [202]:

- Die Retentionszeit muss so liegen, dass gleichzeitig keine andere Substanz eluiert wird.
- Der Peak sollte möglichst nahe bei dem Peak der zu untersuchenden Substanz liegen.
- Er sollte der zu untersuchenden Substanz chemisch ähnlich sein.
- Seine Anwesenheit in der ursprünglichen Analyse sollte mit Sicherheit ausgeschlossen werden können.
- Er darf auch bei höheren Temperaturen keine Reaktion mit einer anderen Komponente des Analysengemisches eingehen.

Die Wahl fiel bei den Überlegungen auf PGB₂. Dieses ist zum einen wie 12-HHT und 12-HETE ein Metabolit der AA, zum anderen wird es in den Thrombozyten nicht selbst gebildet. Der Substanzpeak lässt sich deutlich von den anderen Peaks unterscheiden und Reaktionen mit anderen Komponenten des Analysengemisches waren nicht zu erwarten. Der Peak liegt nicht weit von dem 12-HHT-Peak entfernt, allein der Abstand zum 12-HETE-Peak ist relativ groß (**Abb. 4.2**).

Als Nachteil des beschriebenen Testsystems ist anzusehen, dass eine verminderte Bildung von 12-HHT nicht unbedingt eine Hemmung der COX-1 bedeuten muss, da nicht unmittelbar das Produkt der COX-Reaktion PGH₂ bestimmt wird sondern erst das aus der nachfolgenden Thromboxansynthase-Reaktion hervorgehende 12-HHT. Bei den ermittelten Hemmstoffen kann es sich also genauso gut um Hemmstoffe der Thromboxansynthase handeln.

Eine Möglichkeit dieses Problem zu umgehen bestände in einem weiteren Test, bei dem durch Hemmung der Thromboxansynthase die Konzentration an PGH₂ deutlich erhöht wird und dieses dann vermehrt über die alternativen Stoffwechselwege abgebaut wird. Das daraufhin vermehrt gebildete PGE₂ kann dann HPLC-analytisch unter UV-Detektion bei 192 nm bestimmt werden. Probleme traten auf, da eine deutliche Trennung der Analysenmischung nicht erfolgreich war. Da die COX-1-Hemmung zunächst als zusätzliche Komponente und nicht aus Hauptinteresse untersucht wurde, wurde die weitere Etablierung eines PGE₂-Assays wieder eingestellt.

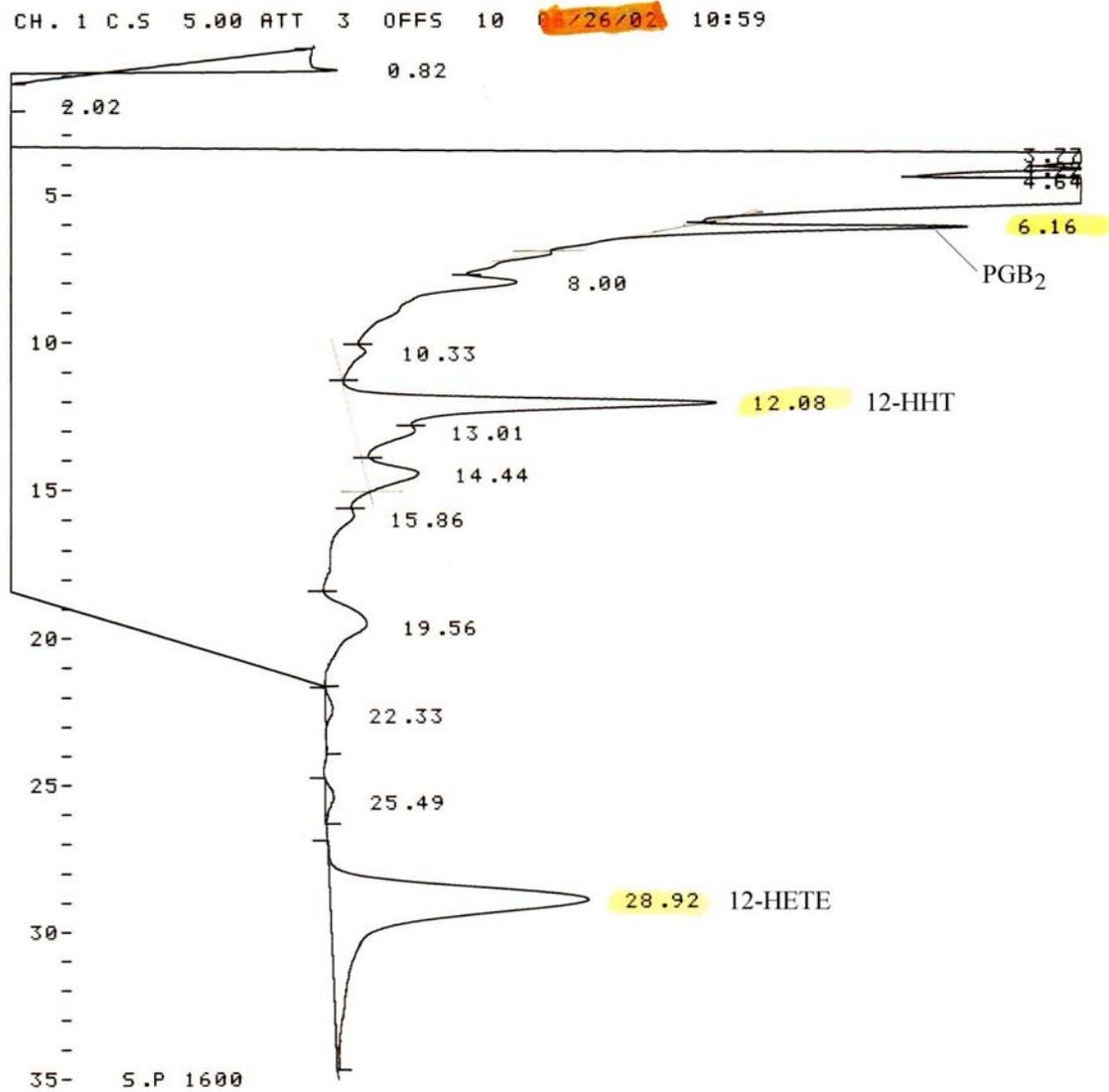


Abb. 4.2: RP₁₈-HPLC-Chromatogramm der von humanen Thrombozyten nach Stimulierung mit Calciumionophor produzierten AA-Metaboliten: Fließmittel: MeOH/H₂O/AcOH (70:30:0.1) mit 3N-NH₃ auf pH 5.5 eingestellt, Flussrate: 0.7 mL/min, Absorption bei 232 nm.

4.1.5 Etablierung eines Testsystems für die Bestimmung der cPLA₂-Hemmung an humanen Thrombozyten

Ausgangspunkt für die Entwicklung eines Assays für die Bestimmung der cPLA₂-Hemmung war die Beobachtung, dass einige Hemmstoffe alle drei untersuchten Enzyme unselektiv hemmten. Die Frage, die sich an dieser Stelle stellte war, ob es sich bei diesen Hemmstoffen wirklich um unselektive Hemmstoffe aller drei Enzyme handelte oder ob nicht vielmehr die Freisetzung der AA aus den endogenen Speichern unterbunden wurde. Eine verminderte Bereitstellung von AA kann im Umkehrschluss für alle die Verbindungen ausgeschlossen werden, die mindestens einen Stoffwechselweg der AA nicht hemmen. Es wurde somit eine Vorauswahl der Stoffe getroffen, die für den cPLA₂-Assay in Frage kamen.

Die Enzymreaktion wurde analog einer Methode von Lehr [203] entwickelt. Ausgehend von einer Thrombozytensuspension, der zur Hemmung der LO und COX der unselektive Hemmstoff ETYA zugesetzt wurde, so dass die AA in der Zelle angereichert werden kann und somit als Messgröße zur Verfügung steht, wird nach Temperierung auf 37°C die Freisetzung der AA durch Calciumionophor A23187 eingeleitet. Nach drei Minuten wurde die Enzymreaktion wieder mit einer entsprechenden Stopperlösung abgebrochen, die Eicosa-pentaensäure (EPA) als internen Standard enthält. Auch hier wurde ein eigener interner Standard ausgewählt um eine Synthese des in der Originalliteratur verwendeten Standards zu umgehen. EPA ist chemisch eng verwandt mit AA. Sie enthält lediglich eine Doppelbindung mehr. Durch Aktivierung der Zellen mit Calciumionophor wird selektiv AA freigesetzt, so dass das Vorhandensein von EPA im Analysengemisch ausgeschlossen werden kann. Auch die anderen in 4.1.4 aufgeführten Kriterien für die Wahl eines internen Standards wurden durch EPA erfüllt. Das resultierende Chromatogramm ist in **Abb. 4.3** dargestellt.

Nachteil des verwendeten Testsystem ist auch hier, dass ermittelte Hemmwerte nicht unbedingt auf eine Hemmung der cPLA₂ zurückzuführen sein müssen. Es könnte sich zum Beispiel auch um einen Calciumkanalblocker handeln, der die Öffnung der Calciumkanäle durch das Calciumionophor verhindert. Durch den unterbleibenden Einstrom von Calcium in die Zelle kann die cPLA₂ nicht aktiviert werden.

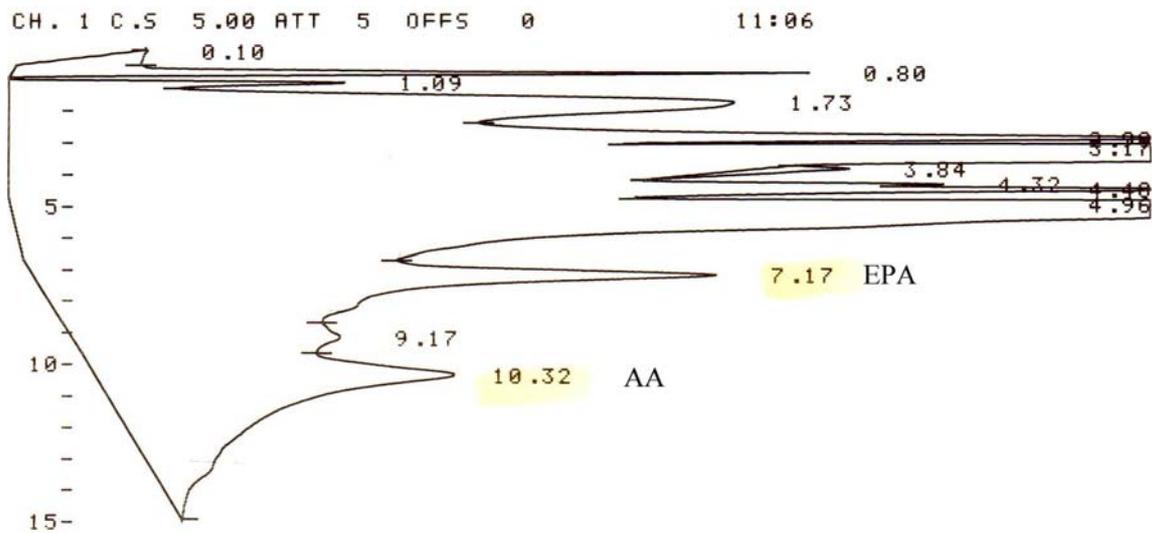


Abb. 4.3: RP₁₈-HPLC-Chromatogramm der von humanen Thrombozyten nach Stimulierung mit Calciumionophor produzierten AA nach vorangegangener Hemmung der nachgeschalteten Enzyme der AA-Kaskade durch ETYA: Fließmittel: (NH₄)₃PO₄ (10 μM)/MeCN (1:1) mit Phosphorsäure auf pH 7.4 eingestellt, Flussrate: 1.0 mL/min, Absorption bei 200 nm.

4.1.6 Etablierung von Testsystemen zur Bestimmung der 5-LO- und 12-LO/COX-1-Hemmung, die unabhängig von der endogenen Freisetzung von AA sind

Um bei den ermittelten cPLA₂-Hemmern eine Aussage auch über ihre Hemmung der LO und COX treffen zu können, wurden exemplarisch an einigen Verbindungen weitere Testverfahren angewendet, bei denen durch die exogene Zugabe von AA eine endogene Freisetzung durch die cPLA₂ keine Rolle mehr spielt. Die Assays wurden in Anlehnung an die Arbeiten von Lehr [193] entwickelt und laufen bis auf den Zusatz der exogenen AA analog zu den in 4.1.3 und 4.1.4 beschriebenen Verfahren.

4.2 Messung der antioxidativen Kapazität

Schwandt [146] konnte nachweisen, dass bei den von ihm entwickelten 5-LO-Inhibitoren die antioxidative Kapazität nicht mit der 5-LO-Hemmung korreliert. So stellten sich einige potente Hemmstoffe als nur schwache Antioxidantien heraus. Daraus ergibt sich, dass die Zuordnung der Substanzklasse zu den 5-LO-Inhibitoren vom Redox-Typ nicht aufrecht erhalten werden konnte. Aufgrund der differenzierteren Untersuchung der Verbindungen auf ihren Einfluss auf die AA-Kaskade sollte geprüft werden, in wieweit die in dieser Arbeit entwickelten Verbindungen die Ergebnisse von Schwandt bestätigen und ob die Beeinflussung der unterschiedlichen Enzyme denselben Mechanismen unterliegen.

Als Messverfahren zur Erfassung der Redox-Kapazität der Zielverbindungen wurde die Methode von Popov et al. [204][205] eingesetzt. Im Unterschied zur gut etablierten DPPH-Methode [206] wurde im Arbeitskreis Wurm das neuere Verfahren als selektiver und, durch den Einsatz des O-zentrierten Superoxidradikals im Gegensatz zum N-zentrierten DPPH-Radikal, als den physiologischen Gegebenheiten einer Zelle besser entsprechend angesehen. Darüber hinaus ist die Methode im Vergleich mit dem DPPH-Verfahren besonders geeignet um auch starke und sehr starke Antioxidantien differenziert quantifizieren zu können.

Die Reaktionseinheit des auf dem Markt befindlichen Messgeräts für die Methode von Popov (**Abb. 9.1**) besteht aus zwei miteinander in Verbindung stehenden Kammern. In der ersten Kammer werden Superoxidradikale ($O_2^{\bullet-}$) durch UV-Bestrahlung einer mit O_2 gesättigten Luminol-Lösung generiert. Diese reaktive Sauerstoffspezies reagiert mit Luminol in der zweiten, dunklen Zelle unter Chemolumineszenz(CL)-Entwicklung. Das CL-Signal wird verstärkt und registriert. Befindet sich im System eine antioxidative Verbindung ($O_2^{\bullet-}$ -Quencher), so kommt es zur CL-Schwächung bzw. -Löschung. Die antioxidative Kapazität wird dabei als Lag-Phase in Sekunden gemessen. Schwache Antioxidantien zeigen positive Lag-Phasen im Konzentrationsbereich von 10^{-6} mol/L, starke im Bereich von 10^{-7} mol/L. Negative Lag-Phasen gegenüber dem Blindwert charakterisieren eine prooxidative Wirkung.

4.3 Bestimmung der Lipophilie

Die Lipophilie einer Verbindung ist entscheidend für die Aufnahme eines Wirkstoffes in die Zelle. Sofern keine spezifischen oder unspezifischen Transportsysteme für die Überwindung der Membranbarriere vorhanden sind, ist die Lipophilie der einzige Faktor, der für das Penetrieren durch die Membran eine Rolle spielt. Die Charakterisierung der Lipophile erfolgt über den Verteilungskoeffizienten P (Partition Coefficient).

$$P = [\text{Octanol}]/[\text{Wasser}]$$

Das Zweiphasensystem Octanol/Wasser wird dabei als ein Modell für Verteilungsvorgänge zwischen biologischen Lipid- und wässrigen Phasen angesehen [207]. Als Alternative zu der aufwendigen Standard-Ausschüttelmethode (shake flask method) [208] gilt das schnelle, genaue und nur wenig Substanzmenge benötigende HPLC-Verfahren [209][210]. Grundlage ist der lineare Zusammenhang zwischen dem logarithmierten Kapazitätsfaktor ($\log k'$) als säulenchromatische Kenngröße einer Verbindung und dem ebenfalls logarithmierten Verteilungsfaktor ($\log P$).

$$\log k' \sim \log P$$

Dabei ist k' definiert als das Verhältnis der Aufenthaltsdauer einer Substanz in der stationären Phase (t_s) und in der mobilen Phase (t_m):

$$k' = t_s/t_m = (t_{m+s} - t_m)/t_m$$

t_{m+s} : Gesamt-Retentionszeit bzw. Elutionszeit einer von der stationären Phase zurückgehaltenen Substanz

t_s : Netto-Retentionszeit

t_m : Totzeit bzw. Elutionszeit einer von der stationären Phase nicht zurückgehaltenen Substanz