

8 Biochemisch-experimenteller Teil

8.1 Material

8.1.1 Reagenzien und Materialien

Acetonitril (HPLC-Qualität)	Acros
Aqua bidest.	Eigene Herstellung
Calciumionophor A 23187 (freie Säure)	Sigma
DMSO (p.a.)	Acros
ETYA	Cayman Chemical/Alexis
Glaszentrifugenröhrchen (15 mL)	Werkstätte Chemie Photo
HPLC-Säule	Licrospher [®] 100-RP-18 endcapped (5 µm) LiChroCART [®] 125-4/Fa. Merck
Humanblut	Eigenblutspende
Interne Standards für die HPLC-Bestimmung	
EPA	Cayman Chemical/Alexis
PGB ₂	Cayman Chemical/Alexis
MAFP	Cayman Chemical/Alexis
Methanol (HPLC-Qualität)	Acros
Mikroliterpipetten	
0.5-10.0 µL	Brandt
5-50 µL	Roth
200-1000 µL	Roth
NDGA	Sigma
Polymorphprep [™]	Life Technologies

Referenzsubstanzen

Arachidonsäure	Cayman Chemical/Alexis
5-HETE	Sigma
12-HETE	Cayman Chemical/Alexis
12-HHT	Cayman Chemical/Alexis
LTB ₄	Sigma
RP ₁₈ -Extraktionssäulen	Bakerbond spe* Octadecyl C ₁₈ , 6 mL, 500 mg, Fa. Baker und Chromabond C18, 6 mL, 500 mg, Fa. Machery & Nagel
THF (HPLC-Qualität)	Acros
Vorsäulenkartuschen	Licrospher [®] 100-RP-18 endcapped (5 µm) LiChroCART [®] 4-4/Fa. Merck

8.1.2 Lösungen

Alle verwendeten Salze wurden von der Firma Acros in p.a.-Qualität bezogen.

Ammoniumhydrogenphosphat-Puffer (10 mM)

(NH ₄) ₂ HPO ₄	1.3206 g
Aqua bidest.	ad 1000 mL mit Phosphorsäure auf pH 7.4 eingestellt

Calciumchlorid-Lösung

CaCl ₂ ·2 H ₂ O	0.147 g
NaCl	0.800 g
Aqua bidest.	ad 100 mL

Calciumionophor-Lösung

4.2 mg/mL DMSO (≅ 20 µM Calciumionophor im Testansatz)

EDTA-Lösung

37.22 mg EDTA-Na₂·2 H₂O/mL

EDTA-PBS-Lösung	
EDTA-Na ₂ ·2 H ₂ O	112 mg
Isotonische PBS-Lösung	ad 100 mL
ETYA-Lösung (1.19 mg/μL)	
ETYA-Stammlösung	23.8 μL
DMSO	ad 1000 μL
ETYA-Stammlösung	
50 mg/mL Ethanol	
Lösungen der Testsubstanzen	
100 μM Testansatz	40 μmol/mL DMSO
10 μM Testansatz	4 μmol/mL DMSO
1 μM Testansatz	0.4 μmol/mL DMSO

8.1.3 Lösungen zur Enzyminhibierung

LTB ₄ -Bestimmung	
PGB ₂	20 μg
NDGA	0.60 mg
Methanol	50 mL
Acetonitril	50 mL
12-HETE/12-HHT-Bestimmung	
PGB ₂	60 μg
NDGA	0.3 mg
Acetonitril/Methanol (1:1)	ad 50 mL
Arachidonsäure-Bestimmung	
EPA	96 μg
NDGA	0.576 mg
EDTA-Lösung	6 mL
Methanol	90 mL
Acetonitril	96 mL

8.1.4 Fließmittel

LTB₄-Bestimmung

THF/Methanol/Aqua bidest./Essigsäure (25:30:45:0.1 (V/V))

mit 3N NH₃ auf pH 5.5 eingestellt

12-HETE/12-HHT-Bestimmung

Methanol/Aqua bidest./Essigsäure (70:30:0.1 (V/V))

mit 3N NH₃ auf pH 5.5 eingestellt

Arachidonsäure-Bestimmung

Ammoniumhydrogenphosphat-Puffer 1000 mL

Acetonitril 99.93 % (HPLC-Qualität) 1000 mL

Halbisotonische Kochsalzlösung

NaCl 4.50 g

Aqua bidest. ad 1000 mL

Isotonische PBS-Lösung

NaCl 8.00 g

KCl 0.02 g

Na₂HPO₄ 0.89 g

NaH₂PO₄·2 H₂O 0.17 g

KH₂PO₄ 0.20 g

Aqua bidest. ad 1000 mL

mit 3N NH₃-Lösung auf pH 7.4 eingestellt

8.2 Geräte

Zentrifuge

Hettich Rotana

Magnetrührer mit Heizplatte

Ikamag RCT (IKA-Labortechnik)

Reagenzglasschüttler

REAX 2000 (Heidolf)

Zellzählgerät	Sysmex Microcellcounter F-300 und Auto-Diluter AD-260
Mikroskop	Olympus CH Japan 675294
Zählkammer	Neubauer Improved; 0.1 mm Tiefe; 0.0025 mm ² (Assistent Germany)
Extraktionssystem	Baker spe 12G System
HPLC-Anlage	
Pumpe	Merck Hitachi L-6200 Intelligent Pump
UV-Detektor	Merck Hitachi D-4250 UV-Vis Detector
Integrator	Merck Hitachi D-2500 Chromato Integrator
Injektionssystem	Rheodyne 7125

8.3 Methoden

8.3.1 Zellisolierung

Vorbereitung zur Zellisolierung

Die Zellisolierung erfolgte bei RT. Dazu wurde das humane Blut (venöses Blut mit 10 % Citratlösung als Antikoagulans) auf Glaszentrifugengläser verteilt und 10 min bei 280 g zentrifugiert. Bei allen Arbeitsgängen wurde die Einwirkung von direktem Sonnenlicht vermieden.

Nach der Zentrifugation wurde das plättchenreiche Plasma mit einer Pasteurpipette abgeerntet. Das plättchenreiche Plasma wurde für die Gewinnung der Thrombozyten, der verbleibende Rückstand für die Gewinnung der Granulozyten verwendet.

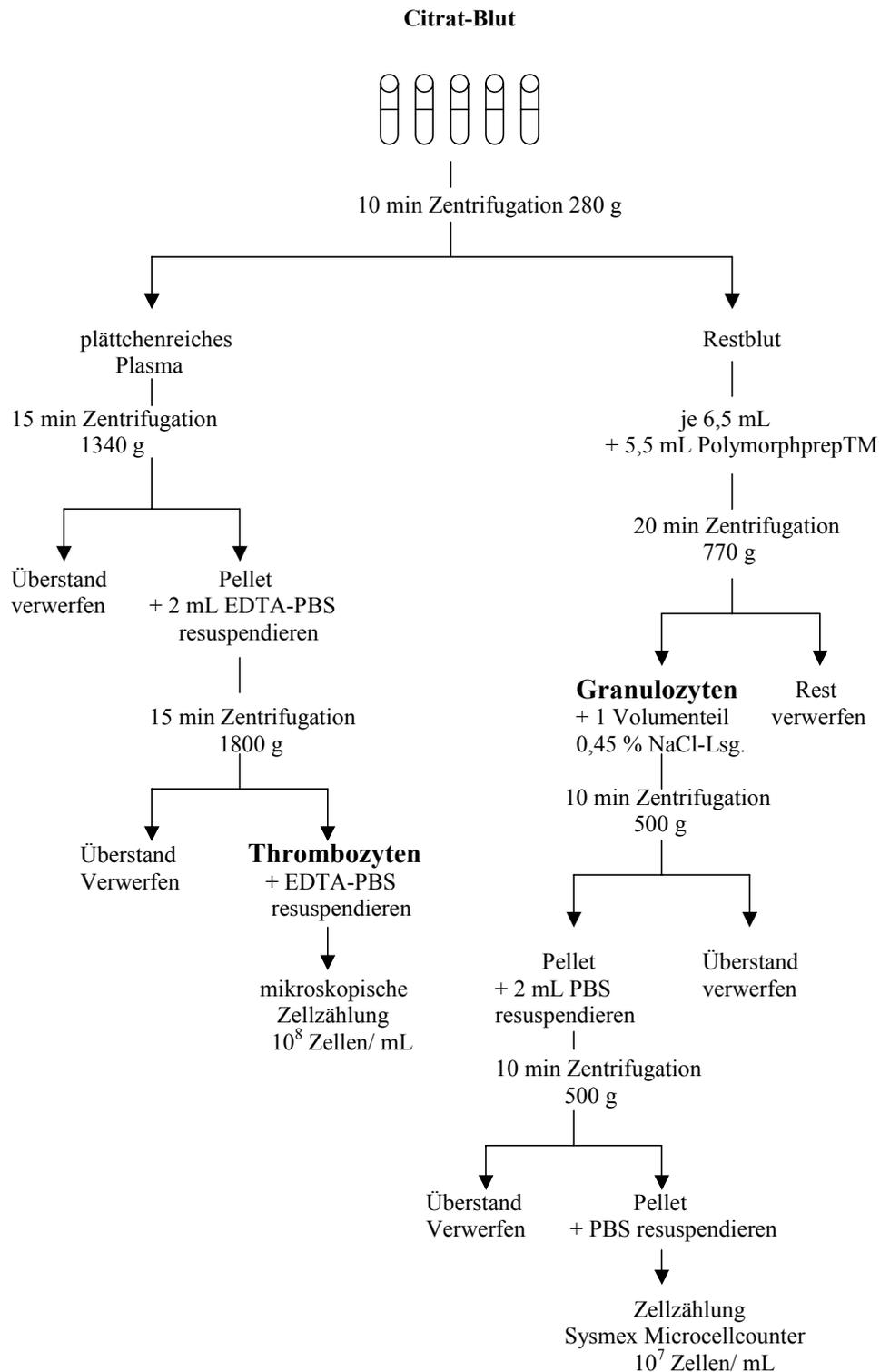


Abb. 8.1: Flussdiagramm zur Zellisolierung aus humanem Vollblut.

Isolierung der Granulozyten

Für die Isolierung der Granulozyten [222][223] wurden jeweils 5.5 mL Polymorphprep® in Glaszentrifugengläsern vorgelegt und anschließend mit 6.5 mL des bei der Vorbereitung erhaltenen Rückstands vorsichtig überschichtet [224]. Es wurde dann 20 min bei 770 g zentrifugiert. Die untere Leukozytenschicht wurde mit einer Pasteurpipette aus je drei Zentrifugengläsern geerntet und in ein neues überführt. Zur Wiederherstellung des osmotischen Drucks wurde ein Volumenteil 0.45 %ige Kochsalzlösung hinzugegeben und 10 min bei 500 g zentrifugiert. Nach Dekantieren des Überstandes wurde das Pellet mit 3 mL isotonischer PBS-Lösung resuspendiert und erneut 10 min bei 500 g zentrifugiert. Abschließend wurde das erhaltene Granulozytensediment nochmals mit isotonischer PBS-Lösung resuspendiert und auf eine Zellzahl von 10^7 Zellen/mL eingestellt.

Die Zellzählung erfolgte mit dem Sysmex Microcellcounter.

Isolierbare Granulozytenzahl: ca. 1.5×10^8 /100 mL Blut.

Isolierung der Thrombozyten

Zur Isolierung der Thrombozyten [203] wurde das bei der Vorbereitung abgeerntete plättchenreiche Plasma auf Glaszentrifugengläser aufgeteilt und erneut 15 min bei 1340 g zentrifugiert. Der erhaltene Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 2 mL EDTA-PBS-Lösung resuspendiert. Anschließend wird 15 min bei 1800 g zentrifugiert. Der Überstand wurde ebenfalls verworfen, das Pellet abschließend mit EDTA-PBS-Lösung sorgfältig resuspendiert und auf eine Zellzahl von 10^8 Zellen/mL eingestellt.

Die Zellzählung erfolgte mikroskopisch unter Zuhilfenahme einer Neubauer-Zählkammer.

8.3.2 Bestimmung der 5-Lipoxygenase-Hemmung

Assay

0.8 mL der eingestellten Granulozytensuspension wurden in Glaszentrifugengläschen vorgelegt. Um einem Sedimentieren der Zellen entgegenzuwirken, wurden die Probengefäße alle 3 min leicht geschüttelt. Nach Zusatz von jeweils 2.5 µL Testsubstanzlösung bzw. 2.5 µL DMSO für die Kontrollmessung

(DMSO-Endkonzentration: 0.25 % (V/V)) wurde 10 min im Wasserbad bei 37°C vorinkubiert. Im folgenden Schritt wurden 0.2 mL CaCl₂-Lösung hinzugegeben (Ca-Endkonzentration: 2 mM) und die Proben wurden weitere 5 min bei 37°C inkubiert. Die Stimulierung der Zellen wurde nun durch Zugabe von 2.5 µL Calciumionophor-Lösung (Endkonzentration: 20 µM) gestartet. Die Bildung der 5-LO-Produkte wurde dann nach 5 min Inkubation bei 37°C durch Zusatz von 1 mL Lösung zur Enzyminhibition für die LTB₄-Bestimmung (Endkonzentrationen: NDGA 10 µM; PGB₂ 0.3 µM) gestoppt. Unmittelbar im Anschluss wurden die Reaktionsgefäße mindestens 2 h bei -20°C gelagert.

Aufarbeitung der Proben

Zur Abtrennung der Zellen wurden die Inkubationsgemische 3 min bei 3300 g zentrifugiert. Die Überstände wurden mit 10 mL Aqua bidest. verdünnt und über RP₁₈-Extraktionssäulen, welche zuvor mit 10 mL Methanol sowie 5 mL Aqua bidest. gewaschen wurden, aufgereinigt. Nach zweimaligem Waschen der Säulen mit 5 mL Aqua bidest. wurden die Eicosanoide mit 3 mL Methanol [225] eluiert. Das Eluat wurde dann mit 3 mL Aqua bidest. verdünnt und der Gehalt an LTB₄ HPLC-analytisch bestimmt.

HPLC-Bestimmung

Jeweils 2 mL Probelösung wurden auf die RP-HPLC-Säule injiziert [226].

8.3.3 Bestimmung der 12-Lipoxygenase- und Cyclooxygenase-1-Hemmung

Assay

0.8 mL der eingestellten Thrombozytensuspension wurden in Glaszentrifugengläschen vorgelegt. Um einem Sedimentieren der Zellen entgegenzuwirken, wurden die Probengefäße alle 3 min leicht geschüttelt. Nach Zusatz von jeweils 2.5 µL Testsubstanzlösung bzw. 2.5 µL DMSO für die Kontrollmessung (DMSO-Endkonzentration: 0.25 % (V/V)) wurde 10 min im Wasserbad bei 37°C vorinkubiert. Im

folgenden Schritt wurden 0.2 mL CaCl₂-Lösung hinzugegeben (Ca-Endkonzentration: 2 mM) und die Proben wurden weitere 5 min bei 37°C inkubiert. Die Stimulierung der Zellen wurde nun durch Zugabe von 2.5 µL Calciumionophor-Lösung (Endkonzentration: 20 µM) gestartet. Die Bildung der 12-LO- und COX-1-Produkte wurde dann nach 3 min Inkubation bei 37°C durch Zusatz von 1 mL Lösung zur Enzyminhibition für die 12-HETE/12-HHT-Bestimmung (Endkonzentrationen: NDGA 10 µM; PGB₂ 1.8 µM) gestoppt. Unmittelbar im Anschluss wurden die Reaktionsgefäße mindestens 2 h bei -20°C gelagert.

Aufarbeitung der Proben

Zur Abtrennung der Zellen wurden die Inkubationsgemische 3 min bei 3300 g zentrifugiert. Die Überstände wurden mit 10 mL Aqua bidest. verdünnt und über RP₁₈-Extraktionssäulen, welche zuvor mit 10 mL Methanol sowie 5 mL Aqua bidest. gereinigt wurden, aufgereinigt. Nach zweimaligem Waschen der Säulen mit 5 mL Aqua bidest. wurden die Eicosanoide mit 3 mL Methanol eluiert. Das Eluat wurde dann mit 3 mL Aqua bidest. verdünnt und der Gehalt an 12-HETE und 12-HHT HPLC-analytisch bestimmt.

HPLC-Bestimmung

Jeweils 2 mL Probelösung wurden auf die RP-HPLC-Säule injiziert.

8.3.4 Bestimmung der cPLA₂-Hemmung

Assay

1 mL der eingestellten Thrombozytensuspension wurden in Glaszentrifugengläschen vorgelegt. Um einem Sedimentieren der Zellen entgegenzuwirken, wurden die Probengefäße alle 3 min leicht geschüttelt. Nach Zusatz von jeweils 2.5 µL Testsubstanzlösung bzw. 2.5 µL DMSO für die Kontrollmessung (DMSO-Endkonzentration: 0.25 % (V/V)) und 2.5 µL ETYA-Lösung zur Hemmung der

Lipoxygenasen und Cyclooxygenasen wurde 10 min im Wasserbad bei 37°C vorinkubiert. Die Stimulierung der Zellen wurde nun durch Zugabe von 2.5 µL Calciumionophor-Lösung (Endkonzentration: 20 µM) gestartet. Die Freisetzung der AA wurde dann nach 3 min Inkubation bei 37°C durch Zusatz von 1 mL Lösung zur Enzyminhibition für die AA-Bestimmung (Endkonzentrationen: NDGA 5 µM; EPA 0.8 µM) gestoppt. Unmittelbar im Anschluss wurden die Reaktionsgefäße mindestens 2 h bei -20°C gelagert.

Aufarbeitung der Proben

Zur Abtrennung der Zellen wurden die Inkubationsgemische 3 min bei 3300 g zentrifugiert. Die Überstände wurden mit 7.5 mL Aqua bidest. verdünnt und über RP₁₈-Extraktionssäulen, welche zuvor mit 10 mL Methanol sowie 5 mL Aqua bidest. gewaschen wurden, aufgereinigt. Nach Waschen der Säulen mit 5 mL Aqua bidest. wurde die AA mit 3 x 0.5 mL Methanol eluiert. Das Eluat wurde dann mit 3.5 mL Aqua bidest. verdünnt und der Gehalt an AA HPLC-analytisch bestimmt.

HPLC-Bestimmung

Jeweils 2 mL Probelösung wurden auf die RP-HPLC-Säule injiziert.

8.3.5 Bestimmung der 5-Lipoxygenase-Hemmung unter Zusatz von Arachidonsäure

Der Assay sowie die Aufarbeitung der Proben und HPLC-Bestimmung erfolgten wie unter 8.3.2 beschrieben. Abweichend wurden jedoch nur 0.75 mL der eingestellten Granulozytensuspension verwendet und vor der Stimulierung mit Calciumionophor-Lösung wurden 50 µL AA zugesetzt.

8.3.6 Bestimmung der 12-Lipoxygenase- und Cyclooxygenase-1-Hemmung unter Zusatz von Arachidonsäure

Der Assay sowie die Aufarbeitung der Proben und HPLC-Bestimmung erfolgten wie unter 8.3.3 beschrieben. Abweichend wurden jedoch nur 0.75 mL der eingestellten Thrombozytensuspension verwendet und 50 μ L AA zugesetzt. Auf die Stimulierung mit Calciumionophor konnte verzichtet werden, da es für die 12-LO- und COX-Aktivierung nicht benötigt wird.

8.4 Auswertung

Die Enzym-Hemmung wurde anhand der gebildeten Mediator-Mengen an LTB₄ (5-LO), 12-HETE (12-LO), 12-HHT (COX-1) und AA (cPLA₂) bestimmt. Die relativen Konzentrationen in einer Probe entsprechen dem Verhältnis der Peakfläche von LTB₄, 12-HETE, 12-HHT bzw. AA zu der Peakfläche des internen Standards PGB₂ (für 5-, 12-LO und COX-1) bzw. EPA (für cPLA₂). Die Hemmung der entsprechenden Enzymaktivität errechnet sich aus dem Verhältnis der Mediatorkonzentrationen in Anwesenheit (Mittelwert aus 2 Bestimmungen, $n_{an} = 3$) und in Abwesenheit (Mittelwert aus 2 Bestimmungen, $n_{ab} = 4$) der Testsubstanzen. Zur Kontrolle wurde parallel bei jeder Messung ein Standardinhibitor vermessen [NDGA (für 5-LO), NDGA/Indometacin (für 12-LO/COX-1) und MAFP (für cPLA₂)]. Die Messungen wurden nur bei ausreichender Hemmung der Enzymaktivität durch diese Inhibitoren gewertet.

Die relative Standardabweichung der 4 Kontrollwerte betrug bei verschiedenen Messungen zwischen 1-9 %. Mit Hilfe des Student t-Testes für zwei voneinander unabhängige Mittelwerte ist der Hemmwert errechenbar, ab dem eine Hemmung des jeweiligen Enzyms aufgrund einer gewählten Sicherheitswahrscheinlichkeit ($1-\alpha$) als signifikant angesehen werden kann.

Zunächst muss dafür die Prüfgröße t_{err} errechnet werden:

$$t_{err} = \frac{|an-ab|}{[S_{an/ab} \times n_{an} / n_{ab} + n_{ab}]^{-1/2}}$$

an = Mittelwert der mit Testsubstanz erhaltenen Werte

ab = Mittelwert der Kontrollwerte

$S_{an/ab}$ = gemeinsame Standardabweichung beider Gruppen

n_{ab} = Anzahl der Kontrollwerte

n_{an} = Anzahl der mit Testsubstanzen ermittelten Werte

Die Nullhypothese „die Testsubstanz hemmt die Mediatorbildung nicht“ ist dann mit der Irrtumswahrscheinlichkeit α zu verwerfen, wenn t_{err} größer als ein über die Freiheitsgrade $v = n_{an} + n_{ab} - 2$ erhaltener Wert t_{tab} ist, welcher aus der Tabelle für Signifikanzschranken der Student-Verteilung abgelesen werden kann. Für eine Irrtumswahrscheinlichkeit α von maximal 5 % beträgt dieser Wert hier ($v = 5$) 2.0150.

Um eine allgemeine Aussage treffen zu können, wurde nur die ungünstigste relative Standardabweichung von 9 % betrachtet. Des weiteren wurde angenommen, dass die Standardabweichung der Mittelwerte in An- und Abwesenheit der Testsubstanzen etwa gleich ist. Unter diesen Umständen wird t_{err} größer als t_{tab} , wenn die Differenz zwischen den Mittelwerten der Kontrollwerte ($ab = 100\%$) und dem Mittelwert der nach Zusatz der Testsubstanz erhaltenen Werte (an) mindestens 14 % ist.

Daraus folgt, dass erst Hemmwerte $\geq 14\%$ mit einer Wahrscheinlichkeit von 95 % als signifikant angesehen werden können. Hemmwerte $< 14\%$ wurden deshalb nicht akzeptiert und mit 0 % gewertet.

Die IC_{50} -Werte wurden rechnerisch per logarithmischer Regression ermittelt (% Hemmung gegen \log Konzentration). Im Anschluss wurde für den Abszissenwert pIC_{50} ein Vertrauensbereich von $\pm 95\%$ berechnet. Dazu wurde die Regression der logarithmierten Substanzkonzentration (x) auf die prozentuale Hemmung (Y) betrachtet.

Der Standardfehler für den geschätzten Mittelwert von x an einer beliebigen Stelle y , z.B. bei $y = 50\%$ ergibt sich aus der folgenden Gleichung:

$$S = \sqrt{\frac{Qx - (Qy)^2 / Qy}{n-2}} \times \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{(y - \bar{y})^2}{Qy}}$$

$$Qx = \sum x^2 - n \cdot \bar{x}^2$$

$$Qy = \sum y^2 - n \cdot \bar{y}^2$$

\bar{x} = Mittelwert von x

\bar{y} = Mittelwert von y

n = Anzahl der Werte

Daraus folgend lässt sich der 95 % Vertrauensbereich (VB) für ein geschätztes Mittel an einer Stelle y berechnen:

$$\bar{x} \pm 95 \% VB = \bar{x} \pm t_{(n-2); \alpha} \cdot S$$

$t_{(n-2)}$ = Tabellenwert t-Test für n-2 Freiheitsgrade

Durch anschließende Logarithmierung wurden die 95 %-Vertrauensbereiche der IC₅₀-Werte erhalten.

Die Angaben >10 μM, >>10 μM, >100 μM und >>100 μM sind wie folgt zu interpretieren:

Alle Substanzen wurden zunächst mit einer Konzentration von 10 μM vermessen. Bei einer nicht signifikanten Hemmung bei dieser Konzentration erhält die Substanz den „Wert“ >>10 μM. Liegt die Hemmung zwischen 14-50 %, so wird der „Wert“ mit >10 μM angegeben.

Einige Substanzen wurden bei „Werten“ von >10 μM nachfolgend mit einer Konzentration von 100 μM gemessen. Eine nicht signifikante Hemmung wurde hier mit >>100 μM und eine Hemmung zwischen 14-50 % mit >100 μM gekennzeichnet.