

5 Biochemisch-experimenteller Teil

5.1 Material

5.1.1 Reagenzien und Materialien

| | |
|---------------------------------------|---|
| Acetonitril (HPLC-Qualität) | Acros |
| Aqua bidestillata (Aqua bidest.) | Eigene Herstellung |
| Calciumionophor A 23187 (freie Säure) | Sigma |
| DMSO (p.a.) | Acros |
| THF(p.a.) | Acros |
| Glaszentrifugenröhrchen (15 mL) | Werkstätte Chemie Photo |
| HPLC-Säule | Licrospher [®] 100-RP-18 endcapped (5 µm) LiChroCART [®] 125-4/Firma Merck |
| Humanblut | Eigenblutspende |

Interne Standards für die HPLC-Bestimmung

| | |
|--------------------------------|-----------------------|
| PGB ₂ | Cyman Chemical/Alexis |
| Methanol (HPLC-Qualität) | Acros |
| NDGA (Nordihydroguajaretsäure) | Sigma |

Referenzsubstanzen

| | |
|--|------------------------|
| Arachidonsäure | |
| (5, 8, 11, 14(all-Z)-Eicosatetraensäure | Cayman Chemical/Alexis |
| 12-HHT | |
| (12(S)-5, 8, 10 (Z, E, E)-Heptadecatriensäure) | Cayman Chemical/Alexis |

| | |
|-------------------------------------|---|
| RP ₁₈ -Extraktionssäulen | Bakerbond spe* Octadecyl C ₁₈ , 6 mL, 500 mg, Firma Baker und Chromobond C 18, 6 mL, 500 mg, Firma Machery & Nagel |
|-------------------------------------|---|

Isotonische PBS-Lösung

| | |
|---|------------|
| NaCl | 8.00 g |
| KCl | 0.02 g |
| NaH ₂ PO ₄ x 2 H ₂ O | 0.89 g |
| KH ₂ PO ₄ | 0.20 g |
| Aqua bidest. | ad 1000 mL |

mit 3 mol/L NH₃-Lösung auf den pH-Wert von 7.4 eingestellt

EDTA-PBS-Lösung

| | |
|---|-----------|
| EDTA Na ₂ x 2 H ₂ O | 112 mg |
| Isotonische PBS-Lösung | ad 100 mL |

5.2 Geräte

| | |
|-----------------------------|--|
| Zentrifuge | Hettich Rotana |
| Magnetrührer mit Heizplatte | Ikamag RCT (IKA-Labortechnik) |
| Reagenzglasschüttler | REAX 2000 (Heidolff) |
| 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 |

5.3 Methoden

5.3.1 Zellisolierung

Abbildung 50 unten zeigt schematisch das Flußdiagramm zur Isolierung der Thrombozyten aus dem humanen venösen Vollblut.

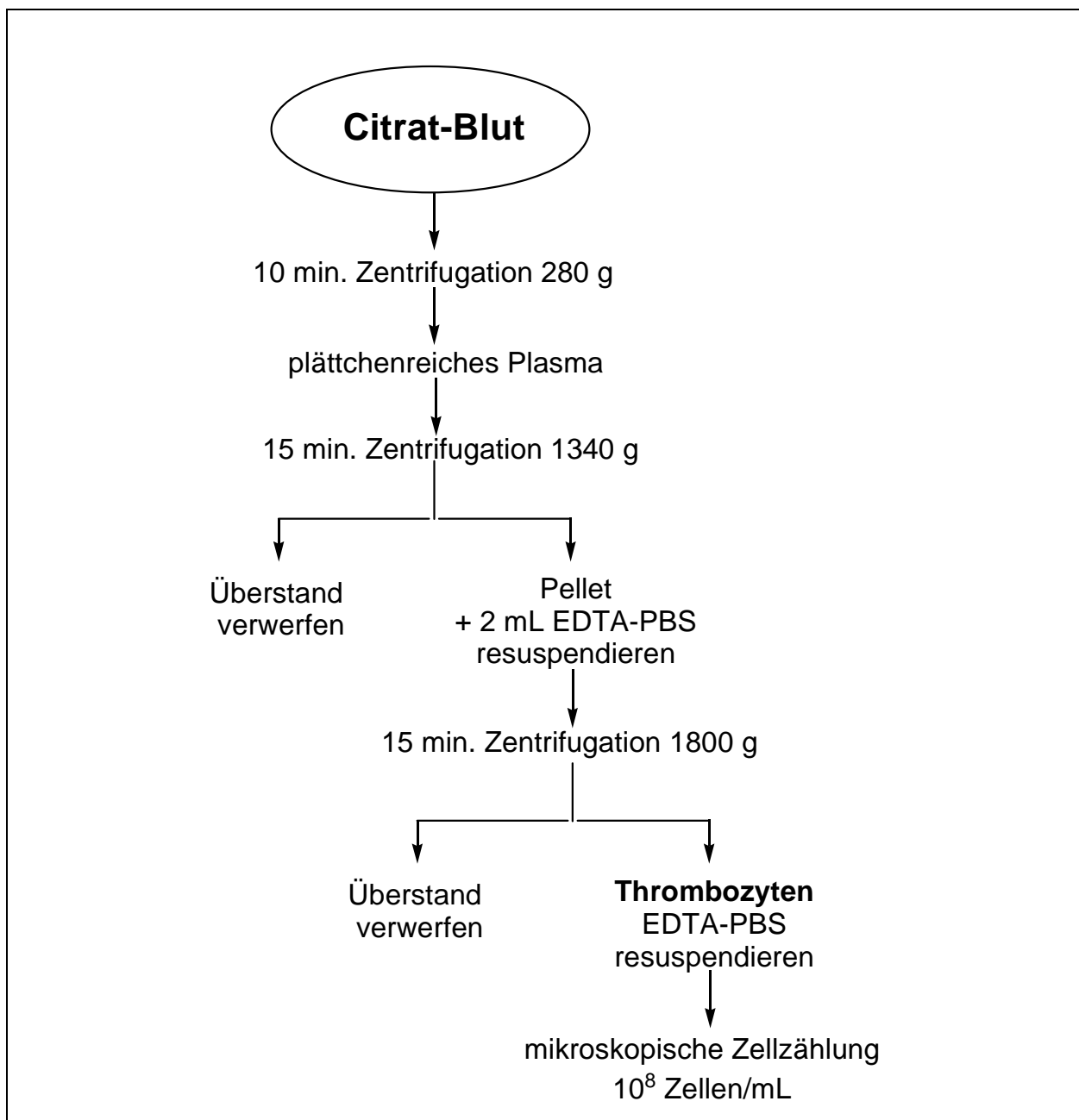


Abb. 50: Flußdiagramm zur Zellisolierung aus humanem Vollblut

Vorbereitung der Zellisolierung

Die Zellisolierung erfolgt bei Raumtemperatur. Dazu wird das humane Blut (venöses Blut mit 10 % Citratlösung als Antikoagulans) auf Glaszentrifugengläser verteilt und 10 Minuten bei 280 g zentrifugiert. Bei allen Arbeitsschritten wird das Einwirken von direktem Sonnenlicht vermieden. Nach der Zentrifugation wird das plättchenreiche Plasma (PRP) mit einer Pasteurpipette abgeerntet. Es wird zur Gewinnung der Thrombozyten verwendet.

Isolierung der Thrombozyten

Zur Isolierung der Thrombozyten (vgl. *Lehr*^[165]) wird das vorbereitete abgeerntete plättchenreiche Plasma auf Zentrifugengläser aufgeteilt und erneut 15 Minuten bei 1340 g zentrifugiert. Der erhaltene Überstand wird verworfen. Das Pellet wird danach mit 2 mL EDTA-PBS-Lösung resuspendiert. Anschließend wird 15 Minuten bei 1800 g zentrifugiert. Der Überstand wird ebenfalls verworfen. Abschließend wird das Pellet mit EDTA-PBS-Lösung sorgfältig resuspendiert und auf eine Zellzahl von 10^8 Zellen/mL eingestellt.

Die Zellzählung erfolgt mikroskopisch mit der Neubauer-Zählkammer.

5.3.2 Bestimmung der Cyclooxygenase-1-Hemmung

Assay

0.8 mL der eingestellten Thrombozytensuspension wird in Glaszentrifugengläschen vorgelegt. Um das Sedimentieren der Zellen zu verhindern, werden die Probengläschen alle drei Minuten leicht geschüttelt. Nach Zusatz von jeweils 2.5 µL Testsubstanzlösung bzw. 2.5 µL DMSO für die Kontrollmessung [DMSO-Endkonzentration: 0.25 % (V/V)] wird 10 Minuten im Wasserbad bei 37 °C vorinkubiert. Im folgenden Schritt wird 0.2 mL CaCl_2 -Lösung hinzugegeben (Ca^{2+} -Endkonzentration: 2 mmol/L). Die Proben werden weitere fünf Minuten bei 37 °C inkubiert. Die Stimulierung der Zellen wird mit der Zugabe von 2.5 µL Calciumionophor-Lösung (Calciumionophor-Endkonzentration: 20 µmol/L) gestartet. Es wird weitere drei Minuten im Wasserbad bei 37 °C inkubiert. Danach wird durch Zusatz von 1 mL Lösung zur Enzyminhibition für die 12-HHT-Bestimmung (Endkonzentrationen: NDGA = 10 µmol/L; PGB₂ = 1.8 µmol/L) gestoppt. Danach werden die Reaktionsgefäße mindestens zwei Stunden bei -20 °C gelagert.

Aufarbeitung der Probe

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

HPLC-Bestimmung

Zur HPLC-Bestimmung werden jeweils 2 mL Probelösung auf die RP-HPLC-Säule gegeben.

5.3.3 Auswertung

Die Enzymhemmung wird anhand der gebildeten Mediatormenge 12-HHT bestimmt. Die relativen Konzentrationen entsprechen der Peakfläche 12-HHT zu der Peakfläche des internen Standards PGB₂ mit bekannter Konzentration.

Die Hemmung der entsprechenden Enzymaktivität errechnet sich aus dem Verhältnis der Mediatorkonzentrationen in Anwesenheit der Testsubstanzen (Mittelwert aus 2 Bestimmungen, $n_{an} = 3$) und in Abwesenheit der Testsubstanzen (Mittelwert aus 2 Bestimmungen, $n_{ab} = 4$). Zur Kontrolle wird parallel der Standardinhibitor vermessen (NDGA/Indometacin für COX-1). Die Messungen werden nur bei ausreichender Hemmung der Enzymaktivität durch diese Inhibitoren gewertet.

Die relative Standardabweichung der 4 Kontrollwerte beträgt bei verschiedenen Messungen zwischen 1 % bis 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 wird die Prüfgröße t_{err} nach der folgenden Gleichung errechnet (vgl. Schwandt^[161]):

$$t_{err} = \frac{|a_n - a_b|}{S_{an/ab}} \sqrt{\frac{n_{an} \times n_{ab}}{n_{an} + n_{ab}}}$$

a_n = Mittelwert der mit Testsubstanz erhaltenen Werte; a_b = 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 $v = n_{\text{an}} + n_{\text{ab}} - 2$ erhaltener Wert t_{tab} ist, welcher aus der Tabelle für Signifikanzschranken der Student-Verteilung abgelesen werden kann. Für die Irrtumswahrscheinlichkeit α von maximal 5 % beträgt dieser Wert hier ($v = 5$) 2.0150.

Um eine allgemeine Aussage treffen zu können, wird nur die ungünstige relative Standardabweichung von 9 % betrachtet. Desweiteren wird 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 mit Testsubstanz erhaltenen Werte (an) mindestens 14 % ist.

Daraus folgt, daß erst Hemmwerte ≥ 14 % mit einer Wahrscheinlichkeit von 95 % als signifikant angesehen werden können. Hemmwerte < 14 % werden deshalb nicht akzeptiert und mit 0 % gewertet.

Die IC_{50} -Werte werden per logarithmischer Regression ermittelt (% Hemmung gegen \log Konzentration) (siehe *Richwien*^[157]). Im Anschluß wird für den pIC_{50} -Wert ein Vertrauensbereich von ± 95 % berechnet. Dazu wird 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 folgenden Gleichungen (siehe *Sachs*^[159,160])

$$s = \sqrt{\frac{Q_y - (Q_{xy})^2 / Q_x}{n - 2}} \times \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{(x - \bar{x})^2}{Q_x}}$$

$$Q_y = \sum y^2 - n \times \bar{y}^2 \quad n = \text{Anzahl der Werte}$$

$$Q_x = \sum x^2 - n \times \bar{x}^2 \quad \bar{x} = \text{Mittelwert von } x$$

$$Q_{xy} = \sum (x - \bar{x}) \times (y - \bar{y}) \quad \bar{y} = \text{Mittelwert von } y$$

Daraus folgend läßt sich der 95 %-Vertrauensbereich (VB) für ein geschätztes Mittel an Stelle y berechnen (siehe Abbildung 51 unten, vgl. *Richwien*^[157]):

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

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

Abb. 51: Formel zur Berechnung des 95 %-Vertrauensbereichs (vgl. *Richwien*^[157])

Durch anschließende Logarithmierung werden die 95 %-Vertrauensbereiche der IC₅₀-Werte erhalten. Die Angaben > 10 µmol/L, >> 10 µmol/L, > 100 µmol/L und >> 100 µmol/L sind wie folgt zu interpretieren:

Alle Substanzen werden zunächst mit einer Konzentration von 10 µmol/L vermessen. Bei einer nicht signifikanten Hemmung bei dieser Konzentration erhält die Verbindung den „Wert“ >> 10 µmol/L. Liegt die Hemmung zwischen 14 % bis 50 %, so wird der „Wert“ mit > 10 µmol/L angegeben.

Einige Substanzen werden bei „Werten“ von > 10 µmol/L nachfolgend mit einer Konzentration von 100 µmol/L gemessen. Eine nicht signifikante Hemmung wird hier mit >> 100 µmol/L und eine Hemmung zwischen 14 % bis 50 % mit > 100 µmol/L gekennzeichnet.