

Aus dem Walther-Straub-Institut  
für Pharmakologie und Toxikologie der  
Ludwig-Maximilians-Universität München  
Ehem. Kommissarischer Leiter: Prof. Dr. Elmar Richter  
Jetziger Vorstand: Prof. Dr. Thomas Gudermann

# **Saisonale Veränderung der Cysteinyl- Leukotrien Konzentrationen bei Atopikern in den Blutleukozyten**

Methodenvergleich: HPLC/ Enzym-Assay

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Humanbiologie  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
Ulrike Mühlhans  
aus Trier

2009

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Dipl. Biochem. Ekkehard Haen

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Fritz Krombach

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 30.04.2009

**Für meine Eltern**

Die vorliegende Arbeit entstand im Rahmen eines Promotionsvorhabens am Walther-Straub-Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Ludwig-Maximilians-Universität München.

An dieser Stelle möchte ich besonders danken:

Herrn Prof. Dr. Dr. E. Haen für die Überlassung des Themas, die freundliche Unterstützung und Betreuung, sowie die Diskussionen und Anregungen zu Durchführung und Darstellung der Arbeit.

Herrn Prof. Dr. B. Przybilla, Dermatologische Klinik und Poliklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München, für die großzügige Unterstützung und die problemlose Zusammenarbeit.

Insbesondere Frau Gabriele Weimar, Mitarbeiter des Allergielabors der Dermatologischen Klinik und Poliklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München.

Herrn Dr. T. Vogt, Dermatologische Uniklinik Regensburg, für die großzügige Unterstützung und problemlose Zusammenarbeit.

Frau Dr. Christiane Geiger für die angeregten Diskussionen, die sehr große Hilfsbereitschaft und wertvollen Anregungen zur Durchführung der Arbeit, sowie die wichtige moralische Unterstützung.

Frau Monika Buchberger für das kritische Korrekturlesen und die moralische Unterstützung sowie die wertvollen Diskussionen.

Herrn Wolfgang Bader für das kritische und exakte Korrekturlesen des Manuskriptes.

Den Arbeitsgruppen in München und Regensburg für die freundliche Atmosphäre und die Hilfsbereitschaft, insbesondere Frau Doris Melchner, Frau Tatjana Jahner und Frau Heike Hallof-Büstrich.

Frau Ulrike Schwaiger für die Einführung und Unterstützung während der Arbeitszeit im Walther-Straub-Institut.

Allen Probanden für ihre Bereitschaft und unkomplizierte Teilnahme an den Versuchen.

---

# Inhaltsverzeichnis

|                 |   |           |
|-----------------|---|-----------|
| <b><u>A</u></b> | <b><u>Einleitung</u></b>                                      | <b>1</b>  |
| <b>A.1</b>      | <b>Bedeutung der Leukotriene</b>                              | <b>1</b>  |
| <b>A.2</b>      | <b>Möglichkeiten der Stimulation, Bildung und Freisetzung</b> | <b>7</b>  |
| <b>A.3</b>      | <b>Atopie</b>   | <b>11</b> |
| <b>A.4</b>      | <b>Fragestellung</b>  | <b>13</b> |
| <br>            |   |           |
| <b><u>B</u></b> | <b><u>Material und Methoden</u></b>                           | <b>15</b> |
| <br>            |   |           |
| <b>B.1</b>      | <b>Verbrauchsmaterial</b>                                     | <b>15</b> |
| <b>B.1.1</b>    | <b>Einmalartikel</b>  | <b>15</b> |
| <b>B.1.2</b>    | <b>Chemikalien</b>  | <b>15</b> |
| B.1.2.1         | Substanzen  | 15        |
| B.1.2.2         | Herstellung der Lösungen                                      | 16        |
| <b>B.1.3</b>    | <b>Geräte</b>   | <b>17</b> |
| <br>            |   |           |
| <b>B.2</b>      | <b>Methode</b>  | <b>19</b> |
| <b>B.2.1</b>    | <b>methodische Untersuchungen</b>                             | <b>19</b> |
| B.2.1.1         | HPLC-Analytik   | 19        |
| B.2.1.1.1       | Fließmittel für die HPLC                                      | 19        |
| B.2.1.1.2       | Aufarbeitung der Proben                                       | 20        |
| B.2.1.1.3       | Bestimmung der Wiederfindungsrate                             | 21        |
| B.2.1.1.4       | Durchführung der Messung                                      | 21        |
| B.2.1.1.5       | Validierung   | 23        |
| B.2.1.2         | Messung der Cys-Leukotriene mittels Assay                     | 26        |
| B.2.1.2.1       | Aufarbeitung der Proben                                       | 27        |
| B.2.1.2.2       | EIA-Kit   | 27        |

---

|                 |   |           |
|-----------------|---|-----------|
| B.2.1.2.3       | Auswertung des EIA-Kits                             | 28        |
| B.2.1.2.4       | ELISA-Kit   | 29        |
| B.2.1.2.5       | Auswertung des ELISA-Kits                           | 30        |
| <b>B.2.1.3</b>  | <b>Stimulationsversuche</b>                         | <b>30</b> |
| B.2.1.3.1       | Probanden   | 30        |
| B.2.1.3.2       | Zellpräparation                                     | 30        |
| B.2.1.3.3       | Aufarbeitung der Proben                             | 31        |
| B.2.1.3.4       | Stimulation der Leukotrienbildung bzw. -freisetzung | 31        |
| B.2.1.3.5       | Quantitative Bestimmung der Leukotriene             | 33        |
| <b>B.2.2</b>    | <b>Klinische Untersuchung</b>                       | <b>34</b> |
| B.2.2.1         | Probanden   | 34        |
| B.2.2.2         | Zellpräparation                                     | 35        |
| B.2.2.3         | Aufarbeitung der Proben                             | 35        |
| B.2.2.4         | Stimulation der Leukotrienbildung bzw. -freisetzung | 35        |
| B.2.2.5         | Quantitative Bestimmung der Leukotriene             | 36        |
| B.2.2.6         | Allergiediagnostik                                  | 37        |
| <b>B.2.3</b>    | <b>Statistik</b>                                    | <b>38</b> |
| <b><u>C</u></b> | <b><u>Ergebnisse</u></b>                            | <b>39</b> |
| <b>C.1.</b>     | <b>Ergebnisse der methodischen Untersuchungen</b>   | <b>39</b> |
| <b>C.1.1</b>    | <b>Etablieren der HPLC-Methode</b>                  | <b>39</b> |
| C.1.1.1         | Methodenentwicklung                                 | 39        |
| C.1.1.2         | Validierung der Methode                             | 45        |
| C.1.1.2.1       | Präzision   | 45        |
| C.1.1.2.2       | Linearität  | 46        |
| C.1.1.2.3       | Richtigkeit   | 48        |
| C.1.1.2.4       | Robustheit  | 50        |
| C.1.1.2.5       | Selektivität und Spezifität                         | 58        |

---

|              |   |           |
|--------------|---|-----------|
| C.1.1.2.6    | Nachweis- und Bestimmungsgrenze   | 60        |
| <b>C.1.2</b> | <b>Messungen mittels Assays</b>   | <b>63</b> |
| C.1.2.1      | EIA-KIT der Firma Cayman Chemical   | 63        |
| C.1.2.2      | ELISA-KIT der Firma Neogen  | 66        |
| <b>C.1.3</b> | <b>Probenaufarbeitung mit der Sep-Pak®</b>  | <b>67</b> |
| C.1.3.1      | Vergleich unterschiedlicher Methoden  | 67        |
| C.1.3.2      | Unterschiedliche Elutionsmittel   | 68        |
| C.1.3.3      | Instabilität der Leukotriene unter IR-Trocknung                                     | 69        |
| C.1.3.4      | Unterschiedliche Lösungsvolumina  | 70        |
| <b>C.1.4</b> | <b>Stimulationsversuche</b>   | <b>72</b> |
| C.1.4.1      | Einfluß der Stimulationsreagenzien  | 72        |
| C.1.4.1.1    | Stimulation mit Melittin  | 72        |
| C.1.4.1.2    | Stimulation mit Anti-IgE  | 74        |
| C.1.4.1.3    | Stimulation mit Calcium-Ionophor A23187   | 76        |
| C.1.4.1.4    | Stimulation mit A23187 und Arachidonsäure   | 78        |
| C.1.4.1.5    | Bewertung der Stimulationsreagenzien  | 80        |
| C.1.4.2      | Einfluß der Stimulationszeit  | 81        |
| C.1.4.3      | Einfluß der Zellzahl  | 84        |
| C.1.4.4      | Einfluß des Ca <sup>2+</sup> -Gehaltes des Hank's-Puffers                           | 86        |
| <b>C.2</b>   | <b>Ergebnisse der klinischen Untersuchungen</b>                                     | <b>88</b> |
| <b>C.2.1</b> | <b>Basaler Leukotriengehalt</b>   | <b>88</b> |
| C.2.1.1      | Vergleich Atopiker- und Kontroll-Gruppe   | 88        |
| C.2.1.2      | Vergleich der Atopiker-Gruppen (Pollen/Hausstaub)                                   | 91        |
| <b>C.2.2</b> | <b>Einfluss der atopischen Erkrankung auf den Leukotriengehalt nach Stimulation</b> | <b>93</b> |
| C.2.2.1      | Stimulation mit 1,2 µM A23187 und 5 Minuten Inkubation                              | 93        |
| C.2.2.1.1    | Vergleich Atopiker- und Kontroll-Gruppe   | 93        |
| C.2.2.1.2    | Vergleich der Atopiker-Gruppen (Pollen/Hausstaub)                                   | 95        |
| C.2.2.2      | Stimulation mit 1,2 µM A23187 und 20 Minuten Inkubation                             | 97        |
| C.2.2.2.1    | Vergleich Atopiker- und Kontroll-Gruppe   | 97        |

|                 |  |            |
|-----------------|--|------------|
| C.2.2.2.2       | Vergleich der Atopiker-Gruppen (Pollen/Hausstaub)                          | 99         |
| C.2.2.3         | Stimulation mit 1,2 $\mu$ A23187 + 0,2 $\mu$ M AA und 5 Minuten Inkubation | 102        |
| C.2.2.3.1       | Vergleich Atopiker- und Kontroll-Gruppe                                    | 102        |
| C.2.2.3.2       | Vergleich der Atopiker-Gruppen (Pollen/Hausstaub)                          | 104        |
| <b><u>D</u></b> | <b><u>Diskussion</u></b>   | <b>106</b> |
| <b>D.1</b>      | <b>Diskussion der methodischen Untersuchungen der Leukotrienbestimmung</b> | <b>107</b> |
| <b>D.1.1</b>    | <b>HPLC-Methode</b>  | <b>107</b> |
| D.1.1.1         | Wahl der geeigneten HPLC-Methode   | 107        |
| D.1.1.2         | Validierung der HPLC-Methode   | 109        |
| <b>D.1.2</b>    | <b>Messmethoden und deren Vergleich</b>                                    | <b>111</b> |
| D.1.2.1         | Gas-Chromatographie und Massen-Spektroskopie                               | 111        |
| D.1.2.2         | Radio-Immuno-Assay   | 111        |
| D.1.2.3         | Enzym-Immuno-Assay   | 112        |
| D.1.2.3.1       | EIA von Cayman Chemical  | 113        |
| D.1.2.3.2       | ELISA von Neogen   | 113        |
| D.1.2.4         | Vergleich der Methoden   | 114        |
| <b>D.1.3</b>    | <b>Probenaufarbeitung</b>  | <b>117</b> |
| <b>D.1.4</b>    | <b>Einfluss auf den Leukotriengehalt</b>                                   | <b>120</b> |
| D.1.4.1         | Einfluss der Stimulationsreagenzien und der Stimulationszeiten             | 120        |
| D.1.4.1.1       | Calcium-Ionophor   | 120        |
| D.1.4.1.2       | Calcium-Ionophor plus Arachidonsäure                                       | 121        |
| D.1.4.1.3       | Anti-IgE   | 123        |
| D.1.4.1.4       | Melittin   | 124        |
| D.1.4.1.5       | Vergleich der Stimulationsreagenzien                                       | 124        |
| D.1.4.2         | Einfluss der Zellzahl  | 125        |
| D.1.4.3         | Einfluss des Hank´s Puffers  | 126        |
| <b>D.2</b>      | <b>Diskussion der klinischen Untersuchungen zur Leukotrienbestimmung</b>   | <b>127</b> |
| <b>D.2.1</b>    | <b>Basaler Leukotriengehalt: Vergleich Atopiker und Kontrollen</b>         | <b>128</b> |



---

|                 |  |            |
|-----------------|--|------------|
| <b>D.2.2</b>    | <b>Stimulierter Leukotriengehalt: Vergleich Atopiker und Kontrolle</b> | <b>131</b> |
| D.2.2.1         | Phospholipase A <sub>2</sub> -Stimulierbarkeit                         | 131        |
| D.2.2.2         | Lipoxygenase-Stimulierbarkeit  | 132        |
| <b><u>E</u></b> | <b><u>Zusammenfassung</u></b>  | <b>134</b> |
| <b><u>F</u></b> | <b><u>Tabellenanhang</u></b>   | <b>137</b> |
| <b><u>G</u></b> | <b><u>Literaturverzeichnis</u></b>                                     | <b>139</b> |

---

## Abkürzungen

|                      |   |
|----------------------|---|
| %B/B <sub>0</sub>    | prozentuale Tracerbindung   |
| γGTP                 | γ-Glutamyltranspeptidase  |
| A23187               | Calcium-Ionophor  |
| AA                   | Arachidonsäure  |
| ARDS                 | adult respiratory distress syndrome   |
| COX                  | Cyclooxygenase  |
| Cys-LT               | Cysteinyl-Leukotrien  |
| DIHETE               | DiHydroxy-Eicosatetraensäure  |
| EIA                  | Enzym Immuno Assay  |
| ELISA                | Enzym Linked Immuno Assay   |
| EtOH                 | Ethanol   |
| Fab-Fragment         | antigenbindendes Fragment (fragment antigen binding)                              |
| FLAP                 | five lipoxygenase activating protein  |
| FM                   | Fließmittel   |
| g                    | Erdbeschleunigung   |
| GC                   | Gas-Chromatography  |
| HA                   | Hausstaub-Atopiker  |
| HAc                  | Essigsäure  |
| HETE                 | Hydroxy-Eicosatetraensäure  |
| HPETE                | Hydroperoxy-Eicosatetraensäure  |
| HPLC                 | Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (high performance liquid chromatography) |
| IgE                  | Immunoglobulin E  |
| IR                   | Infrarot  |
| K                    | Kontrolle   |
| LIP                  | Lipoxygenase  |
| LT, LTC <sub>4</sub> | Leukotrien, Leukotrien C <sub>4</sub>   |
| MEOH                 | Methanol  |
| MRP1                 | multidrug resistance-associated protein   |
| MS                   | Massenspektrometrie   |

---

|                  |  |
|------------------|--|
| n                | Anzahl der Probanden                           |
| n.s.             | nicht signifikant                              |
| np               | normal phase                                   |
| NSB              | nicht spezifische Bindung                      |
| OD               | optical density                                |
| p                | Irrtumswahrscheinlichkeit bei Student's t-test |
| PA               | Pollen-Atopiker                                |
| PBL              | periphere Blutleukozyten                       |
| rp               | reversed phase                                 |
| RIA              | Radio Immuno Assay                             |
| SPE              | solid phase extraction                         |
| SRS              | slow reacting substance                        |
| SRS-A            | slow reacting substance of anaphylaxis         |
| TEMPO            | tetramethylpiperidinyloxyl free radical        |
| uLTE             | LTE im Harn                                    |
| UV               | Ultraviolette Strahlung                        |
| $\bar{x} \pm SE$ | Mittelwert $\pm$ Standardabweichung            |

# A Einleitung

## A.1 Bedeutung der Leukotriene

### Entdeckung der Leukotriene

Im Jahre 1938 wurde von Feldberg und Kellaway die Bezeichnung „slow reacting substance“ (SRS) für eine Stoffgruppe eingeführt, die zu einer langsam einsetzenden, lang anhaltenden Kontraktion der glatten Muskulatur führte. Dies ließ sich erstmals im Rahmen eines Versuchs bestätigen bei dem ein Perfusat der Meerschweinchenlunge mit Kobragift behandelt wurde (Feldberg und Kellaway 1938). 1960 bezeichnete Brocklehurst diese Substanz als „slow reacting substance of anaphylaxis“ (SRS-A), da sich zeigte, dass sie in der Bronchiallavage von Asthmatikern nach Allergenexposition nachweisbar war und eine stark bronchokonstriktorische Wirkung zeigte (Brocklehurst 1953; Brocklehurst 1960). Man schrieb bereits damals der SRS-A eine bedeutende Rolle in der Pathophysiologie des Asthmas und anderer typischer hypersensitiver Sofortreaktionen zu (Austen 1978; Brocklehurst 1962; Kellaway und Trethewie 1940; Orange und Austen 1969).

Die Aufklärung der Struktur der SRS-A wurde dadurch erschwert, dass nur wenig Reinsubstanz für Versuche zur Verfügung stand. Strandberg konnte die Struktur schließlich über UV-Absorption als eine polare, schwefelhaltige Fettsäure charakterisieren (Strandberg und Uvnäs 1971). Durch intensive Erforschung der chemischen Eigenschaften der SRS-A gelang es Morris im Jahre 1978 die SRS-A über die HPLC in verschiedene Einzelkomponenten zu trennen (Morris et al. 1978). Ein Jahr später postulierten Borgeat und Samuelsson, dass es sich bei der SRS-A um eine Verbindung aus 5-Hydroxy-7,9,11,14-Eicosatetraensäure und einem Cysteinrest am C<sub>6</sub>-Kohlenstoff handeln müsse und bezeichneten diese Substanz als Leukotrien C<sub>4</sub> (Borgeat und Samuelsson 1979 a; Murphy et al. 1979). Spätere Versuche mit RBS-Zellen (rat basophilic leukemia cells) zeigten jedoch, dass nicht LTC<sub>4</sub>, sondern ein anderes Leukotrien, nämlich LTD<sub>4</sub>, die Hauptkomponente der „slow reacting substance“ darstellt (Örning et al. 1980). Die Aminosäureanalyse ergab, dass LTD<sub>4</sub> eine Aminosäure, nämlich Glutamin, weniger enthielt als LTC<sub>4</sub>. Die genaue chemische Struktur von LTC<sub>4</sub> wurde 1980 von Corey aufgeklärt, durch Biosynthesestudien mit Mastozytomzellen (Corey et al. 1980). Die ursprünglich als SRS-A bezeichnete Substanz wurde als ein Gemisch von LTB<sub>4</sub>, LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub> und

LTE<sub>4</sub> identifiziert (Borgeat et al. 1979 b; Borgeat et al. 1979 d; Murphy et al. 1979; Örnig et al. 1980).

Für die gesamte Gruppe der SRS-A Substanzen (LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub>, LTE<sub>4</sub> und LTF<sub>4</sub>) und LTB<sub>4</sub> führten Borgeat und Samuelsson 1979 den Begriff der „Leukotriene“ ein. Dieser Ausdruck wurde gewählt, da die Substanzen primär in Leukozyten gefunden wurden und eine Trien-Gruppe enthalten (Samuelsson et al. 1979). Die Leukotriene LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub> und LTE<sub>4</sub> werden unter dem Begriff Cysteinyl-Leukotriene (auch Cys-Leukotriene) zusammengefasst. Die Gruppe der Leukotriene LTB<sub>4</sub>-LTF<sub>4</sub> werden im Bezug auf ihre Wirkung in zwei Gruppen eingeteilt, das Leukotrien B<sub>4</sub> und die Cysteinyl-Leukotriene LTC<sub>4</sub>-LTF<sub>4</sub>.

Bis heute ist das Interesse an diesen Substanzen sehr groß, da sie bei verschiedenen Erkrankungen eine wichtige Rolle spielen, wie zum Beispiel dem allergischen Asthma (Severien et al. 2000), der allergischen Rhinitis und allgemein bei entzündliche Erkrankungen (Kohi et al. 1990). Leukotriene greifen an G-Protein gekoppelten Rezeptoren an.

Durch das chemotaktisch wirkende Leukotrien LTB<sub>4</sub>, wird eine Infiltration der Leukozyten ins Gewebe ausgelöst (Dahlén et al. 1980) und somit ist es bei sämtlichen entzündlichen Erkrankungen wie zum Beispiel auch der Psoriasis und Colitis Ulcerosa beteiligt (Drazen Austen 1974; Ford-Hutchison 1980/1990; Lindberg et al. 1998; Nielsen et al. 1991; Wurm et al. 2001). Es aktiviert Entzündungszellen, stimuliert die Produktion einiger pro-inflamatorischer Mediatoren und Zytokine, fördert die Ausschüttung von lysosomalen Enzymen, Superoxid-Radikalen in Neutrophilen und Hydrogenperoxid in menschlichen Monozyten. Ebenso ist eine Aktivierung der NADPH-Oxidase in menschlichen Eosinophilen möglich (Mansour und Agha 1999).

Während die Hauptquelle der LTB<sub>4</sub>-Synthese die Neutrophilen sind, werden die Cys-Leukotriene hauptsächlich in den Mastzellen gebildet (Wallace und Ma 2001). Die Cysteinyl-Leukotriene wirken vor allem als starke Vasokonstriktoren und verursachen eine starke bronchiale Hyperreagibilität (Michelassi et al. 1982). Diese Eigenschaften der Hyperreagibilität unterstreichen auch die Rolle der Cysteinyl-Leukotriene in der Pathophysiologie des Schockgeschehens (Hagman et al. 1985; Hock et al. 1984). Die durch Cys-Leukotrien induzierte Bronchokonstriktion ist sehr viel ausgeprägter und hält länger an, als die Bronchokonstriktion nach Gabe von Histamin, Bradykinin oder Prostaglandin<sub>2α</sub>. Diese Beobachtungen machen deutlich, dass die Leukotriene von großer Bedeutung bei humanem Asthma bronchiale sind (Borgeat und Samuelsson 1979 c; Orange und Austen 1975). In weiterführenden Versuchen konnte im Vergleich mit Histamin für LTC<sub>4</sub> eine um den Faktor 400-5000 erhöhter Wirksamkeit festgestellt werden (Kragballe und Voorhees 1983; Wedi und Kapp 2001).

Darüber hinaus sind die Cys-Leukotriene auch bei allgemeinen Koronararterienerkrankung, dem Herzinfarkt und Koronararterienspasmen von Bedeutung (Burke et al. 1982; Kamohara et al. 2001; Letts und Piper 1982; Roth und Lefer 1983; Sinzinger et al. 1986). Nach heutigem Kenntnisstand wird angenommen, dass die Leukotriene zum Beispiel auch bei den Erkrankungen ARDS (adult respiratory distress syndrom), rheumatoider Arthritis, Morbus Crohn sowie dem anaphylaktischen und endotoxinen Schock eine Mediatorrolle spielen (Ford-Hutchinson 1985; Goetzl et al. 1984; Hagmann et al. 1985).

Seit April 1998 ist in Deutschland der Wirkstoff Montelukast als erster Leukotrien-Rezeptor-Antagonist (cys-LT<sub>1</sub>) auf dem deutschen Arzneimittelmarkt unter dem Namen Singulair<sup>®</sup> verfügbar. Zugelassen ist der Arzneistoff für die Indikation des leichten bis mittelgradigen chronischen Asthmas. Verwendet wird es als Zusatzbehandlung, wenn das Asthma mit einem inhalativen Glucocorticoid nicht ausreichend behandelt und es durch die bedarfsweise Anwendung von kurz wirksamen  $\beta_2$ -Sympathomimetika nicht ausreichend unter Kontrolle gebracht werden kann.

### **Chemie und Biochemie der Leukotriene**

Leukotriene sind Oxidationsprodukte der mehrfach ungesättigten Arachidonsäure, deren gemeinsames Merkmal eine dreifach konjugierte Doppelbindung ist (Samuelsson und Borgeat 1979; Samuelsson und Hammerström 1980). Sie werden gemäß der Reihenfolge ihrer Entdeckung mit den Großbuchstaben A-F gekennzeichnet. Die Anzahl der Doppelbindungen im Fettsäurerest wird durch einen tiefgestellten Zahlenindex angegeben.

Man teilt die Leukotriene in zwei Gruppen, zum einen die Monohydroxyderivate (LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub>, LTE<sub>4</sub> und LTF<sub>4</sub>) deren Triengruppe sich an den C<sub>7</sub>- bis C<sub>11</sub>-Atomen befindet. Sie sind zudem am C<sub>6</sub>-Atom über eine Sulfhydrylgruppe mit unterschiedlichen Peptiden substituiert. Die zweite Substanzgruppe enthält das Dihydroxyderivat (LTB<sub>4</sub>) der Arachidonsäure, dessen Triengruppe an den C<sub>6</sub>- bis C<sub>10</sub>-Atomen lokalisiert ist.

Die Arachidonsäure, bereits seit langem als Präkursor für die Biosynthese der Prostaglandine und Thromboxane bekannt (Borgeat et al. 1976; Hansson 1983; Samuelsson et al. 1978) kommt nur in geringen Mengen frei in der Zelle vor. Der größte Teil ist an Phospholipide der Zellmembran gebunden, wie zum Beispiel an Phosphatidylcholin, Phosphatidylethanolamin, Phosphatidylserin oder Phosphatidylinositol (Samuelsson 1982; Yaman et al. 1999). Während einer Stimulation der Zelle wird Arachidonsäure, katalysiert durch eine calciumabhängige Phospholipase A<sub>2</sub> aus den Membran-Phospholipiden freigesetzt (Dennis 1997; Bosch 1980).

Als weitere Quelle für die Entstehung der frei vorliegenden Arachidonsäure steht Diacylglycerin zur Verfügung, aus der Arachidonsäure durch die Diacylglycerol-Lipase freigesetzt wird (Borgeat 1979 a). Die Stimulation der Zellen kann auf verschiedene Weise, zum Beispiel durch Entzündungsstimuli, immunologische Stimuli oder auch durch ein Calcium-Ionophor erfolgen (Bonney et al. 1979; Stenson und Parker 1979).

In Abbildung 1 ist die Entstehung der Leukotriene aus der Arachidonsäure schematisiert. Die 5-Lipoxygenase katalysiert die Reaktion, bei der die Arachidonsäure mit Hilfe des FLAPs (five lipoxygenase activating protein) (Hatzelmann et al. 1994; Miller et al. 1990; Rouzer und Samuelsson 1985) in die instabile 5-Hydroperoxy-Eicosatetraensäure (5-HPETE) überführt wird (Shimizu et al. 1984). Die 5-HPETE hydrolysiert spontan zu 5-HETE oder wird enzymatisch durch eine LTA-Synthetase in das instabile Epoxid  $LTA_4$  umgewandelt (Borgeat und Samuelsson 1979 d; Jakschik et al. 1980; Jakschik et al. 1985).

Das so entstandene instabile Epoxid  $LTA_4$  wird entweder durch eine cytosolische  $LTA_4$ -Hydrolase in  $LTB_4$  überführt, indem am  $C_{12}$ -Atom eine Hydroxylierung stattfindet oder durch die membrangebundene  $LTC_4$ -Synthetase in  $LTC_4$ , indem an das  $C_6$ -Atom ein Glutathionmolekül gebunden wird (Jakschik et al. 1982; Yoshimoto et al. 1990). Die spontane, nicht enzymatische Hydrolase von  $LTA_4$  führt zu biologisch inaktiven Stereoisomeren des  $LTB_4$  (6-trans- $LTB_4$  und 6-trans-12-epi- $LTB_4$ ) (Samuelsson 1983 a).

Aus  $LTC_4$  entsteht durch weitere Metabolisierung  $LTD_4$ , indem eine Glutamyltranspeptidase die Aminosäure Glutaminsäure aus  $LTC_4$  abspaltet. Aus  $LTD_4$  wiederum leitet sich durch Abspaltung des Glycinmoleküls (durch eine Aminopeptidase)  $LTE_4$  ab.  $LTF_4$  entsteht durch Anlagerung einer Glutaminsäure an das Cystein des  $LTE_4$  (Samuelsson 1983 b).

Während  $LTC_4$  und  $LTD_4$  fast gleich aktiv sind, geht bei der Umwandlung in  $LTE_4$  ein Teil der biologischen Aktivität verloren (Lewis et al. 1981; Samhoun et al 1989). Bei Studien über die Fähigkeit zur Kontraktion der glatten Muskulatur nimmt die biologische Aktivität in der Reihenfolge  $LTC_4 > LTD_4 > LTE_4 > LTF_4$  ab (Samuelsson 1983 a).

Der Abbau der Cysteinyl-Leukotriene erfolgt durch Peroxidation zu Sulfoxiden und Sulfonylen (Goetzl 1982; Lee et al. 1982). Die Inaktivierung von  $LTB_4$  vollzieht sich durch  $\omega$ -Oxidation zu 20-OH- $LTB_4$  und durch eine Carboxylierung zu 20-COOH- $LTB_4$  (Hansson et al. 1981; Powell 1984). Außer der Arachidonsäure können auch Eikosatrien- ( $C_{20:3}$ , n-6) oder Eikosapentaensäuren ( $C_{20:5}$ , n-3) als Substrat für die Lipoxygenase verwendet werden. Es entstehen dann die viel selteneren Leukotriene mit insgesamt 3 bzw. 5 Doppelbindungen (Jakschik 1985).

## Synthese der Leukotriene

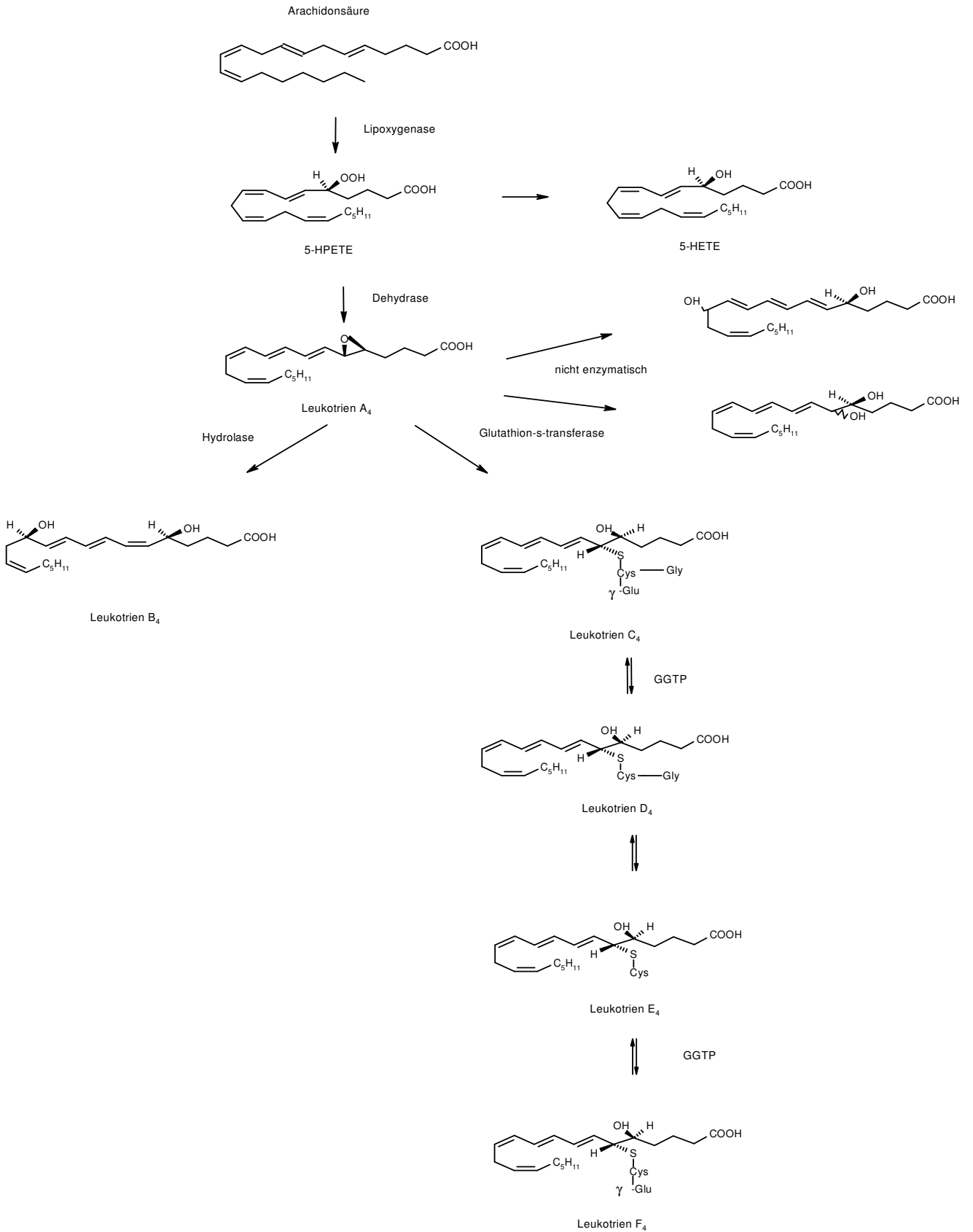


Abb.1: Darstellung des 5-Lipoxygenaseweges und seiner Endprodukte (Jakschik et al. 1985; Samuelsson 1985)



---

## Bestimmungsmethoden der Leukotriene

Für die Gruppe der Leukotriene stehen verschiedene Bestimmungsmethoden zu Verfügung. Am häufigsten werden die Chromatographie (z.B. Hochdruckflüssigkeitschromatographie HPLC) und Immunoassays, hier speziell der Radio- bzw. Enzym-Immunoassay, sowie eine Kombination beider Methoden angewendet. Eine weitere Alternative für die Bestimmung der Cys-Leukotriene ist die Kombination von Gas-Chromatographie (GC) Massenspektrometrie (MS). Diese Methoden werden im Folgenden kurz dargestellt.

Die HPLC ist eine chromatographische Methode, bei der die Trennung der Zielsubstanzen über ein Verteilungsgleichgewicht zwischen einer flüssigen mobilen und einer festen stationären Phase erreicht wird. Im Zusammenhang mit der Bestimmung der Leukotriene wird vorwiegend die Umkehrphasenchromatographie eingesetzt. Als stationäre Phasen kommen hierbei mit Alkylketten veresterte, silanisierte Kieselgele zum Einsatz, so dass eine hydrophobe apolare Oberfläche entsteht (Köller et al. 1985; Kumlin 1997; Lewis et al. 1981; Raulf et al. 1986). Die verwendete polare mobile Phase besteht meist aus Gemischen von Wasser und mit Wasser mischbaren organischen Lösungsmitteln (Methanol, Acetonitril, Ethanol u. a.). Stoffe, die eine höhere Affinität zur mobilen Phase besitzen (polare hydrophile Stoffe), werden zuerst von dieser eluiert. Stoffe, die eine höhere Affinität zur stationären Phase haben (apolare hydrophobe Stoffe), werden länger an diese gebunden und erst später von der mobilen Phase herausgelöst. So werden die Analysensubstanzen je nach physikalischer und chemischer Beschaffenheit adsorbiert, nach unterschiedlicher Zeit eluiert und können dann an Hand der Retentionszeit identifiziert werden. Die einzelnen Cysteinyl-Leukotriene werden durch ihre verschiedenen Aminosäurereste getrennt eluiert.

Eine weitere Möglichkeit zur Bestimmung der Leukotriene sind die Immunoassays. Bei einem Radioimmunoassay (RIA) ist auf Grund der radioimmunologischen Markierung der zu bestimmenden Substanz nach einer immunologischen Reaktion eine Auswertung über die unterschiedliche Radioaktivität der gebildeten Produkte möglich. Bei einem Enzymimmunoassay (EIA) hingegen findet die Quantifizierung auf Grund einer reinen Enzymreaktion statt. Häufig wird in der Literatur die Bestimmung der gesamten Cys-Leukotrienmenge beschrieben. Vereinzelt werden auch Methoden genannt, bei denen nur das Leukotrien C<sub>4</sub> bestimmt wird (Chavis et al. 1997; Thien et al. 1993; Zakrzewski et al. 1989). Eine Bestimmung der einzelnen Cys-Leukotriene (LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub> und LTE<sub>4</sub>) in einem Assay ist nicht beschrieben. Um die Selektivität der beschriebenen Leukotrienbestimmung zu verbessern ist es möglich eine HPLC-Methode mit einem Immunoassay in Reihe zu schalten. Bei

der Trennung der Cys-Leukotriene wird die HPLC üblicherweise sowohl mit RIAs als auch mit EIAs gekoppelt.

Die Gas-Chromatographie (GC) ist wie die HPLC eine chromatographische Methode zur Trennung von Stoffgemischen. Ohne Gefahr einer Zersetzung werden verdampfbare Substanzen direkt ins chromatographische System eingebracht. Ist dies nicht der Fall kann die Zielsubstanz durch Derivatisierung mit einem geeigneten Reagens in eine flüchtige Verbindung überführt und auf diesem Wege bestimmt werden. In Bezug auf die Trennung von Leukotrienen wird vorzugsweise die Adsorptionschromatographie (Gas-Fest-Chromatographie) verwendet, wobei eine Siliciumsäule die stationäre Phase bildet. Als Gasphase kommt zumeist das Inertgas Helium zum Einsatz (Borgeat und Picard 1988; Johnson et al. 1999). Im Zuge des analytischen Trennprozesses entsteht ein Verteilungsgleichgewicht zwischen der stationären und der mobilen Phase, welches die Verweildauer auf der Säule und damit die Elutionszeit der einzelnen Substanzen bestimmt. Die Cys-Leukotriene werden meist zu einem sogenannten PFB-Ester (Pentafluorobenzyl-Ester) derivatisiert um eine flüchtige Verbindung herzustellen (Mathews et al. 1988; Wheelan und Murphy 1996).

Auch die Gaschromatographie wird häufig mit einer weiteren Messmethode kombiniert, um die Selektivität der Messung zu erhöhen. In den meisten Fällen handelt es sich hierbei um einen Massenspektrometer (MS). Die Massenspektroskopie ist ein ionenoptisches Verfahren zur Analyse der absoluten Massen und relativen Häufigkeit von Isotopen. Sie beruht auf der Eigenschaft elektrischer und magnetischer Felder, die Ionen hinsichtlich ihrer Masse und kinetischen Energie trennen. Auf Grund der unterschiedlichen „Schwere“ der einzelnen Ionen kommt es zu einer Quantifizierung der einzelnen Substanzen. Die Kombination GC-MS wurde 1991 erstmalig von Fauler zur Identifizierung des Leukotriens E<sub>4</sub> im Urin durchgeführt (Dawson und McGee 1990; Kajita et al. 1985; Tsikas et al. 1995; Tsikas 1998; Wainwright et al. 1989).

## **A.2 Möglichkeiten der Stimulation, Bildung und Freisetzung**

- **Stimulation mit Melittin**

Melittin ist eines der drei wichtigsten wirksamen Peptide des Bienengiftes. Es ist aus 26 Aminosäuren aufgebaut und macht etwa die Hälfte der Trockensubstanz des Giftes aus. Weitere wichtige Bestandteile des Bienengiftes sind Apamin (Peptid), Phospholipase A<sub>2</sub> und Hyalu-

ronidase (Han et al. 2000; Liu et al 1999). Infolge seiner invertseifenartigen Struktur (die N-terminalen 20 Aminosäuren sind im Wesentlichen hydrophob, die restlichen hydrophil und basisch) lagert sich Melittin in die verschiedensten biologischen Membranen ein. Die Membranschädigung führt anschließend zu Kaliumfreisetzung, Zelltod, Mastzellenzerfall, Gefäßerweiterung und damit zur typischen entzündlichen Reaktion (Forth et al. 1993).

Es gibt keine Erklärung zum mechanistischen Zusammenspiel von Melittin und Membranlipiden. Melittin verursacht eine Reihe von unterschiedlichen Wirkungen an der Membran wie hämolytische Aktivität, die Bildung von spannungsabhängigen Kanälen und führt zu einer doppelschichtigen Mizellenbildung (Kourie und Shorthouse 2000; Liu et al. 1999). Es stimuliert auch über G-Proteine die Proteinkinase C, die Phospholipase C und D. Es stimuliert unspezifisch alle Entzündungsmediatoren, darunter auch die Leukotriene. So zeigt sich, dass Melittin sehr vielfältig auf die Zellfunktionen einwirken kann (Lee et al. 2001).

- **Stimulation mit Anti-IgE-Antikörper**

Die Klasse der IgE-Antikörper wurde erstmals von Ishizaka beschrieben (Ishizaka et al. 1966). Die Grundstruktur eines Immunglobulins enthält im Allgemeinen vier Polypeptidketten: Zwei identische leichte Ketten (L-Ketten) und zwei identische schwere Ketten (H-Ketten).

Die IgE-Antikörper binden mit ihrem Fc-Fragment an die hochaffinen FcεRI-Rezeptoren der Mastzellen bzw. der basophilen Granulozyten. Nach der „bridging-Theorie“ kommt es zur Aktivierung und damit zur Degranulation der Zellen wenn ein Antigen, bzw. in diesem Versuch ein Antikörper gegen IgE, mindestens zwei der gebundenen IgE-Antikörper überbrückt (Ishizaka et al. 1978). Über ein guaninnukleotid-bindendes Protein (G-Protein) wird die Phospholipase C aktiviert (Sandborg und Smolen 1988). Diese wiederum hydrolysiert Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP<sub>2</sub>) in Inositol-1,4,5-triphosphat (IP<sub>3</sub>) und 1,2-Diacylglycerol (1,2-DG). Während IP<sub>3</sub> internes Ca<sup>2+</sup> mobilisiert, aktiviert 1,2-DG die Proteinkinase C (Berridge und Irvine 1984; Nishizuka 1984). Die erhöhte intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Konzentration führt nun zu einer Fusion der sekretorischen Granula mit der Zellmembran und schließlich zur Exozytose von Histamin und anderer Entzündungsmediatoren. In der Folge beobachtet man die Sekretion der neu gebildeten Leukotriene (Ring und Ahlborn 1987).

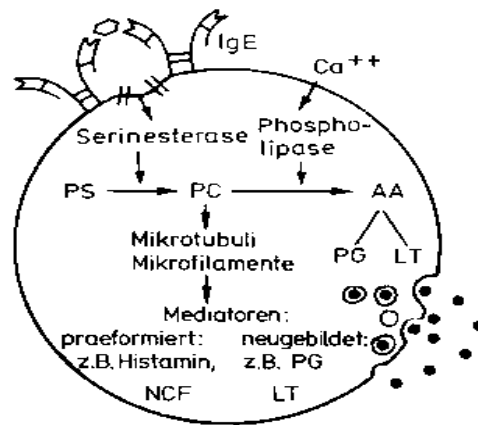


Abb.2: Schematische Darstellung der allergen-IgE-bedingten Freisetzung von Mastzellen oder basophilen Leukozyten (Ring 1995).

Die Vorgänge nach Überbrückung der  $Fc\epsilon RI$ -Rezeptoren sind komplizierter als in diesem Schema dargestellt (Knol et al. 1993). So ist zum Beispiel die erhöhte  $Ca^{2+}$ -Konzentration in der Zelle nicht nur das Ergebnis von intrazellulärer Freisetzung, sondern vor allem von extrazellulärem Einstrom. Es findet unter Abwesenheit von extrazellulärem  $Ca^{2+}$  keine Degranulation statt (Clegg et al. 1985; Foreman und Garland 1974; Knol et al. 1991; MacGlasham et al. 1983).

### • Stimulation mit Calcium Ionophor A23187

Bereits 1979 wurde von Borgeat und Samuelsson eine Aktivierung des Eikosanoidsystems durch das Calcium Ionophor A23187 als Komplexbildener beschrieben (Borgeat und Samuelsson 1979 d). Das Calcium Ionophor stimuliert die Synthese von  $LTB_4$ ,  $LTC_4$ ,  $LTD_4$ ,  $LTE_4$ , 5-HETE, 12-HETE, 15-HETE 5S und 12S-diHETE. Auch werden  $C_{20}$ -oxidierte  $LTB_4$ , 6-trans- $LTB_4$  Isomere ( $\Delta^6$ -trans  $LTB_4$  12-epi- $\Delta^6$ -trans  $LTB_4$ ), 20-OH  $LTB_4$  und 20-COOH- $LTB_4$  stimuliert (Hatzelmann et al. 1994; Salari 1986; Samuelsson 2000).

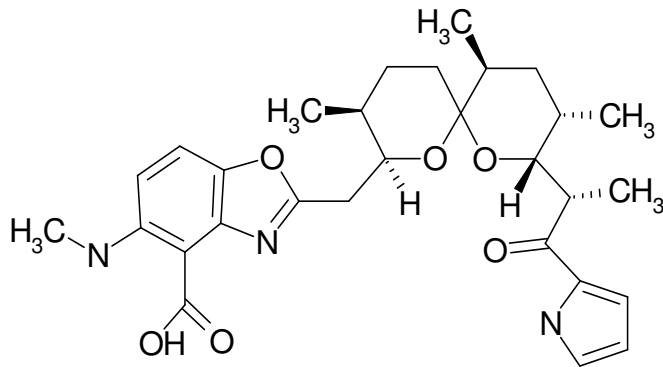
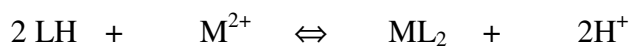


Abb.3: Strukturformel des Calcium-Ionophors A23187

Das Einwirken von A23187 als Komplexbildner führt zu einem elektroneutralen Austausch eines zweiwertigen Kations gegen zwei einwertige Kationen (z.B.  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ) durch die biologische Membran. Das bedeutet, dass ein ausgeprägter Calcium-Einstrom durch die Zellwand hindurch in den Intrazellularraum des PBL stattfindet. Es wird angenommen, dass zwei Moleküle A23187 ein  $\text{Ca}^{2+}$ -Ion in einem Komplex binden und nun elektroneutral die Zellmembran passieren.



(L: A23187;  $\text{M}^{2+}$ :  $\text{Mg}^{2+}$  oder  $\text{Ca}^{2+}$ ; H: Wasserstoff)

In der Zelle wird  $\text{Ca}^{2+}$  gegen  $\text{Na}^+$  bzw.  $\text{K}^+$  ausgetauscht. Hierauf steigt die intrazelluläre Calciumkonzentration  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  an, was zu einer vorübergehenden Hyperpolarisation führt. Dieses bedingt einen  $\text{K}^+$ -Ausstrom, bei gleichzeitigem Beginn eines  $\text{Ca}^{2+}$ -Ausstroms. Eine dadurch verursachte Änderung am  $\text{Na}^+$ -Kanal führt zum Einstrom von  $\text{Na}^+$ -Ionen, die Membran wird wieder depolarisiert (Braquet et al. 1985). Das nun erneut ladungsneutrale Molekül A23187 ist wieder membranpermeabel und verlässt die Zelle. (Deber und Pfeiffer 1976; Pfeiffer und Lardy 1976; Suzuki et al. 1989).

---

A23187 stimuliert folglich die Zelle nicht durch direkten Angriff an der Membran, sondern lediglich durch eine Erhöhung des intrazellulären Calciumspiegels. Diese Erhöhung bewirkt eine Aktivierung der calciumabhängigen Enzyme, wie z.B. der 5-Lipoxygenase (Jaschik et al. 1980; Parker und Aykent 1982) und der Phospholipasen (Boraman et al. 1984; Bosch 1980), was wiederum zur Bildung von Leukotrienen über die Arachidonsäure führt (Conroy et al. 1976; Stenson und Parker 1979).

### A.3 Atopie

Coca und Cooke prägten im Jahre 1923 den Begriff „Atopie“ für Allergien mit familiärer oder genetischer Basis (Burgio 1982).

Mit dem Ausdruck „Allergie“ bezeichnet man eine veränderte Reaktionslage des Organismus gegen bestimmte Substanzen (Allergene), d.h. der Organismus reagiert anders auf diese Stoffe als früher. Dabei kann es sich um eine verstärkte (Hyperergie), verminderte (Hypoergie) oder fehlende Reaktivität (Anergie) handeln. Im heute üblichen Sprachgebrauch wird Allergie jedoch nur noch im Sinne von Hyperergie benutzt und ist damit definiert als „spezifische Änderung der Immunitätslage im Sinne einer krankmachenden Überempfindlichkeit“.

Der Begriff „Atopie“ fasst heute die Neigung zu allergischen Erkrankungen wie atopischer Dermatitis, Asthma bronchiale und allergischer Rhinokonjunktivitis zusammen. Er wird als familiär auftretende Überempfindlichkeit von Haut und Schleimhäuten gegen Umweltstoffe definiert und häufig mit erhöhter IgE-Bildung und/oder veränderter pharmakologischer Reaktivität assoziiert (Burgio 1982; Melnik und Plewig 1991). Es wird davon ausgegangen, dass viele primäre und sekundäre pharmakologische Vermittler der atopischen Reaktionen, die auch gleichzeitig Neurovermittler sind, eine Rollen spielen. Charakteristika der Atopie sind die Insuffizienz im Bereich der  $\beta$ -Rezeptoren, also im  $\beta$ -adrenergen System, sowie eine gesteigerte Empfindlichkeit der  $\alpha$ -adrenergen Rezeptoren oder abnorme Reaktionen der Haut auf Mediatoren des vegetativen Nervensystems (Riva et al. 1979). Wie jedes biologische Phänomen ist auch die Atopie kein Alles-oder-Nichts-Geschehen. Bei Randerscheinungen, deren Zuordnung fraglich ist, könnte man von „latenter Atopie“ sprechen (Ring 1995). Allgemein wird angenommen, dass die Mediatorfreisetzung der Regulation durch das System der cyclischen Nukleotide cAMP und cGMP, die als „second messenger“ fungieren, unterliegt.

---

## Veränderte Reaktionsbereitschaft bei Atopikern

Bereits 1968 stellte Szentivanyi eine Theorie auf, die besagt, dass bei atopischen Erkrankungen das Gleichgewicht des autonomen Nervensystems zugunsten der  $\alpha$ -adrenergen Wirkung verschoben ist. Als pathophysiologischen Mechanismus vermutete er eine Störung der Expression und/oder der Funktion von  $\beta_2$ -Adrenozeptoren. Die aus der  $\beta$ -adrenergen Blockade resultierende verminderte cAMP-Synthese führt, laut Szentivanyi, zu einer erhöhten Mediatorfreisetzung.

Diese These ist bis heute sehr umstritten und wurde zum Ausgangspunkt zahlreicher Studien, so auch in unserem Arbeitskreis. Dabei zeigte sich eine verminderte Aktivität und Funktion der  $\beta_2$ -Adrenozeptoren peripherer Leukozyten von Patienten mit allergischer Rhinokonjunktivitis in der akuten Jahreszeit (Bleise 1993; Haen et al. 1991/1992/1997; Räderer 1996). Mit dem Nachlassen der Symptome waren die Veränderungen des  $\beta_2$ -Adrenozeptor/cAMP-Systems reversibel, wie sich in der symptomfreien Jahreszeit zeigte. Der basale intrazelluläre cAMP-Gehalt blieb bei den Atopikern unabhängig vom Ausmaß der Symptome konstant niedriger im Vergleich zu den Kontrollen (Bleise 1993, Räderer 1996). Diese Ergebnisse entsprechen einer Vielzahl von Studien aus anderen Arbeitskreisen. Dort wurden zum Teil andere Zelltypen, wie Lymphozyten und Mastzellen, oder auch andere Erkrankungen, wie allergisches Asthma und atopische Dermatitis untersucht (Sato et al. 1990; Szeffler et al. 1991).

Unsere Arbeitsgruppe untersuchte auch, ob bei einer atopischen Veranlagung eine veränderte Reaktionsbereitschaft der Mediator sezernierenden Zellen ein Zusammenhang besteht. Betrachtet wurde insbesondere eine veränderte Freisetzungsfreudigkeit der peripheren Leukozyten, d.h. deren Fähigkeit, präformierte und/oder neu zu bildende Mediatoren freizusetzen (Aurnhammer 1998). Weiter wurde der Zusammenhang zwischen Atopie und cAMP-System untersucht (Goller 1998; Ring 1995). In der Literatur wurde bei atopischen Patienten in den meisten Fällen eine erhöhte Histaminfreisetzung beschrieben, widersprüchlich dazu gibt es auch Studien in denen kein Einfluss der atopischen Erkrankung auf die Histaminfreisetzung festgestellt werden konnte (Bull et al. 1993; Butler et al. 1983; Marone et al. 1986). Goller zeigte, dass die Histaminfreisetzung aus peripheren Leukozyten des Menschen nicht durch Isoprenalin über die  $\beta_2$ -Adrenozeptoren dieser Zelle gehemmt werden kann und somit keine Abhängigkeit besteht. Als Frage ergibt sich hieraus, ob andere Entzündungsmediatoren, zum Beispiel die Leukotriene, in direkten Zusammenhang mit dem cAMP-System stehen, beziehungsweise eine Abhängigkeit in Bezug auf die Atopie besteht.

Die Arbeit von Aurnhammer zeigte, dass die Phosphodiesterase (cAMP abbauendes Enzym) Einfluss auf die Histaminausschüttung nimmt. So weisen ein oder mehrere Phosphodiesterase-Isoenzyme bei Atopikern eine höhere Aktivität auf als bei der ebenfalls untersuchten Kontrollgruppe mit gesunden Probanden. Dies erklärt den in weiteren wissenschaftlichen Arbeiten herausgefundenen verminderten cAMP-Gehalt im Plasma oder die Verminderung der Sensitivität gegenüber Isoprenalin (Räderer 1996).

Im Bezug auf die in der Literatur aufgeführten Ergebnisse und die Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe kann ein Einfluss der Histaminausschüttung auf den Arachidonsäuremetabolismus nicht ausgeschlossen werden. So wird berichtet, dass Produkte des 5-Lipoxygenase-Stoffwechsels eine Stimulation der Histaminausschüttung bewirken können (Knol et al. 1993).

Neben den widersprüchlichen Aussagen zum  $\beta$ -adrenergen System existieren auch in Bezug auf die gesteigerte Menge an ausgeschütteten Mediatoren und Leukotrienen unterschiedliche Meinungen. In Studien wird über eine verminderte Bildung der Arachidonsäure und ihrer Metabolite bei atopischer Dermatitis berichtet (Melnik und Plewig 1991). Im Widerspruch dazu steht ein Befund über erhöhte uLTE<sub>4</sub>-Werte, die durch eine Steigerung der Cysteinyl-Leukotrien-Synthese bei atopischer Dermatitis vorkommen. Eine Erhöhung der gemessenen Werte bis zum Fünffachen im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen wird berichtet (Fauler et al. 1992; Fauler et al. 1993). Weiterhin werden auch Studien beschrieben, bei denen es trotz atopischer Erkrankung zu keinerlei Änderung des uLTE<sub>4</sub>-Wertes kommt (Kumlin et al. 1995).

## A.4 Fragestellung

Seit Jahrzehnten wird untersucht, welcher Zusammenhang zwischen atopischen Erkrankungen und der damit assoziierten Bildung von Entzündungsmediatoren besteht. In unserer Arbeitsgruppe wurden bereits Zusammenhänge zwischen dem Auftreten einer Atopie, dem  $\beta_2$ -Adrenozeptor/cAMP-System und einer damit verbundenen Histaminfreisetzung untersucht (Bleise 1993; Aurnhammer 1998; Goller 1998). Die einzelnen Studien wurden unter Berücksichtigung des saisonalen Auftretens der Erkrankung mit Patientenkollektiven durchgeführt, die eine Prädisposition für eine Atopie mit dem Symptom einer allergischen Rhinokonjunktivitis zeigten. Im Rahmen dieser Studien konnte bei den beschriebenen Patienten eine Subsensitivität von  $\beta_2$ -Adrenozeptoren sowie eine konstante Erniedrigung des basalen cAMP-



---

Gehaltes in den peripheren Blutleukozyten unabhängig vom saisonalen Bezug festgestellt werden (Aurnhammer 1998). Störungen im cAMP-Metabolismus von Leukozyten, die als Zellen des Immunsystems direkt an allergischen und entzündlichen Prozessen beteiligt sein können, sind ein gemeinsames Charakteristikum atopischer Erkrankungen (Bleise 1993). Zudem scheint das Stadium der Erkrankung einen Einfluss auf das Ausmaß spontaner Histaminfreisetzung zu haben (Räderer 1996). Die These der hier vorgestellten Arbeit war es zu erörtern, ob die Genese und Aktivität weiterer Entzündungsmediatoren (z.B. der Cysteinyl-Leukotriene) vom Status der Ausprägung einer Atopie abhängt und inwieweit ein saisonaler Zusammenhang mit dem Symptomstatus der Grunderkrankung hergestellt werden kann.

#### **Ansatz zur Lösung der mit der Fragestellung verbundenen methodischen Probleme:**

1. Entwicklung einer Methode zur analytischen Bestimmung von Cysteinyl-Leukotrienen ( $LTC_4$ ,  $LTD_4$  und  $LTE_4$ ) via HPLC unter Berücksichtigung geeigneter Aufreinigungsschritte des Probenmaterials.
2. Abwägen der Eignung verschiedener analytischer Methoden zur Bestimmung von Cysteinyl-Leukotrienen im Rahmen der beabsichtigten klinischen Untersuchungen.
3. Auswahl geeigneter Reagenzien zur Stimulation von Cysteinyl-Leukotrienen und Überprüfung der Eignung ausgewählter Stimulationsreagenzien für die geplanten klinischen Untersuchungen.
4. Untersuchung von Konzentrations- und Zeitabhängigkeit des Stimulationsprozesses und evtl. vorhandener weiterer Einflussfaktoren.

#### **Zielparameter zur Bestätigung der vorgestellten Arbeitshypothese im Rahmen der nachfolgenden klinischen Studien:**

1. Untersuchung der saisonalen Abhängigkeit des basalen Leukotriengehaltes. Kann dieser als Parameter für den Verlauf einer atopischen Erkrankung herangezogen werden?
2. Ist die Stimulierbarkeit von Phospholipase  $A_2$  und Lipoxygenase bei Atopikern im Vergleich zu Nicht-Atopikern verändert? Welchen Einfluss hat der Messzeitpunkt?

## B Material und Methoden

### B.1 Verbrauchsmaterial

#### B.1.1 Einmalartikel

|   |                        |
|---|------------------------|
| Einmalspritzen 20 ml Luer   | Braun, Melsungen, D    |
| Pipettenspitzen 10-5000 µl  | Eppendorf, Hamburg, D  |
| Zentrifugenröhrchen 12, 50 ml   | Sarstedt, Nürnberg, D  |
| Butterfly Venofix 21 G  | Braun, Melsungen, D    |
| Eppendorf-Cup 1,5 ml  | Sarstedt, Nürnberg, D  |
| Sep-Pak <sup>®</sup> C <sub>18</sub> -Kartusche                       | Waters, Eschborn, D    |
| s-Monovetten <sup>®</sup><br>(9ml KE Kalium EDTA 1,6 mg EDTA/ml Blut) | Sarstedt, Nümbrecht, D |

#### B.1.2 Chemikalien

##### B.1.2.1 Substanzen

|   |                              |
|---|------------------------------|
| Acetonitril reinst. für HPLC                    | J.T. Baker, Deventer, N      |
| Anti-IgE Serum                                  | Dako GmbH, Hamburg, D        |
| Arachidonsäure                                  | Sigma Chemie, Deisenhofen, D |
| Calcium Ionophor A23187                         | Sigma Chemie, Deisenhofen, D |
| Calciumchlorid                                  | Merck, Darmstadt, D          |
| di-Natriumhydrogenphosphat x 2 H <sub>2</sub> O | Merck, Darmstadt, D          |
| Essigsäure 100%                                 | Merck, Darmstadt, D          |
| Ethylendiamintetraessigsäure                    | Merck, Darmstadt, D          |
| HETE-Gemisch                                    | Sigma Chemie, Deisenhofen, D |
| Kaliumchlorid                                   | Merck, Darmstadt, D          |
| Kaliumdihydrogenphosphat                        | Merck, Darmstadt, D          |

|                                      |                                       |
|--------------------------------------|---------------------------------------|
| Leukotrien B <sub>4</sub>            | Sigma Chemie, Deisenhofen, D          |
| Leukotrien C <sub>4</sub>            | Sigma Chemie, Deisenhofen, D          |
| Leukotrien D <sub>4</sub>            | Sigma Chemie, Deisenhofen, D          |
| Leukotrien E <sub>4</sub>            | Sigma Chemie, Deisenhofen, D          |
| Leukotrien-Gemisch                   | Sigma Chemie, Deisenhofen, D          |
| Macrodex 6 %                         | Pharmalink Basl kemedel AB, Spanga, S |
| Magnesiumsulfat x 7 H <sub>2</sub> O | Merck, Darmstadt, D                   |
| Melittin                             | Sigma Chemie, Deisenhofen, D          |
| Methanol reinst. für HPLC            | J.T. Baker, Deventer, N               |
| Natriumchlorid                       | Merck, Darmstadt, D                   |
| Natriumhydrogencarbonat              | Merck, Darmstadt, D                   |
| Natriumhydroxid                      | Merck, Darmstadt, D                   |
| Prostaglandin B <sub>2</sub>         | Sigma Chemie, Deisenhofen, D          |
| Salzsäure 1 N                        | Merck, Darmstadt, D                   |
| Tetrabutylammoniumdihydrogenphosphat | Biochrom KG, Berlin, D                |
| Tetrahydrofuran                      | Sigma Chemie, Deisenhofen, D          |
| Trypan blau 0,5 % (v/v)              | Biochrom KG, Berlin, D                |
| Ultra pure water                     | Biochrom KG, Berlin, D                |

### B.1.2.2 Herstellung der Lösungen

- Hank's Puffer:

Der Hank's Puffer kam mit veränderter Konzentration der Salze Calciumchlorid und Magnesiumsulfat zum Einsatz. Die Konzentration des Calciumchlorids wurde von 185,5 mg/l auf 244,1 mg/l erhöht, die des Magnesiumsulfates von 200,0 mg/l auf 295,8 mg/l. (Yu et al. 1995).

|   |             |
|---|-------------|
| CaCl <sub>2</sub>                                     | 244,1 mg/l  |
| KCL   | 400,0 mg/l  |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                       | 60,0 mg/l   |
| MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O                | 295,8 mg/l  |
| NaCL  | 8000,0 mg/l |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O | 60,0 mg/l   |
| NaHCO <sub>3</sub>                                    | 350,0 mg/l  |

Die Salze wurden in aqua tridest. gelöst und die Lösung anschließend mit Hilfe einer geeichten Glaselektrode unter Zugabe von 2,5 N Natronlauge auf pH 7,4 eingestellt.

- Tris CM-Puffer:

Der Tris CM-Puffer setzt sich aus folgenden Bestandteilen zusammen:

|  |             |
|--|-------------|
| Tris(hydroxymethyl)aminomethan         | 3028,5 mg/l |
| NaCl                                   | 7012,8 mg/l |
| KCl                                    | 372,8 mg/l  |
| CaCl <sub>2</sub>                      | 88,2 mg/l   |
| MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O | 203,2 mg/l  |

Die Salze wurden in aqua tridest. gelöst und die Lösung anschließend mit Hilfe einer geeichten Glaselektrode unter Zugabe von HCl-Lösung auf pH 7,4 eingestellt.

### B.1.3 Geräte

|   |   |                               |
|---|---|-------------------------------|
| Analysenwaage   | Digitalwaage 1219 MP                          | Sartorius, Göttingen, D       |
| Computersoftware  | Microsoft Word 98                             | Microsoft Corp., Redmond, USA |
|   | Microsoft Excel 6                             | Microsoft Corp., Redmond, USA |
|   | Microsoft Windows 98                          | Microsoft Corp., Redmond, USA |
|   | Sigma Plot 2001                               | Jandel Corp., USA             |
|   | ISIS Draw 2.0                                 | Microsoft Corp., Redmond, USA |
| Cysteinyl-Leukotrien EIA Kit  | Cayman Chemical                               | Michigan, USA                 |
| Leukotrien C <sub>4</sub> /D <sub>4</sub> /E <sub>4</sub> ELISA Kit | Neogen Corp.                                  | Lexington KY, USA/Kanada      |
| HPLC  |   |                               |
| - Pumpe   | High Precision M 480G                         | Idstein, Germering, D         |
| - Degaser   | DG 1310                                       | Idstein, Germering, D         |
| - Probengeber   | Gina 50                                       | Idstein, Germering, D         |
| - Detektor  | UVD 320S                                      | Idstein, Germering, D         |
| - Software  | Chromeleon Version 4.32                       | Idstein, Germering, D         |
| - Säulen  | ODS-Hypersil C <sub>18</sub> 5 µm, 125x4,6 mm | Bischoff, Leonberg, D         |
|   | ODS-Hypersil C <sub>18</sub> 3 µm, 250x4,6 mm | Bischoff, Leonberg, D         |
| - Vorsäule  | ODS-Hypersil C <sub>18</sub> 5 mm             | Bischoff, Leonberg, D         |
| - Probengläschen  | Cleanpack 32 x 11,6 mm                        | Varian GmbH, Darmstadt, D     |

|                                |                                    |  |
|--------------------------------|------------------------------------|--|
| Microtiterplatten Reader       | Tecan Spectra                      | Tecan, Crailsheim, D                         |
| Software                       | easy Winfitting                    |  |
| Mikroskop                      | HM-Lux 3                           | Ernst Leitz GmbH, Wetzlar, D                 |
| pH-Meter                       | Modell 530                         | WTW, Weilheim, D                             |
| Pipetten                       | 10, 100, 200, 1000, 5000 µl        | Eppendorf, Hamburg, D                        |
| Probenschüttler                | Thermomixer comfort                | MTP Eppendorf, Hamburg, D                    |
| S-Monovetten®                  |                                    | Sarstedt, Nümbrecht, D                       |
| SPE-Vakuum<br>Extraktionsgerät |                                    |  |
| - Vakuumstation                | Extraktion Manifold                | Waters, Milford, USA                         |
| - Vakuumpumpe                  | Vacuum pump 100v/60Hz              | Waters, Milford, USA                         |
| - Woulff'sche Flasche          | Duran®                             | Sartorius AG, Göttingen, D                   |
| Ultraschallbad                 | Sonorex                            | Bandelin electronic GmbH +<br>CoKG Berlin, D |
| Wasseraufbereitung             | Mili-Q plus                        | Millipore S.A., Molsheim, F                  |
| Wasserbad                      | GFL 1086                           | GFL, Burgwedel, D                            |
| Zählkammer                     | Neubauerkammer                     | Rudolph Brand, Wertheim/Main, D              |
| Zentrifuge                     | - Megafuge 1,0<br>- Megafuge 2,0 R | Heraeus, Hanau, D                            |
| Vakuumverdampfung              |                                    |  |
| - IR-Dancer                    | Tecconculst + Trading              | Eggstett,D                                   |
| - Kühlfalle                    | Heto Inter Med,                    | Würzburg, D                                  |
| - Pumpe                        | PC 2004 Vario                      | Vacuubrand, Wertheim, D                      |

## B.2 Methoden

### B.2.1 methodische Untersuchungen

#### B.2.1.1 HPLC-Analytik

##### B.2.1.1.1 Fließmittel für die HPLC

|                       |           |               |         |
|-----------------------|-----------|---------------|---------|
| <u>Fließmittel I:</u> | Lösung 1: |               |         |
|                       |           | EDTA          | 0,05 %  |
|                       |           | Eisessig      | 2,50 %  |
|                       |           | aqua tridest. | 97,45 % |
|                       | Lösung 2: |               |         |
|                       | Methanol  | 100,00 %      |         |

Lösung 1 wurde mit einer geeichten Glaselektrode durch Zugabe von 2,5 N Natronlauge auf einen pH von 4,5 eingestellt.

| Zeit [min] | Mischungsverhältnis |                    |
|------------|---------------------|--------------------|
|            | Methanol [%]        | Wasser/HAc/EDTA[%] |
| 0-20       | 60                  | 40                 |
| 20-30      | 70                  | 30                 |
| 30-50      | 85                  | 15                 |

Tab.1: Mischungsverhältnis bzw. Gradientenmischung

|                        |                 |        |
|------------------------|-----------------|--------|
| <u>Fließmittel II:</u> | Tetrahydrofuran | 0,1 %  |
|                        | Aqua tridest.   | 40,0 % |
|                        | Acetonitril     | 59,9 % |

Dem Fließmittel wurde eine Tetrabutylammoniumphosphat-Lösung zugegeben (Endkonzentration der Lösung 0,005 M) (Ibe et al. 1987).

---

|                         |               |        |
|-------------------------|---------------|--------|
| <u>Fließmittel III:</u> | Eisessig      | 1,0 %  |
|                         | Acetonitril   | 33,0 % |
|                         | Aqua tridest. | 66,0 % |

Der pH-Wert wurde mit Hilfe einer geeichten Glaselektrode durch Zugabe von 1N Ammoniumhydroxid-Lösung auf 5,6 eingestellt (Pace-Asciak et al. 1985).

Bei allen Fließmittel wurden die einzelnen Komponenten jeweils miteinander vermischt, die Feststoffe gelöst, der pH-Wert eingestellt und anschließend 10 Minuten im Ultraschallbad entgast.

### **B.2.1.1.2 Aufarbeitung der Proben**

Für die Untersuchungen wurden die Proben entweder direkt als Lösung in die HPLC eingespritzt oder zuvor über eine Sep-Pak<sup>®</sup> Vac RC C<sub>18</sub>-Kartusche (500 mg) aufkonzentriert und gereinigt.

Für die Vermessung der Leukotriene war eine Aufreinigung der Proben notwendig, um Störungen durch Begleitstoffe bei den Messungen auszuschließen. Dies ermöglicht eine gleichzeitige Anreicherung der Proben. Um eine möglichst hohe Wiederfindung bei möglichst niedriger Konzentration an Begleitstoffen zu erreichen wurden mehrere unterschiedliche Sep-Pak<sup>®</sup>-Methoden untersucht. Wenn nicht anders beschrieben wurden immer Sep-Pak<sup>®</sup> Vac RC C<sub>18</sub>-Kartusche (500 mg) für die Aufkonzentrierung verwendet.

Zu der Aufkonzentrierung der Proben wurden je nach Versuch unterschiedliche Volumina der Proben auf die Sep-Pak<sup>®</sup>-Säulchen aufgetragen. Dazu wurde jede Sep-Pak<sup>®</sup> C<sub>18</sub>-Kartusche zunächst mit 5 ml Methanol und 5 ml Wasser konditioniert. Anschließend wurde die Probe aufgetragen, die Kartusche anschließend mit 5 ml Wasser und 5 ml Hexan gewaschen, und mit 10 ml eines Gemisches aus Ethanol/Wasser (90/10) eluiert (Cayman 2001). Mit Hilfe eines SPE-Vakuum Extraktions-Gerätes konnte jede Elution bei gleichbleibenden Bedingungen durchgeführt werden (es herrschte ein konstanter Druck von 5 mbar). Die Proben wurden in einem Vakuumverdampfer (IR-Dancer) getrocknet und der Rückstand mit 150 µl Methanol/Wasser (70/30) oder EIA-Puffer wieder in Lösung gebracht. Je 70 µl vom Eluat dieser Proben wurden für die Messungen mittels HPLC verwendet.

Zur Bestimmung der Wiederfindungsrate der Leukotriene über die Sep-Pak<sup>®</sup> wurden vier unterschiedliche Aufarbeitungsmethoden untersucht:

|                | Methode Nr.1                            | Methode Nr.2   | Methode Nr.3  | Methode Nr.4                       |
|----------------|---|--|---|------------------------------------|
| Konditionieren | 5 ml MeOH<br>5 ml H <sub>2</sub> O      | 5 ml MeOH<br>10 ml H <sub>2</sub> O<br>5 ml 0,1 % EDTA | 2 ml MeOH<br>2 ml H <sub>2</sub> O<br>2 ml H <sub>2</sub> O | 2 ml MeOH<br>5 ml H <sub>2</sub> O |
| Probenaufgabe  | 10 µl LT                                | 10µl LT  | 10 µl LT  | 10 µl LT                           |
| Waschen        | 5 ml H <sub>2</sub> O<br>5 ml Hexan     | kein Waschvorgang                                      | kein Waschvorgang   | 5 ml 5 % MeOH                      |
| Eluieren       | 10 ml EtOH/<br>H <sub>2</sub> O (90/10) | 10 ml MeOH   | 2 ml MeOH   | 1 ml MeOH                          |

Tab.2: Sep-Pak<sup>®</sup>- Methoden für die Leukotrienaufarbeitung

### B.2.1.1.3 Bestimmung der Wiederfindungsrate

Um den Substanzverlust während der Extraktion zu quantifizieren, wurde die Wiederfindungsrate berechnet. Bei den mit Sep-Pak<sup>®</sup>-Kartuschen gereinigten Proben wurde die Wiederfindung  $W$  wie folgt berechnet:

$$W = \frac{\overline{x}_i}{x_s} * 100[\%]$$

$x_s$ : Soll-Wert

$\overline{x}_i$ : Ist-Mittelwert (gemessener Mittelwert)

### B.2.1.1.4 Durchführung der Messung

Als stationäre Phase wurde eine reversed-phase ODS-Hypersil C<sub>18</sub> HPLC-Säule (250 x 4,6 mm) mit einer Teilchengröße von 3 µm eingesetzt. Die Trennung der Leukotriene erfolgte durch einen Gradienten aus Methanol und Wasser/0,1 % Essigsäure/50µM EDTA (=FM I).



Über eine Messdauer von 40-50 Minuten wurde das Mischungsverhältnis der Fließmittelbestandteile verändert. In dem Zeitraum von 0-20 Minuten war es ein Verhältnis von MeOH/FM I 60/40 %, von 20-30 Minuten ein Verhältnis von 70/30 % und ab 30 Minuten Messzeit ein Verhältnis von 85/15 %. Das Injektionsvolumen variierte je nach Versuch. Die Detektion erfolgte mittels eines Diodenarray-Detektors mit 3D Funktion bei 285 nm für die Cysteinyl-Leukotriene und bei 230 nm für die HETE-Derivate. Ein Vorteil der Detektion mit 3D-Funktion besteht darin, dass über dem Chromatogramm UV-Spektren aufgenommen werden können und dadurch die Möglichkeit eine Abschätzung des Reinheitsgrades der aufgetzeichneten Peaks (sog. peak purity) gegeben ist. Zwischen den einzelnen Messungen wurde ein Spülprogramm für die Konditionierung der HPLC-Säule geschaltet. Die Dauer des Spülprogramms betrug 15 Minuten mit einer Fließmittelzusammensetzung von Methanol/FM I (60/40 %). Gleichzeitig wurde die Spritze des Probengebers mit 250 µl Wasser gespült. Die Flussrate betrug 0,6 ml/min.

Während der Methodenentwicklung wurde die Versuchsdurchführung geändert. Tabelle 3 zeigt die grundsätzlichen Änderungen im Bezug auf Fließmittel, Flussrate und Messdauer.

|   | <b>Fluss</b><br>[ml/min] | <b>Zeit</b><br>[min]                          | <b>FM Zusammensetzung</b>  |
|---|--------------------------|---|--|
| <b>Programm I</b><br>LTE FM II                | 1,0                      | 0 – 30  | konstant   |
| <b>Programm II</b><br>Multi Step FM III       | 0,5<br>1,0               | 0 – 5<br>5,1 – 15                             | konstant   |
| <b>Programm III</b><br>LT FM I                | 0,6                      | 0 – 20<br>20,1 – 30                           | MeOH 60 %, FM I 40 %<br>MeOH 85 %, FM I 15 %   |
| <b>Programm III.1</b><br>Gradient 50 Min FM I | 0,6                      | 0 – 20<br>20,1 – 30<br>30,1 – 40<br>40,1 – 50 | MeOH 60 %, FM I 40 %<br>MeOH 65 %, FM I 45 %<br>MeOH 70 %, FM I 30 %<br>MeOH 85 %, FM I 15 % |
| <b>Programm III.2</b><br>Gradient FM I        | 0,6                      | 0 – 20<br>20,1 – 30<br>30,1 – 50              | MeOH 60 %, FM I 40 %<br>MeOH 70 %, FM I 30 %<br>MeOH 85 %, FM I 15 %                         |

Tab.3: HPLC-Programme für die Methodenentwicklung

### B.2.1.1.5 Validierung

Im Rahmen einer Validierung wird durch Untersuchung und Bereitstellung eines Nachweises gezeigt, dass die besonderen Anforderungen an eine neu entwickelte Methode für einen speziell beabsichtigten Gebrauch erfüllt werden; die Einsetzbarkeit für den beanspruchten analytischen Zweck wird hierdurch bewiesen.

- **Präzision**

Die **Präzision** ist das Maß für die Übereinstimmung unabhängiger Analysenergebnisse untereinander, also damit das Maß für die Streuung dieser Ergebnisse. Sie gibt den Grad der Streuung einzelner Werte um den Mittelwert an, diese Streuung ist das Ergebnis von zufälligen Fehlern. Als Streuungsmaß und damit als Präzisionsmaß wird die Standardabweichung  $s$  und die Variationskoeffizient  $V_K$  bzw. relative Standardabweichung  $s_{rel}$  verwendet.

$$s = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \qquad V_K = \frac{s}{\bar{x}} = \frac{s_{rel}}{100\%}$$

$x_i$ : Einzelwert

$\bar{x}$ : Mittelwert (gemessener Mittelwert)

Die Wiederholpräzision, auch Intra-Assay bezeichnet, beschreibt die Präzision unter Wiederholbedingungen, unter denen voneinander unabhängige Ermittlungsergebnisse in kurzen Zeitabständen erhalten werden. Es wird mit demselben Verfahren, mit der identischen Probe, in demselben Labor, durch denselben Bearbeiter und mit derselben Geräteausrüstung gearbeitet.

Zum Vergleich der Präzision zweier Messwertreihen wird die Variationskoeffizient  $V_K$  verwendet.

---

Berechnung der Standardabweichung bei Doppelbestimmung :

$$s = \sqrt{\frac{1}{2n} \sum_{j=1}^n (x_{j1} - x_{j2})^2}$$

$x_i$  : Einzelwert

$\bar{x}$ : Mittelwert (gemessener Mittelwert)

Eine weitere Präzisionsart ist die „Tag-zu-Tag“ Präzision. Mit Hilfe dieses Verfahrens wird die Präzision von Messserie zu Messserie untersucht. Im Unterschied zur Wiederholpräzision werden verschiedenen Messserien als Datengrundlage herangezogen, die an unterschiedlichen Tagen erhoben werden. Für die Ermittlung der Inter-Assay-Standardabweichung wurden die Retentionszeiten von drei weiteren Messreihen (Messung I; Messung II; Messung III) an jeweils unterschiedlichen Tagen mit verschiedenen Reagenzien und Lösungen aus einer anderen Charge ermittelt.

Pro Messung wurden 5 µl LTC<sub>4</sub>-Standard eingespritzt bei einer Probenanzahl n = 10 je Messreihe und mit dem HPLC-Programm III.2 (vgl. B.2.1.1.4) vermessen.

- **Linearität**

Die **Linearität** stellt den mathematischen Zusammenhang zwischen Messwert und Konzentration bzw. Menge dar. Die Überprüfung der Linearität wird mittels linearer Regression, Bildung des Korrelationskoeffizienten r, sowie Bildung der Residuen durchgeführt. Die Residuen sind die vertikalen Abstände der Messwerte von der Regressionsgeraden. Hat man bei der Regressionsgerade das richtige mathematische Modell gewählt (hier:  $y = ax + b$ ), so sind die Residuen um den „Nullwert“ normal verteilt. Kann über die Linearität mit den bisher genannten Methoden keine eindeutige Aussage getroffen werden, muss eine Varianzanalyse durchgeführt werden.

Zur Überprüfung der Linearität wählten wir einen Arbeitsbereich mit Konzentrationen von 5,6 ng/ml bis 440,0 ng/ml LTC<sub>4</sub>. Die Messung begann mit den kleinsten Probenmengen, um eine Verschleppung der Proben auszuschließen. Die Messungen wurden mit dem HPLC-Programm III.2 durchgeführt.

---

- **Richtigkeit**

Die **Richtigkeit** zeigt das Maß der Übereinstimmung zwischen dem ermitteltem Wert und einem als richtig angesehenen Wert, sie ist eine besonders wichtige Größe bei Messungen. Über die Richtigkeit kann man eine Aussage über einen möglichen systematischen Fehler der Methode treffen. Wie auch in diesem Fall wird bei der Überprüfung von HPLC-Methoden die Richtigkeit meist mit einem Immunoassay, in unserem Beispiel dem der Firma Cayman Chemical, „cross-validiert“. Da es sich bei dem vorliegenden Assay um eine bereits validierte Methode handelt kann von dessen Richtigkeit ausgegangen werden.

Für die Überprüfung der HPLC-Methode wurden 0,03 µg/ml EIA-Standardlösung in die HPLC eingespritzt und die Retentionszeit in der HPLC mit dem Sigma LTC<sub>4</sub>-Standard 0,6 µg/ml verglichen. Die Messungen wurden mit dem HPLC-Programm III.2 durchgeführt. Die Richtigkeit wird mit Hilfe des t-Tests überprüft.

- **Robustheit**

Die **Robustheit** beschreibt die Fähigkeit eines Verfahrens, ein Ergebnis zu liefern, das durch variierende Bedingungen nicht oder nur unwesentlich verfälscht wird. Es werden immer Parameter ausgewählt, die eine Auswirkung auf die Wiederholbarkeit der Messung haben könnten.

Die vorgestellte HPLC-Methode wurde in vier ausgewählten Parametern variiert:

- der Wellenlängen 283 nm – 285 nm
- der Flussrate 0,5 ml/min – 0,6 ml/min
- pH-Wert des Fließmittels 3,5; 4,5; 5,0
- Verändertes Lösungsmittel: Fließmittel oder Zellsuspension

Durch die geringe Menge der Wellenlängenänderung konnte zum Beispiel die mögliche Auswirkung auf die Messergebnisse einer älteren UV-Lampe überprüft werden. Es sollte untersucht werden, welche Auswirkung eine geringfügige Schwankung der Genauigkeit der UV-Lampe auf die Robustheit der Methode hat. Bei der Variation der Flussrate und des pH-Wertes des Fließmittels kann deren Abhängigkeit gezeigt werden. Mit der Veränderung des Lösungsmittels (Puffer oder Zellsuspension) kann eine Aussage über die Stabilität der verwendeten Proben gemacht werden. Die Stabilität spielt aus folgendem Grund eine Rolle: Leukotriene werden aus PBL gewonnen. Diese Suspension enthält nicht nur Leukotriene, sondern eine Mehrzahl andere metabolisch aktiver Stoffe, die sich auf die Stabilität der Leukotriene auswirken könnten.

Das in den Versuchen verwendete Injektionsvolumen betrug 10 µl bis 30 µl der Leukotriene LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub> und LTE<sub>4</sub>. Dieses wurde mit dem HPLC-Programm III.2 vermessen.

- **Selektivität und Spezifität**

Die **Selektivität** ist die Fähigkeit einer Methode, verschiedene, nebeneinander zu bestimmende Komponenten ohne gegenseitige Störung zu erfassen und somit eindeutig zu identifizieren. Die **Spezifität** hingegen ist die Fähigkeit einer Methode, eine Substanz oder eine Substanzklasse ohne Verfälschung durch andere in der Probe vorhandenen Komponenten zu erfassen und somit eindeutig zu identifizieren.

Um die Selektivität zu überprüfen wurde ein Leukotriengemisch-Standard (Injektionsvolumen: 20 µl) aus LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub> und LTE<sub>4</sub> in die HPLC eingespritzt und vermessen. Besonderes Augenmerk wurde auf Basislinientrennung der erhaltenen Peaks und die Übereinstimmung der UV-Spektren gelenkt.

Um die Spezifität zu bestimmen wurde ein Gemisch aus LTB<sub>4</sub>, Cysteinyl-Leukotriene, HETE-Gemisch in die HPLC eingespritzt und vermessen.

- **Nachweis- und Bestimmungsgrenze**

Die **Nachweisgrenze** wird laut Deutscher Industrie Norm (DIN) als die kleinste nachweisbare Menge beschrieben und die **Bestimmungsgrenze** als kleinste quantifizierbare Menge.

Über ein in der Chromatographie häufig angewandtes Peak/Rausch-Verhältnis werden auch in dieser Arbeit die Nachweis- und die Bestimmungsgrenze festgelegt.

Sie sind wie folgt definiert:

Nachweisgrenze:                      Peak/Rausch-Verhältnis        =        3/1

Bestimmungsgrenze:                Peak/Rausch-Verhältnis        =        9/1

Zur Ermittlung der Ergebnisse wurden jeweils die Werte aus zehn unterschiedlichen Messungen bestimmt (Injektionsvolumen 10 µl LTC<sub>4</sub>; HPLC-Programm III.2)

### **B.2.1.2                      Messung der Cysteinyl-Leukotriene mittels Assay**

Für die Vermessung der Leukotriene im methodischen Teil wurden sowohl ein ELISA-Kit der Firma Neogen als auch ein EIA-Kit der Firma Cayman verwendet. Für die klinischen Untersuchungen kam nur der EIA-Kit der Firma Cayman zum Einsatz.

Um die entwickelte HPLC-Methode (Programm III.2) zu bewerten, wurden weitere Methoden zur Bestimmung der Leukotriene untersucht und mit den Ergebnissen aus der Validierung der HPLC-Methode verglichen.

Bei den angewandten Assays wurden im Unterschied zur HPLC-Methode keine Einzelbestimmung der Cysteinyl-Leukotriene durchgeführt, sondern die Gesamt-Leukotrienmengen bestimmt, d.h. die Menge der Leukotriene LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub> und LTE<sub>4</sub> als Summenwert.

#### **B.2.1.2.1 Aufarbeitung der Proben**

Die Aufarbeitung der Proben für die Untersuchungen verlief wie unter B.2.1.1.2 beschrieben. Für die klinischen Untersuchungen wurden die Proben (Zellsuspension) stets über die Sep-Pak<sup>®</sup> Vac RC C<sub>18</sub>-Kartusche (500 mg) aufkonzentriert und gereinigt.

#### **B.2.1.2.2 EIA-Kit**

##### Theorie:

Dieser Assay basiert mechanistisch auf der Konkurrenz zwischen freien Cysteinyl-Leukotrienen und einem Cysteinyl-Leukotrien-Acetylcholinesterase-Konjugat (Tracer) um eine begrenzte Menge an Cysteinyl-Leukotrien-Antiserum. Die Konzentration des Tracers wird konstant gehalten, während die Konzentration von freien Leukotrienen (Standard oder Probe) variiert. Die Menge des Tracers, die das Antiserum binden kann, ist indirekt proportional zu der Konzentration der Cysteinyl-Leukotriene in der Probe. Dieser Antikörper-Cysteinyl-Leukotrien-Komplex bindet an den monoklonalen Kaninchen-Antikörper, der fest an die Vertiefungen der Platte gebunden ist. Die Platte wird gewaschen, um die nicht gebundenen Reagenzien zu entfernen. Anschließend wird jeder Vertiefung Ellman's Reagens zugegeben, das das Substrat für die Cholinesterase enthält. Das Produkt der enzymatischen Reaktion hat eine gelbe Färbung und zeigt bei 412 nm ein Absorptionsmaximum. Die Intensität dieser spektrophotometrisch vermessenen Farbe ist proportional zur Menge des gebundenen Tracers in den Vertiefungen, welche indirekt proportional zur Menge des freien Cysteinyl-Leukotriens in den Vertiefungen der Platte ist.

$$\text{Absorption} \propto [\text{gebundener Cysteinyl-Leukotrien-Tracer}] \propto 1/[\text{Cysteinyl-Leukotriene}]$$

Praktische Durchführung:

Die Reagenzien werden in hochgereinigtem Wasser gelöst bzw. damit verdünnt. Nach Herstellung der Standardreihe (Konzentrationsbereich 7,8 pg/ml - 1000 pg/ml) werden je 100 µl Standard und Probe in die Vertiefungen pipettiert. Anschließend werden 50 µl Tracer und 50 µl Antiserum zugegeben. Das mit einer Folie verschlossene Gemisch wird im Probenschüttler bei 30 rpm und 23°C 18 Stunden inkubiert. Nach der Inkubation wird die Platte mit Waschpuffer gewaschen und 200 µl Ellmann's Reagenz zugegeben. Anschließend wird die Platte wieder mit einer Folie abgeklebt und im Probenschüttler bei 300 rpm und 23°C erneut eine Stunde inkubiert. Danach kann die Microtiterplatte mit dem Reader bei 412 nm vermessen und ausgewertet werden.

**B.2.1.2.3 Auswertung des EIA-Kits**

Die Auswertung erfolgt mit dem Microtiterplatten-Reader. Nach vorsichtigem Schütteln der Platte werden die Proben bei 412 nm vermessen. Als Referenzwellenlänge wird ein Filter mit 620 nm verwendet.

Der korrekt berechnete Wert  $B_0$  wurde ermittelt, indem von dem gemessenen Wert  $B_0$  der nicht spezifische Bindungs-Wert NSB subtrahiert wurde. Es wurden jeweils die ermittelten OD-Werte (optical density values) verwendet.

Berechnung der korrekten maximalen Bindung:

$$B_{0\text{korr}} = B_{0\text{gemess}} - \text{NSB}$$

Berechnung der prozentualen Tracerbindung  $\frac{\%B}{B_0}$ :

$$\frac{\%B}{B_0} = \frac{P - \text{NSB}}{B_{0\text{korr}}} * 100$$

P: Probe oder Standard (OD-Wert)

Die Auswertung erfolgte über das Programm „easy fitting“ (Tecan). Hierbei werden die ermittelten OD-Werte in einen halb-logarithmischen Graphen eingebettet. Über die Gerade errechnet sich die tatsächliche Konzentration der Proben, diese Berechnung führte das oben genannte Computerprogramm durch.

#### **B.2.1.2.4 ELISA-Kit**

##### Theorie:

Der Assay basiert auf einer konkurrierenden Bindung zwischen den Leukotrienen C<sub>4</sub>, D<sub>4</sub> und E<sub>4</sub> und einem enzymatischen Konjugat um eine begrenzte Anzahl von spezifischen Antikörper, die fest an eine Microtiterplatte gebunden sind. Hier liegt der Unterschied zum oben erwähnten EIA, bei dem monoklonale Kaninchen-Antikörper an die Microtiterplatte gebunden sind. Die Menge des enzymatischen Konzentrats wird konstant gehalten, während die Konzentration der freien Leukotriene variiert. Das enzymatische Konjugat und der freie Analyt binden an den in der Platte befindlichen Antikörper. Nach Inkubation wird die Platte gewaschen, um die ungebundenen Reagenzien zu entfernen. Im Anschluss wird das Substrat zugegeben. Nach einer weiteren Inkubation kann das entstandene Produkt bei 650 nm vermessen werden. Es besteht auch die Möglichkeit durch Zugabe von Salzsäure die enzymatische Reaktion zu stoppen. Auf Grund der pH-Verschiebung durch den Säurezusatz kommt es zu einer Veränderung des zu vermessenden Farbstoffes, die Messung erfolgt dann bei einer Wellenlänge von 405 nm.

Die entwickelte Farbe ist indirekt proportional zur Menge der gebundenen Leukotriene

Absorption  $\propto 1 / [\text{Cysteinyl-Leukotriene}]$

##### Praktische Durchführung:

Die Reagenzien werden in hoch gereinigtem Wasser gelöst bzw. verdünnt. Nach der Herstellung der Standardreihen (Konzentrationsbereich von 40 pg/ml - 2000 pg/ml) werden je 50 µl Standard oder Proben in die Vertiefungen der Microtiterplatte pipettiert. Anschließend werden 50 µl Konjugat zugegeben, die Platte einmalig geschüttelt und dann eine Stunde inkubiert. Nach der Inkubation werden die Platte mit Waschpuffer gewaschen, 150 µl Substrat zugegeben und wieder 30 Minuten inkubiert. Mit 50 µl 1 M HCL wird die Reaktion gestoppt, anschließend mit dem Reader vermessen und ausgewertet.



### **B.2.1.2.5 Auswertung des ELISA-Kits**

Die Auswertung mit dem Microtiterplatten-Reader erfolgte bei 405 nm, nachdem die Platte vorsichtig geschüttelt wurde. Als Referenzwellenlänge wurde ein Filter mit 690 nm verwendet.

Die Berechnung der einzelnen Werte erfolgte wie in B.2.1.2.3.

### **B.2.1.3 Stimulationsversuche**

#### **B.2.1.3.1 Probanden**

Für die methodischen Untersuchungen wurde venöses Blut sowohl von Gesunden, als auch von Allergikern verwendet. Eine Charakterisierung und Unterteilung erfolgte dabei nicht. Alle Probanden hatten zum Zeitpunkt der Blutentnahme keine Medikamente eingenommen (Ausnahme: hormonelle Kontrazeptiva). Personen mit akuten Infektionen oder anderen Erkrankungen (z.B. Herz-, Leber- oder Nierenerkrankungen) wurden von den Versuchen ausgeschlossen. Die Blutentnahme fand stets freiwillig und mit dem Einverständnis der Probanden statt.

#### **B.2.1.3.2 Zellpräparation**

- **Blutentnahme**

Zwischen 8.00 Uhr und 10.00 Uhr wurden je nach der im Versuch benötigten Menge 20-100 ml venöses Blut aus der Ellenbogenvene in S-Monovetten<sup>®</sup> abgenommen. Die S-Monovetten<sup>®</sup> enthielten Kalium-EDTA (1,6 mg EDTA/ml Blut) als Antikoagulans. In der klinischen Untersuchung wurden davon je 9 ml (1 Röhrchen) 10 Minuten lang bei 800 g zentrifugiert, das Plasma wurde abgesaugt und für spätere Untersuchungen (RAST) bei -80 °C eingefroren.

- **Isolation der peripheren Blutleukozyten (PBL)**

Die Präparation der PBL wurde mittels Dextransedimentation durchgeführt (Goller 1998, Lichtenstein und Olser 1964). Das Trennprinzip beruht auf der unterschiedlichen Dichte der im Blut vorhandenen Zellen. Hierfür wird in jeder bereits mit 18 ml Blut/EDTA gefüllten Ein-

---

malspritze das vorhandene Blut mit 5 ml Macrodex 6 % überschichtet. Macrodex 6 % ist eine Lösung von 60 g Dextran 60 und 9 g Natriumchlorid in 1000 ml aqua ad injectabilia, dessen Dichte  $1,028 \text{ g/cm}^3$  beträgt. Die so präparierten Spritzen werden zwei Stunden bei Raumtemperatur abgedunkelt in senkrechter Position aufgestellt. Während dieser Zeitspanne wandern die Leukozyten, Thrombozyten, vereinzelte Erythrozyten und das Plasma nach oben in die Dextranschicht, der Großteil der Erythrozyten wandert in die untere Schicht und es bildet sich eine scharfe, deutlich erkennbare Grenze. Der Überstand wird anschließend vorsichtig mit Hilfe einer Butterfly-Kanüle in ein Falconröhrchen 50 ml überführt und 10 Minuten bei 200 g zentrifugiert. Der entstandene Überstand, der Plasma, Dextran und einen großen Teil der Thrombozyten enthält wird verworfen. Mit dem Pellet, den restlichen Thrombozyten, Leukozyten und ein paar Erythrozyten wird weitergearbeitet. Zur Zerstörung der noch vorhandenen Erythrozyten werden 5 ml destilliertes Wasser zugegeben. Durch das hypoosmolare Medium lysieren die Erythrozyten. Nach 12 Sekunden werden 5 ml einer 1,8 % NaCl-Lösung zugegeben, um die Isotonie wieder herzustellen. Während des hypotonen Schocks werden die Erythrozyten zerstört, die PBL jedoch noch nicht. Die entstandene Mischung wird erneut zentrifugiert, 10 Minuten bei  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  und 200 g. Der Überstand wird verworfen und das Zellpellet mit 10 ml Hank's Puffer (B.1.2.2) noch zweimal gewaschen. Das Zellpellet wird anschließend in einer definierten Menge Puffer resuspendiert und die Zellen mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer gezählt. (Anfärbung mit Trypanblau:  $10 \mu\text{l}$  Zellsuspension,  $90 \mu\text{l}$  Puffer und  $100 \mu\text{l}$  Trypanblau). Die Zellsuspension wird mit dem jeweiligen Puffer auf eine bestimmte Zellzahl eingestellt.

#### **B.2.1.3.3      Aufarbeitung der Proben**

Für die Aufkonzentrierung und Reinigung der Zellsuspensionen wurden 5 ml Probe auf die Sep-Pak<sup>®</sup>-Kartuschen aufgetragen. Die Konditionierung und die weiteren Arbeitsschritte wurden wie unter B.2.1.1.2 durchgeführt. Angewendet wurde hierfür die Methode 1. Abweichend davon wurden statt  $150 \mu\text{l}$  Lösungsmittel  $450 \mu\text{l}$  zum Aufnehmen der Probe nach dem Trocknungsprozess verwendet.

#### **B.2.1.3.4      Stimulation der Leukotrienbildung bzw. -freisetzung**

In den Versuchsreihen wurde die Stimulierbarkeit der PBL mit unterschiedlichen Trigger-Substanzen untersucht. Sie wurden aus verschiedenen Substanzklassen ausgewählt, die über

unterschiedliche Wege die Leukotrienbildung bzw. -freisetzung stimulieren: Zum Einen erfolgte die Stimulation mit Melittin, einem biogenen Peptid, das über eine Einlagerung in die Biomembran zur Freisetzung von Leukotrienen führt. Daneben wurde ein unspezifischer Anti-IgE-Antikörper untersucht, der die Aufgabe eines Antigens übernimmt und neben weiteren Komponenten (z.B. Histamin) auch zu einer Leukotrienausschüttung führt. Weiter wurde mit Calcium-Ionophor (A23187) stimuliert, der das Membranpotential indirekt so verändert, dass es zu einer Freisetzung von Leukotrienen kommt. Beim Calcium-Ionophor wurde im Rahmen einer weiteren Versuchsreihe zusätzlich Arachidonsäure zugesetzt, um die Leukotrienfreisetzung zu verstärken.

### **Stimulation mit Melittin**

Bei den Stimulationsversuchen wurden 2,5 ml Zellsuspension mit einer eingestellten Zellzahl von  $3 \times 10^6$  Zellen/ml verwendet, als Verdünnungsmedium diente der Hank's Puffer (vgl. B.1.2.2). Die Zellsuspension wurde mit variierenden Konzentrationen von 0,7 bis  $10,5 \mu\text{M}$  versetzt und fünf bis 30 Minuten bei  $37^\circ\text{C}$  im Wasserbad inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von  $750 \mu\text{l}$  kaltem Methanol gestoppt und bis zur quantitativen Bestimmung bei  $-80^\circ\text{C}$  eingefroren. Je Versuchsreihe wurde stets eine Blindprobe ohne Zugabe von Stimulationsreagenz mit bearbeitet.

### **Stimulation mit Anti-IgE**

Für die Stimulationsversuche mit Anti-IgE wurden 2,5 ml Zellsuspension mit einer eingestellten Zellzahl von  $3 \times 10^6$  Zellen/ml verwendet, als Verdünnungsmedium diente der Hank's Puffer (vgl. B.1.2.2). Die Zellsuspension wurde mit variierenden Mengen von  $25 \mu\text{l}$  bis  $400 \mu\text{l}$  Anti-IgE-Antikörper (1:1000 Verdünnung des Anti-IgE-Serums vom Kaninchen, Proteinkonzentration  $8,3 \text{ g/l}$ ) versetzt und fünf bis 30 Minuten bei  $37^\circ\text{C}$  im Wasserbad inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von  $750 \mu\text{l}$  kaltem Methanol gestoppt und bis zur quantitativen Bestimmung bei  $-80^\circ\text{C}$  eingefroren. Je Versuchsreihe wurde stets eine Blindprobe ohne Zugabe von Stimulationsreagenz mit bearbeitet.

### **Stimulation mit Calcium-Ionophor (A23187)**

Für die Stimulationsversuche mit dem Calcium-Ionophor wurden 2,5 ml Zellsuspension mit einer eingestellten Zellzahl von  $3 \times 10^6$  Zellen/ml verwendet, als Verdünnungsmedium diente der Hank's Puffer (vgl. B.1.2.2). Die Zellsuspension wurde mit  $0,2 \mu\text{M}$  bis  $3,0 \mu\text{M}$  A23187 versetzt und fünf bzw. 15 Minuten bei  $37^\circ\text{C}$  im Wasserbad inkubiert. Die Reaktion wurde

durch Zugabe von 750 µl kaltem Methanol gestoppt und bis zur quantitativen Bestimmung bei -80°C eingefroren. Je Versuchsreihe wurde stets eine Blindprobe ohne Zugabe von Stimulationsreagenz mit bearbeitet. Für die methodischen Untersuchungen wurde die Versuchsdurchführung in kleinen Schritten abgeändert, was jeweils an entsprechender Stelle beschrieben ist.

### **Stimulation mit Calcium-Ionophor (A23187) und Arachidonsäure**

Für die Stimulationsversuche mit der Kombination aus Calcium-Ionophor und Arachidonsäure wurden 2,5 ml Zellsuspension mit einer eingestellten Zellzahl von  $3 \times 10^6$  Zellen/ml verwendet, als Verdünnungsmedium diente der Hank's Puffer (vgl. B.1.2.2). Die Zellsuspension wurde mit 1,2 µM A23187 und 0,25 µM bis 5,0 µM Arachidonsäure versetzt und fünf bzw. 15 Minuten bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 750 µl kaltem Methanol gestoppt und bis zur quantitativen Bestimmung bei -80°C eingefroren. Je Versuchsreihe wurde stets eine Blindprobe ohne Zugabe von Stimulationsreagenz mit bestimmt. Für die methodischen Untersuchungen wurde die Versuchsdurchführung in kleinen Schritten abgeändert, was jeweils an entsprechender Stelle beschrieben ist.

#### **B.2.1.3.5 Quantitative Bestimmung der Leukotriene**

Die eingefrorenen Zellsuspensionen wurden jeweils bei Raumtemperatur aufgetaut und mittels Sep-Pak®-Kartuschen gereinigt bzw. aufkonzentriert (vgl. B.2.1.1.2). Nach dem anschließenden Eindampfen mit Hilfe des Vakuumverdampfers wurden die Proben in 150 µl EIA-Puffer aufgenommen.

Die Proben wurden mit einem EIA-Kit der Firma Cayman Chemical vermessen (vgl. B.2.1.2.2). Die Berechnung der einzelnen Werte erfolgte wie in B.2.1.2.3.

Es wurden jeweils der basale Wert an Leukotrien ohne Stimulation und der totale Wert bestimmt:

basaler Wert: Leukotriene in Zellsuspension ohne Stimulation

stimulierter Wert: Menge an Leukotrienen nach Stimulation (Stimulierte Menge + basale Menge)

Stimulierbarkeit:

$$\text{Stimulierbarkeit} = \frac{\text{stimulierterWert}}{\text{basalerWert}}$$

## **B.2.2 Klinische Untersuchung**

Bei den klinischen Versuchsreihen soll sowohl der basale, als auch der stimulierte Leukotriengehalt auf seine Abhängigkeit bezüglich atopischer Erkrankung und Jahreszeit untersucht werden. Mit Hilfe dieses Versuchs kann eine Aussage über die Stimulierbarkeit der Zellen getroffen werden.

Durch die Zugabe des Calcium-Ionophors bzw. dessen Kombination mit Arachidonsäure kann sowohl die Abhängigkeit der Stimulierbarkeit der Enzyme (Lipoxygenase und Phospholipase A<sub>2</sub>) von der Jahreszeit, als auch ein Zusammenhang mit einer vorhandenen atopischen Veranlagung näher untersucht werden.

### **B.2.2.1 Probanden**

Für die klinische Untersuchung wurden alle Probanden in zwei große Gruppen eingeteilt: Atopiker und Nicht-Atopiker (gesunde Kontrollpersonen). Die Atopiker wurden nochmals in die zwei Untergruppen Hausstaub-Atopiker und Pollen-Atopiker geteilt. Alle Probanden hatten zum Zeitpunkt der Blutentnahme keine Medikamente eingenommen (Ausnahme: hormonelle Kontrazeptiva). Personen mit akuten Infektionen oder anderen Erkrankungen (z.B. Herz-, Leber- oder Nierenerkrankungen) wurden von der Studie ausgeschlossen. Die Blutentnahme fand stets freiwillig und mit dem Einverständnis der Probanden statt.

#### Probanden (Atopiker):

11 Patienten (mittleres Alter  $29,2 \pm 4,2$  Jahre) konnten auf Grund durchgeführter Eigen- und Familienanamnese, Hauttest (Pricktest vgl. B.2.2.4) und Nachweis der spezifischen, relevanten Allergene im Plasma (RAST) eindeutig als Atopiker identifiziert werden. Diese Gruppe wurde nochmals in 6 Pollen-Atopiker und 5 Hausstaub-Atopiker unterteilt, wobei zu bemerken ist, dass diese Anzahl an Probanden an sich für signifikante Ergebnisse zu klein ist, aber doch interessante Ausblicke gewährt. Die Patienten zeigten alle die typische klinische Manifestation der allergischen Rhinokonjunktivitis in der Zeit April bis September. Patienten mit Hinweis auf andere atopische Erkrankungen (Asthma bronchiale, atopisches Ekzem) wurden von der Studie ausgeschlossen.

---

### Kontrollkollektiv (Nicht-Atopiker):

9 gesunde Probanden (mittleres Alter  $31,4 \pm 6,0$  Jahre) wurden in diese Gruppe aufgenommen. Die Kontrollpersonen zeigten in ihrer Eigen- und Familienanamnese keine Hinweise auf eine atopische Erkrankung. Der Hauttest (Pricktest vgl. B.2.2.6) gegen Aeroallergene verlief bei allen getesteten Allergenextrakten negativ.

Auch bei der RAST-Bestimmung waren alle Ergebnisse in dieser Gruppe negativ.

Die persönlichen Daten aller Probanden und deren Testergebnisse sind dem Tabellenanhang zu entnehmen (siehe Tabellenanhang).

### **B.2.2.2 Zellpräparation**

Die für die Zellpräparation notwendige Blutentnahme und die Isolation der peripheren Blutleukozyten wurden wie im methodischen Teil durchgeführt (vgl. B.2.1.3.2).

### **B.2.2.3 Aufarbeitung der Proben**

Für die Aufkonzentrierung und Reinigung der Zellsuspensionen wurden 5 ml Probe auf die Sep-Pak<sup>®</sup>-Kartuschen aufgetragen. Die Konditionierung und die weiteren Arbeitsschritte wurden wie unter B.2.1.1.2 durchgeführt. Angewendet wurde hierfür die Methode 1. Abweichend davon wurden statt 150 µl Lösungsmittel 450 µl zum Aufnehmen der Probe nach Trocknung verwendet.

### **B.2.2.4 Stimulation der Leukotrienbildung bzw. -freisetzung**

In der klinischen Studie wurde untersucht, ob ein Unterschied in der Stimulierbarkeit der PBL bzw. der Phospholipase- oder der Lipoxygenase-Stimulierbarkeit bei Atopikern und Nicht-Atopikern (Kontrollgruppe) besteht. Zur Stimulation wurde das Calcium-Ionophor und die Kombination Calcium-Ionophor plus Arachidonsäure eingesetzt.

Es wurden zwei Versuchsreihen durchgeführt: **Versuchsreihe I symptomfreier Zeitraum** „Winter“ und **Versuchsreihe II symptomatischer Zeitraum** „Sommer“. Wird bei den Versuchen von einem Versuch „Sommer“ berichtet, so sind diese Messungen immer in der

symptomreichen Zeit einer Rhinokonjunktivitis durchgeführt worden. Die „Winter“-Versuche wurden jeweils in der symptomarmen Zeit vermessen.

### **Stimulation mit Calcium-Ionophor (A23187)**

Für die Stimationsversuche mit dem Calcium-Ionophor wurden 2,5 ml Zellsuspension mit einer eingestellten Zellzahl von  $3 \times 10^6$  Zellen/ml verwendet, als Verdünnungsmedium diente der Hank's Puffer (vgl. B.1.2.2). Die Zellsuspension wurde mit 1,2  $\mu$ M A23187 versetzt und fünf bzw. 20 Minuten bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 750  $\mu$ l kaltem Methanol gestoppt und bis zur quantitativen Bestimmung bei -80°C eingefroren. Je Versuchsreihe wurde stets eine Blindprobe ohne Zugabe von Stimationsreagenz mit bearbeitet.

### **Stimulation mit Calcium-Ionophor (A23187) und Arachidonsäure**

Für die Stimationsversuche unter Kombination von Calcium-Ionophor und Arachidonsäure wurden 2,5 ml Zellsuspension mit einer eingestellten Zellzahl von  $3 \times 10^6$  Zellen/ml verwendet, als Verdünnungsmedium diente der Hank's Puffer (vgl. B.1.2.2). Die Zellsuspension wurde mit 1,2  $\mu$ M A23187 und 2,0  $\mu$ M Arachidonsäure versetzt und 5 bzw. 20 Minuten bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 750  $\mu$ l kaltem Methanol gestoppt und bis zur quantitativen Bestimmung bei -80°C eingefroren. Je Versuchsreihe wurde stets eine Blindprobe ohne Zugabe von Stimationsreagenz mit bestimmt.

## **B.2.2.5 Quantitative Bestimmung der Leukotriene**

Die eingefrorenen Zellsuspensionen wurden jeweils bei Raumtemperatur aufgetaut und mittels Sep-Pak<sup>®</sup>-Kartuschen gereinigt bzw. aufkonzentriert (vgl. B.2.1.1.2). Nach dem anschließenden Eindampfen mit Hilfe des Vakuumverdampfers wurden die Proben in 150  $\mu$ l EIA-Puffer aufgenommen.

Die Proben wurden mit dem EIA-Kit der Firma Cayman Chemical vermessen (vgl. B.2.1.2.2). Die Berechnung der einzelnen Werte erfolgte wie in B.2.1.2.3 beschrieben.

Es wurden jeweils der basale Wert an Leukotrien ohne Stimulation und der totale Wert bestimmt:

|                    |   |
|--------------------|---|
| basale Wert:       | Leukotriene in Zellsuspension ohne Stimulation                            |
| stimulierter Wert: | Menge an Leukotrienen nach Stimulation (Stimulierte Menge + basale Menge) |

*Stimulierbarkeit:*

$$\text{Stimulierbarkeit} = \frac{\text{stimulierterWert}}{\text{basalerWert}}$$

### **B.2.2.6 Allergiediagnostik**

Die folgenden Untersuchungen wurden zur Einteilung der Probanden in die beiden Gruppen „gesunde Kontrollpersonen“ oder „Probanden mit Hinweis auf Atopie“ durchgeführt.

- Anamnese:

Zunächst wurde eine ausführliche Eigen- und Familienanamnese erhoben. Dabei wurde jede Form von allergischer Veranlagung sowie akute Erkrankungen dokumentiert.

- Pricktest:

Es wurden verschiedene Allergen-Extrakte der Gruppe Aeroallergene getestet. Zu der Gruppe der Aeroallergene gehören Pollen (Gräser, Bäume, Kräuter, Roggen, Mais), Schimmelpilze (*Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Penicillium*) und Inhalationsantigene (Hausstaubmilben (*D. pter.* und *D. farinae*), Hundehaare, bzw. -schuppen), Katzenhaare, bzw. -schuppen, Schafwolle (unbearbeitet), Pferdehaare, bzw. -schuppen) und Wellensittichfedern). Diese sind geeignet, um eine atopische Veranlagung zu bestimmen. Außerdem wurden eine negative (Kochsalzlösung) und eine positive Kontrolle (Histaminlösung) durchgeführt.

Je ein Tropfen der Lösungen wurde auf die Haut aufgetragen und anschließend die benetzte Stelle mit einer Lanzette leicht angeritzt. 20 Minuten nach dem Auftragen der Lösung wurde die Stärke der Testreaktion nach dem Durchmesser von Quaddel und Erythem beurteilt und nach einer Skala von Ø bis ++++ angegeben (Ring 1995).

Die Bestimmungen wurden vom allergologischen Labor der Klinik und Poliklinik für Dermatologie der Universität Regensburg durchgeführt.

- RAST: (Phasebas Rast, Pharmacia)

An ein Papierscheibchen wird ein Allergen gebunden. Die in der Probe enthaltenen spezifischen Antikörper binden sich daran und werden durch ein radioaktiv markiertes Anti-IgE detektiert. Die Konzentration dieser Antikörper wird semiquantitativ in den Klassen 0 bis 6 angegeben.

Klasse 0 < 0,35 kU/I (negativ)

Klasse 1 < 0,70 kU/I (gering positiv)



---

|          |                |  |
|----------|----------------|--|
| Klasse 2 | < 3,5          | kU/I (positiv in steigender Konzentration) |
| Klasse 3 | < 17,5         | kU/I (positiv in steigender Konzentration) |
| Klasse 4 | < 50,0         | kU/I (positiv in steigender Konzentration) |
| Klasse 5 | = 50,0 - 100,0 | kU/I (positiv in steigender Konzentration) |
| Klasse 6 | > 100,0        | kU/I (positiv in steigender Konzentration) |

Es können auch Mischungen untersucht werden, die dann nur in positiv und negativ unterteilt werden. In dieser Arbeit wurde die Reaktionen auf das Gemisch sx1 durchgeführt, dabei wurden folgende Allergene untersucht: Lieschgras, Roggen, Birke, Beifuß, Dermatophagoides pteron, Katzenschuppen und Cladosporium herbarum.

Die Bestimmung wurde vom allergologischen Labor der Dermatologischen Klinik und Poliklinik der Universität Regensburg durchgeführt.

### B.2.3 Statistik

Alle Messergebnisse werden als arithmetischer Mittelwert  $\pm$  Standardfehler (SE) angegeben. Bei einem Vergleich von zwei Mittelwerten wurde der Student's t-test für ungepaarte Werte durchgeführt. Ein Unterschied wurde als „signifikant“ bezeichnet, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit kleiner 0,05 war ( $p < 0,05$ ). Die statistischen Methoden wurden aus dem „Lehrbuch für Statistik“ entnommen (Sachs 1984).

Berechnung des arithmetischen Mittels  $\bar{x}$ :

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}$$

Berechnung des Standardfehlers SE:

$$SE_{\bar{x}} = \frac{s}{\sqrt{n}}$$

s: Standardabweichung

n: Anzahl

---

## **C Ergebnisse**

### **C.1 Ergebnisse der methodischen Untersuchungen**

#### **C.1.1 Etablieren der HPLC-Methode**

Die erste Aufgabe der praktischen Tätigkeit war es, die Methodik der Leukotrienmessung an der HPLC zu entwickeln. Dabei tauchten verschiedene Fragen und Probleme auf, die vor Beginn der klinischen Versuchsreihen gelöst werden mussten.

##### **C.1.1.1 Methodenentwicklung**

Für diese Untersuchung wurde zunächst nur das LTE<sub>4</sub> als Reinsubstanz bestimmt und dann das Gemisch der Leukotriene LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub> und LTE<sub>4</sub>. Kam es bei der Vermessung von LTE<sub>4</sub> zu keinem befriedigenden Ergebnis, wurde auf eine Vermessung des Leukotrien-Gemisches verzichtet.

##### **Methode I:**

Hier wurde die Trennleistung von Fließmittel II (Tetrahydrofuran/Aqua tridest./Acetonitril) und HPLC-Programm I (LTE FM II) untersucht.

Die Retentionszeit von LTE<sub>4</sub> lag bei  $19,2 \pm 0,6$  Minuten ( $n = 4$ ).

Wie in Abbildung 4 gezeigt, trat bei der Vermessung ein nicht zu akzeptierendes, großes Tailing auf. Da ein zu großes Tailing keine genaue quantitative Auswertung ermöglicht und keine späteren analytischen Messungen zulässt, wurden keine weiteren Versuche mit Methode I durchgeführt.

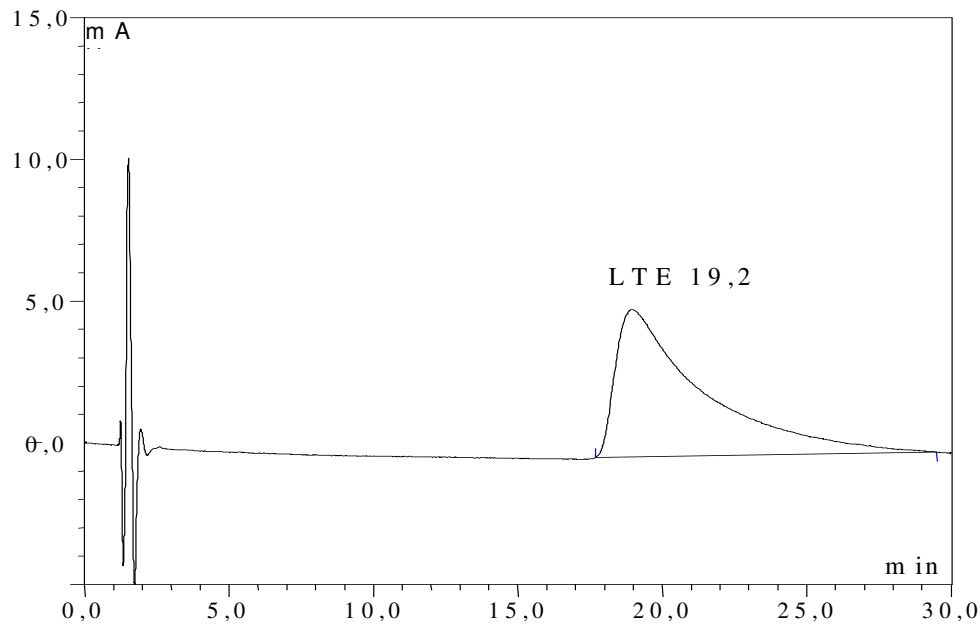


Abb.4: HPLC-Chromatogramm von LTE<sub>4</sub> (20 µg/ml) in FM II, Injektionsvolumen 10,0 µl (Säule: ODS-Hypersil C<sub>18</sub> 5µm 125 x 4,6 mm, Fließmittel: Tetrahydrofuran 0,1 %, Aqua bidest 40,0 %, Acetonitril 59,9 %, Tetrabutylammoniumphosphat 0,005 M; Flussrate: 1,0 ml/min; UV-Detektion bei 285 nm)

### **Methode II:**

Nachdem das Fließmittel II kein zufriedenstellendes Ergebnis zeigte wurde auf ein Fließmittel mit Tetrahydrofuran in den weiteren Versuchen verzichtet und die Untersuchung mit dem Fließmittel III (Eisessig/Acetonitril/Aqua tridest) und dem HPLC Programm II (Multi Step FM III) durchgeführt.

Aus der Messung des Leukotriens E<sub>4</sub> resultierte die Retentionszeit von  $3,9 \pm 0,05$  min (n = 9). Bei der Vermessung des Leukotrien-Gemisches kam es lediglich, wie in Abbildung 6 gezeigt, zu einer Auftrennung in zwei Peaks, nämlich Peak LT 1 mit der Retentionszeit  $2,7 \pm 0,01$  min und Peak LT 2 mit der Retentionszeit  $3,2 \pm 0,01$  min (n = 9). Eine genaue Zuordnung der drei Cysteinyl-Leukotriene war hier nicht möglich.

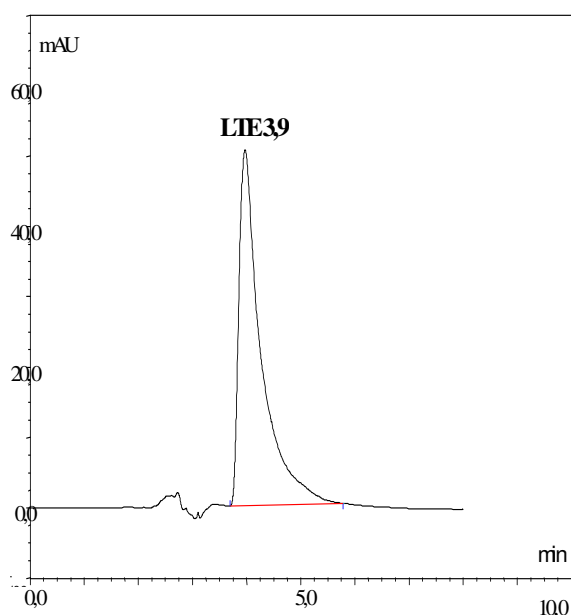


Abb.5:

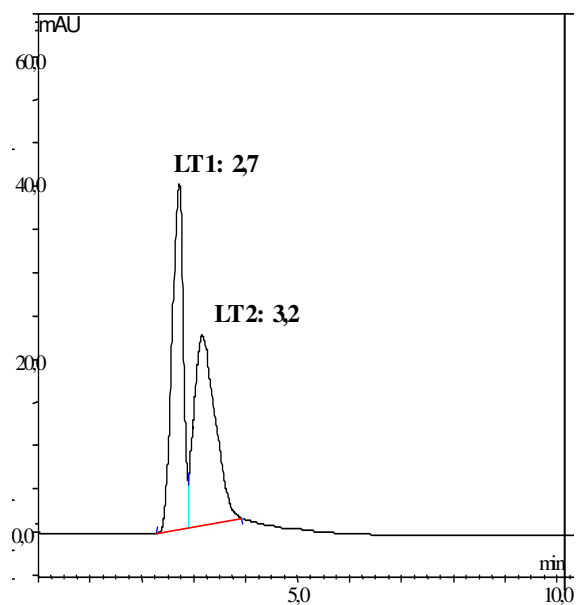


Abb.6:

Abb.5: HPLC-Chromatogramm von  $\text{LTE}_4$  (27,5  $\mu\text{g/ml}$ ) mit FM III, Injektionsvolumen 10  $\mu\text{l}$

Abb.6: HPLC-Chromatogramm von LT-Gemisch ( $\text{LTC}_4 = 17,5 \mu\text{g/ml}$ ;  $\text{LTD}_4 = 18,0 \mu\text{g/ml}$ ;  $\text{LTE}_4 = 18,5 \mu\text{g/ml}$ ), Injektionsvolumen 10  $\mu\text{l}$

(Säule: ODS-Hypersil  $\text{C}_{18}$  5  $\mu\text{m}$  125 x 4,6 mm, Fließmittel: Eisessig 1,0 %, Acetonitril 33,0 %, aqua tridest. 66,0 %; pH = 5,6; Flussrate:  $t_{0-5\text{min}} = 5,0 \text{ ml/min}$ ,  $t_{5-10\text{min}} = 1,0 \text{ ml/min}$ , UV-Detektion bei 285 nm)

### Methode III

Um die Trennung weiter zu verbessern wurde in den folgenden Versuchen eine Säule mit 3  $\mu\text{m}$  Teilchengröße und einer Länge von 250 cm sowie einem Durchmesser von 4,6 mm verwendet.

Untersucht wurden die Trennleistung von Fließmittel I (MeOH/ Lösung 1: EDTA, Eisessig, Aqua tridest) und Variationen des HPLC- Programms III (LT FM I).

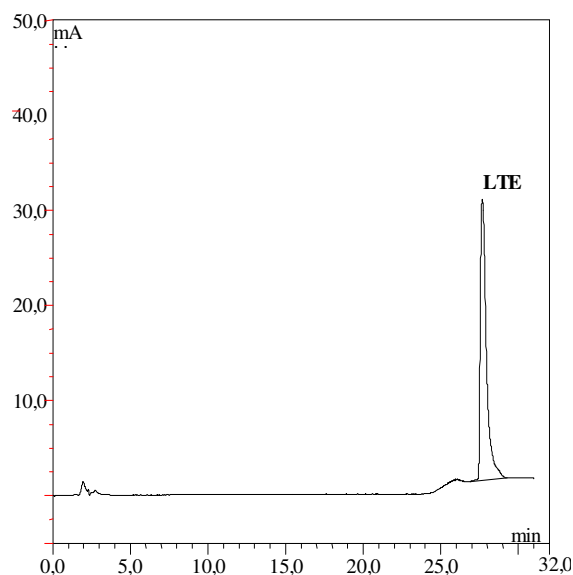


Abb.7:

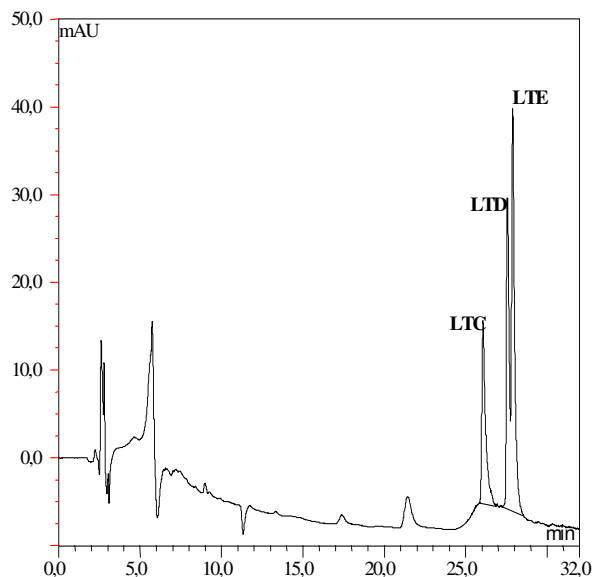


Abb.8:

Abb.7: HPLC-Chromatogramm von  $\text{LTE}_4$  (27,5  $\mu\text{g/ml}$ ) mit FM I, Injektionsvolumen 5  $\mu\text{l}$

Abb.8: HPLC-Chromatogramm von LT-Gemisch ( $\text{LTC}_4 = 17,5 \mu\text{g/ml}$ ;  $\text{LTD}_4 = 18,0 \mu\text{g/ml}$ ;  $\text{LTE}_4 = 18,5 \mu\text{g/ml}$ ), Injektionsvolumen 10  $\mu\text{l}$

(Säule: ODS-Hypersil  $\text{C}_{18}$  3  $\mu\text{m}$  250 x 4,6 mm, Flussrate: 0,6 ml/min, Fließmittel: MeOH/ EDTA 0,05 %, Eisessig 2,50 %, aqua tridest. 97,45 % Mischungsverhältnis vgl. B.2.1.1.1, UV-Detektion bei 285 nm)

Bei der Messung des Leukotriens  $\text{E}_4$  lag die durchschnittliche Retentionszeit bei  $27,8 \pm 0,10 \text{ min}$  ( $n = 6$ ).

Die Messung des Leukotrien-Gemisches zeigte eine Auftrennung in drei Peaks:

- Peak  $\text{LTC}_4$  mit einer Retentionszeit  $25,0 \pm 1,44 \text{ min}$
- Peak  $\text{LTD}_4$  mit einer Retentionszeit  $27,6 \pm 0,01 \text{ min}$
- Peak  $\text{LTE}_4$  mit einer Retentionszeit  $27,8 \pm 0,13 \text{ min}$

Unter diesen Bedingungen wurde jedoch keine Basislinientrennung von  $\text{LTD}_4$  und  $\text{LTE}_4$  erreicht.

Um die Trennung der Leukotriene  $\text{LTD}_4$  und  $\text{LTE}_4$  zu verbessern, wurden auf der Grundlage der Methode III Veränderungen im Programm vorgenommen.

### Variationen der Methode III:

Hier lag das Interesse auf der Basislinientrennung zwischen den beiden Leukotrienen LTD<sub>4</sub> und LTE<sub>4</sub>, weshalb anschließend nur ein Gemisch aus LTD<sub>4</sub> und LTE<sub>4</sub> vermessen wurde.

#### • Programm III.1

Dem Gradienten wurde ein zusätzliches Mischungsverhältnis hinzugefügt, wodurch ein Vier-Stufen Gradient 60-65-70-85 (Progr.III.1 vgl. B.2.1.1.4) mit einer Messdauer von 50 Minuten entstand.

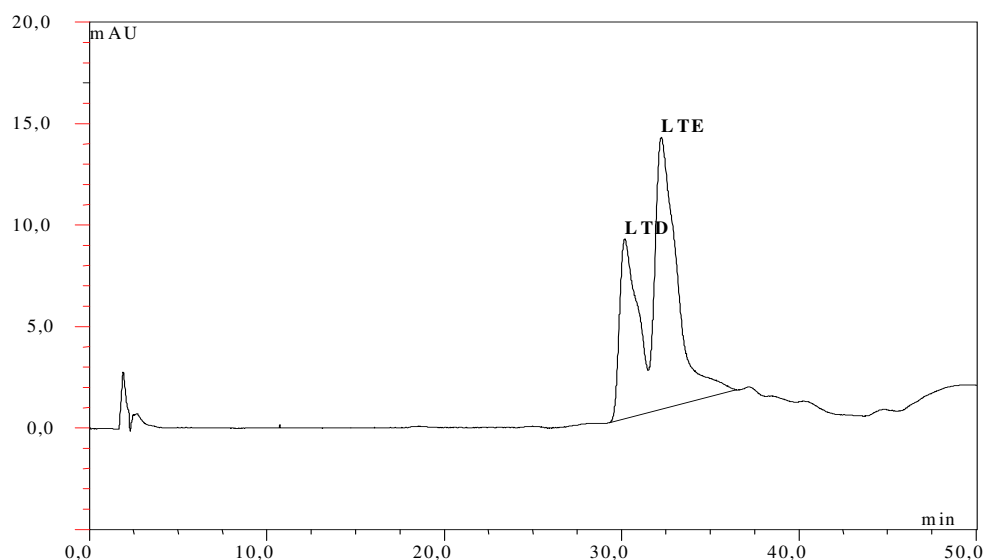


Abb.9: HPLC-Chromatogramm von LTD<sub>4</sub> (26,0 µg/ml) und LTE<sub>4</sub> (27,5 µg/ml), Injektionsvolumen 20 µl (Säule: ODS-Hypersil C<sub>18</sub> 3 µm 250 x 4,6 mm, Flussrate 0,6 ml/min, Fließmittel: MeOH/EDTA 0,05 %, Eisessig 2,50 %, aqua tridest. 97,45 % Mischungsverhältnis, UV-Detektion bei 285 nm)

Bei der Vermessung des Leukotrien Gemisches LTD<sub>4</sub> und LTE<sub>4</sub> ergab sich eine Auftrennung in zwei Peaks (n = 2):

Peak LTD<sub>4</sub> mit einer Retentionszeit von  $31,5 \pm 1,89$  min.

Peak LTE<sub>4</sub> mit einer Retentionszeit von  $33,7 \pm 1,98$  min

Auch hier wurde jedoch keine Basislinientrennung der Peaks erreicht.

### • Programm III.2

Im Vergleich zu Programm III.1 wurde versucht durch die Änderung des Gradienten eine Basislinientrennung zu erreichen. Zu diesem Zweck wurde das LT-Gemisch mit dem HPLC-Programm III.2 (vgl. B.2.1.1.4) vermessen, bestehend aus einer Drei-Gradienten-Mischung.

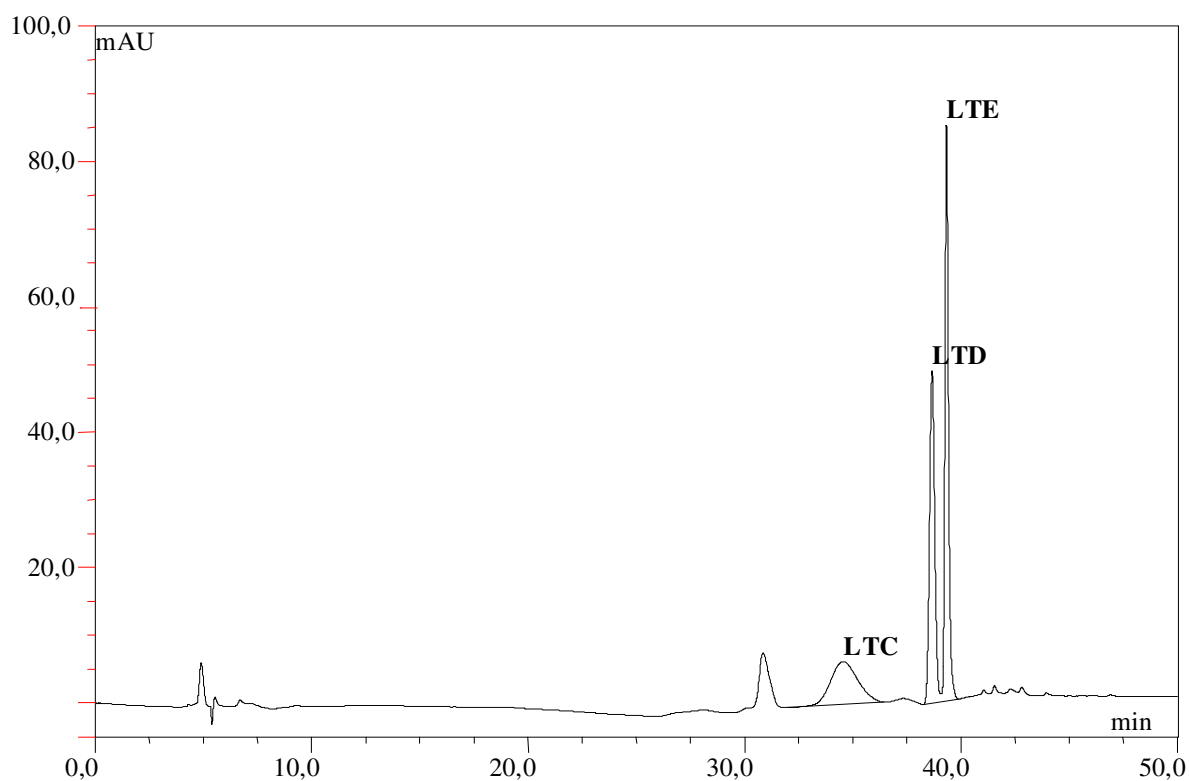


Abb.10: HPLC-Chromatogramm von LT-Gemisch ( $\text{LTC}_4 = 17,5 \mu\text{g/ml}$ ,  $\text{LTD}_4 = 18,0 \mu\text{g/ml}$ ;  $\text{LTE}_4 = 18,5 \mu\text{g/ml}$ ), Injektionsvolumen  $20 \mu\text{l}$  (Säule: ODS-Hypersil  $\text{C}_{18}$   $3 \mu\text{m}$   $250 \times 4,6 \text{ mm}$ , Flussrate  $0,6 \text{ ml/min}$ , Fließmittel: MeOH/EDTA  $0,05 \%$ , Eisessig  $2,50 \%$ , aqua tridest.  $97,45 \%$  Mischungsverhältnis, UV-Detektion bei  $285 \text{ nm}$ )

Bei der Vermessung des Leukotrien-Gemisches ergab sich eine Auftrennung in drei Peaks:

Peak  $\text{LTC}_4$  mit einer Retentionszeit von  $34,8 \pm 1,32 \text{ min}$ .

Peak  $\text{LTD}_4$  mit einer Retentionszeit von  $37,3 \pm 1,80 \text{ min}$ .

Peak  $\text{LTE}_4$  mit einer Retentionszeit von  $39,5 \pm 2,06 \text{ min}$

Der Peak bei  $30,5 \text{ min}$  hatte kein spezifisches UV-Spektrum, weshalb in diesem Fall von einer Verunreinigung ausgegangen wurde.

Da die Methode III/Programm III.2 die besten Ergebnisse erzielte, verwendeten wir diese für alle folgenden Untersuchungen.

### C.1.1.2 Validierung der Methode

Bei der Validierung der Methode wurden die allgemeinen Empfehlungen zur Validierung analytischer Verfahren insofern berücksichtigt, als sie für flüssig-chromatographische Methoden von Belang sind.

Sämtliche Versuche wurden mit Schwerpunkt auf LTC<sub>4</sub> durchgeführt, um später einen direkten Vergleich zu dem EIA-Kit der Firma Cayman Chemical und dem ELISA-Kit der Firma Neogen ziehen zu können. Diese verwenden jeweils als Standard-Lösung eine LTC<sub>4</sub>-Verdünnung.

#### C.1.1.2.1 Präzision

Zuerst sollten als Maß der Streuung die Standardabweichungen ermittelt werden. Die Reproduzierbarkeit wurde als Intra-Assay-Standardabweichung (Standardabweichung innerhalb einer Messreihe) bestimmt. Die Reproduzierbarkeit der Retentionszeit als Intra-Assay-Standardabweichung ergab einen Wert von  $32,8 \pm 0,21$  min ( $n = 10$ ) für das Leukotrien C<sub>4</sub> (Injektionsvolumen 5  $\mu$ l, LTC<sub>4</sub> = 28,5  $\mu$ g/ml). Das entspricht einer relativen Standardabweichung von 2,04 % vom Mittelwert der Retentionszeit.

Als Inter-Assay-Standardabweichung ergab sich eine relative Standardabweichung von 4,14 % vom Mittelwert für LTC<sub>4</sub> bei einer Retentionszeit von  $31,9 \pm 0,76$  min. Die Werte wurden aus den einzelnen Mittelwerten errechnet. Mittels F-Test wurde auf Varianzhomogenität geprüft und mit dem Student's t-test überprüft, ob die Standardabweichungen aus den unterschiedlichen Messwertreihen vergleichbar waren.

| Messung I [min] | Messung II [min] | Messung III [min] |
|-----------------|------------------|-------------------|
| $32,2 \pm 0,19$ | $30,4 \pm 0,08$  | $33,0 \pm 0,39$   |

Tab. 4: Mittelwerte der Retentionszeiten von den Messungen I-III ( $n = 10$ ,  $\bar{x} \pm SE$ ; Injektionsvolumen 5  $\mu$ l; LTC<sub>4</sub> = 28,5  $\mu$ g/ml)



Die Inter-Assay-Standardabweichung der Retentionszeiten war erwartungsgemäß höher als die Intra-Assay-Standardabweichung. Die Retentionszeiten reagierten empfindlich gegenüber Veränderungen innerhalb der Methode. Daraus resultierend musste auf eine sorgfältige Einhaltung der Methodenangaben geachtet werden, um reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten.

### C.1.1.2.2 Linearität

Um den Zusammenhang zwischen Messwerten und verschiedenen Konzentrationen zu ermitteln, wurde eine lineare Regression durchgeführt.

Die Voraussetzungen für die lineare Regression (Varianzhomogenität und die Normalverteilung der Proben) waren erfüllt.

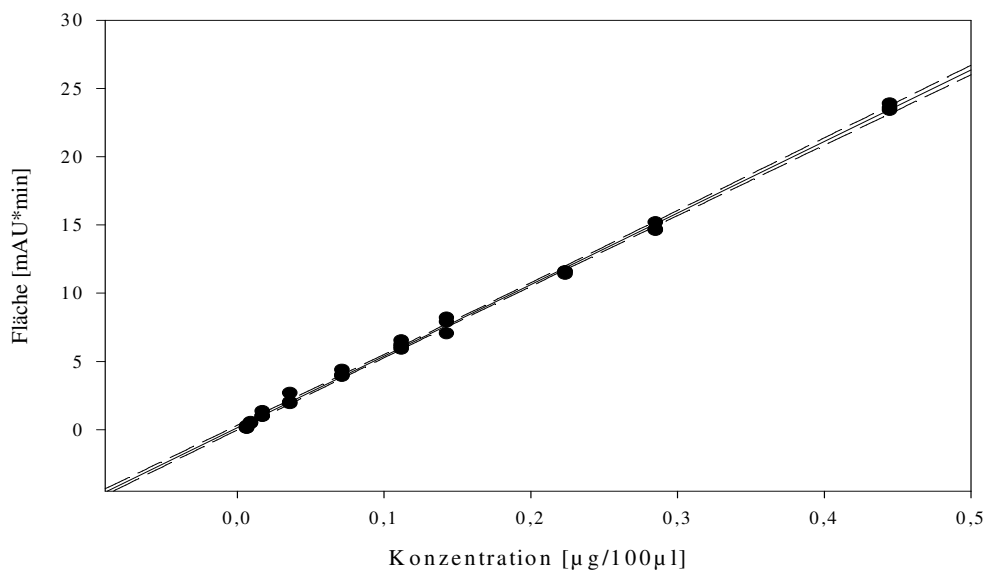


Abb.11: Graph zur linearen Regression mit Vertrauensbereich

Aus den Einzelwerten wurde eine lineare Kalibrierfunktion  $y = 52,4 x + 0,15$  errechnet, die das mathematische Modell des Zusammenhangs zwischen Messwert und Konzentration aufzeigen sollte. Der Korrelationskoeffizient betrug  $r = 0,998$ . Dies lässt mit hoher Wahrscheinlichkeit auf das Vorhandensein einer Linearität schließen. Zur weiteren Überprüfung wurden die dazu gehörigen Residuenabweichungen gebildet.

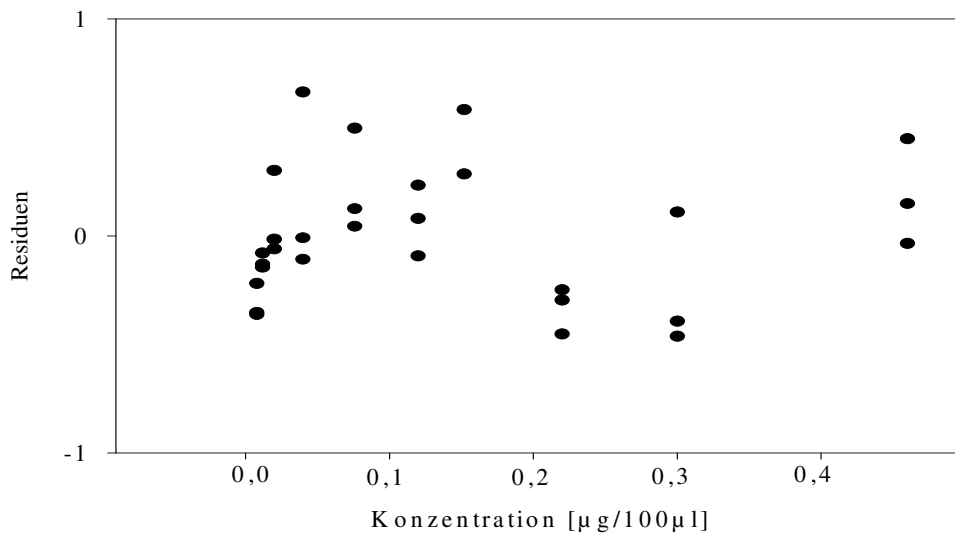


Abb.12: Residuenplot der geordneten Einzelwerte gegen die Konzentration

Mit Hilfe des Residuenplots ist es nicht möglich eine eindeutige Aussage in Bezug auf die Linearität zu treffen. Daher fand eine Überprüfung mit Hilfe der Varianzanalyse statt.

Mit den Kalibrierdaten wurde nun eine Varianzanalyse durchgeführt, um über den F-Test mit der Summe der quadrierten Abweichung der Einzelwerte vom jeweiligen Mittelwert und der Summe der quadrierten Abweichung der Mittelwerte von den ausgeglichenen Werten eine Aussage zur Linearität zu erhalten. Hierbei zeigte sich die Prüfgröße kleiner als die Schranke des F-Tests. Somit konnte Linearität angenommen werden (Sachs 1984). Die Nullhypothese  $H_0$  (Varianzen sind nicht unterscheidbar) war ebenfalls anzunehmen.

### C.1.1.2.3 Richtigkeit

Für diese Überprüfung wurde eine Sigma-Standardlösung mit bekannter Konzentration hergestellt und via HPLC vermessen. Das gleiche Verfahren wendeten wir für den EIA-Kit-Standard an. Da der EIA-Kit-Standard sehr geringe Substanzmengen enthielt und im Bereich der Nachweisgrenze der HPLC lag, war eine exakte quantitative Aussage schwer möglich (eine größere Menge an EIA-Kit-Standard wäre von Vorteil gewesen, war aber in unserem Fall leider nicht vorhanden). Für die qualitative Aussage wurde eine Kit-Standard Lösung mit dem Sigma-Standard gespikt. Um die Richtigkeit zu überprüfen wurden die jeweiligen Retentionszeiten verglichen.

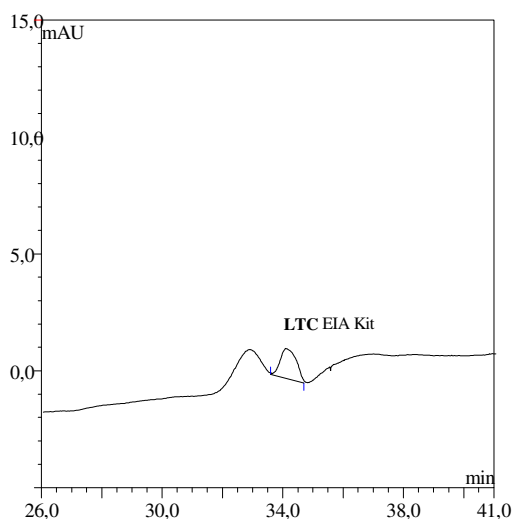
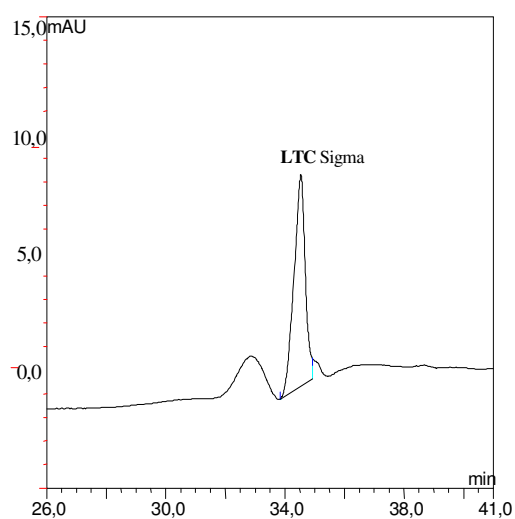


Abb.13: Sigma-Standardlösung (0,6µg/ml)

Abb.14: EIA-Kit-Standardlösung (0,03 µg/ml)

jeweils vermessen mit HPLC Programm III.2 (vgl. C.1.1.1)

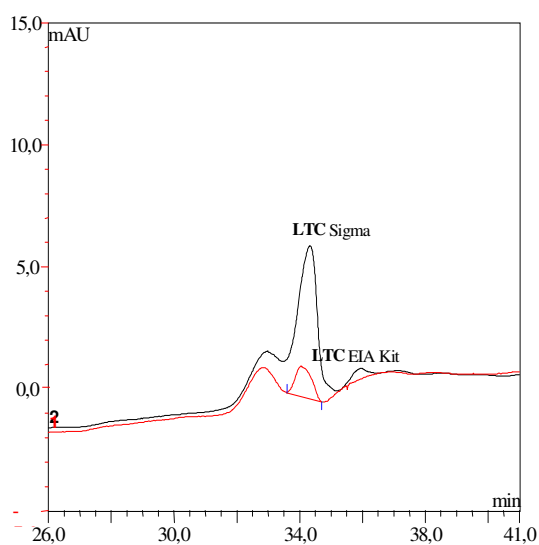
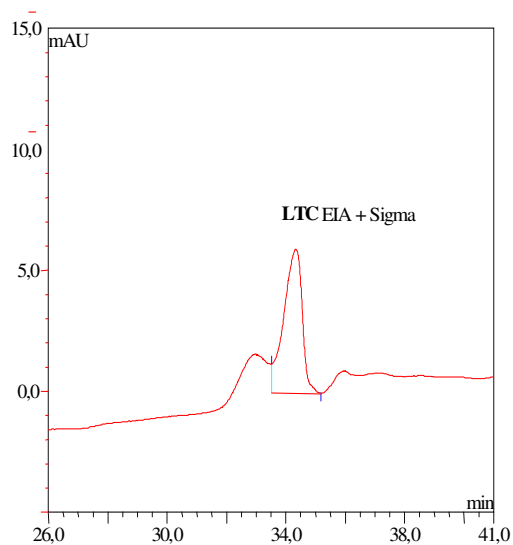


Abb.15: EIA- (0,03 µg/ml) und Sigma- (0,6µg/ml) Standardlösung;  
 Abb.16: Übereinstimmung der Retentionszeiten der Standardlösungen;  
 jeweils vermessen mit HPLC-Programm III.2 (vgl. C.1.1.1)

|                             | Retentionszeit<br>[min] | Fläche<br>[mAU*min] | Eingespritzte Menge<br>[µg/ml] |
|-----------------------------|-------------------------|---------------------|--------------------------------|
| Sigma-Standardlösung        | 34,50 ± 0,21            | 3,61 ± 0,24         | 0,60                           |
| EIA-Standardlösung          | 34,43 ± 0,09            | 0,75 ± 0,11         | 0,03                           |
| Sigma- + EIA-Standardlösung |                         |                     |                                |
| Gemessen                    | 34,47 ± 0,17            | 4,31 ± 0,27         | 0,63                           |
| Soll                        |                         | 4,36 ± 0,35         |                                |

Tab. 5: Vergleich der Sigma- und der EIA- Standardlösungen (n = 5)

Bedingt durch materielle Engpässe wurde notgedrungen ein Vielfaches an Sigma-Standard im Vergleich mit den EIA-Standards eingespritzt. Durch das Spiken der Sigma-Standardverdünnung mit der EIA-Lösung konnte gezeigt werden, dass die Peaks identische Retentionszeiten aufwiesen. Die Gesamtfläche wich um nur 0,05 mAU\*min von dem errechneten Soll-Wert ab. Nach Überprüfung mit Hilfe des t-Tests bestätigten sich die Ergebnisse als richtig (n =5; Wahrscheinlichkeit 95%).

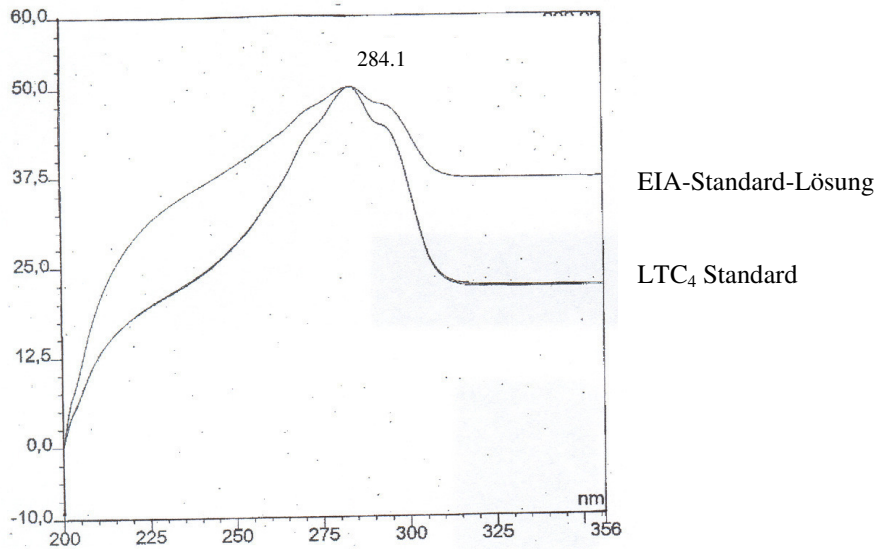


Abb.17: UV-Absorptionsspektrum Vergleich: LTC<sub>4</sub> und Spike-Lösung (EIA-Standardlösung)

Auch über den Vergleich der UV-Spektren war eine Identifizierung möglich und die Richtigkeit der HPLC-Methode mit diesem Ergebnis wurde bestätigt. Das UV-Spektrum der EIA-Standardlösung wird auf Grund geringerer Probenmenge insgesamt flacher.

#### C.1.1.2.4 Robustheit

Im Bezug auf eine quantitative Bestimmung wurde die Peakfläche und im Hinblick auf den qualitativen Nachweis die Retentionszeit untersucht.

#### Änderung des Wellenlängenmaximums $\lambda_{\max}$

Es wurden Messungen bei den Wellenlängen  $\lambda_{\max} = 283 \text{ nm}$  und  $\lambda_{\max} = 285 \text{ nm}$  vorgenommen und die Ergebnisse verglichen.

Weder bei der Retentionszeit noch bei der Fläche kam es durch die Veränderung der Wellenlänge zu einem signifikanten Unterschied zwischen den einzelnen Messwerten. Eine Aus-

nahme bildete das LTC<sub>4</sub>; hier zeigte sich eine signifikante Erhöhung der Retentionszeit ( $36,3 \pm 0,14$  vs  $34,9 \pm 0,22$  min;  $p < 0,05$ ).

Die Wahrscheinlichkeit wurde auf die Wellenlänge  $\lambda_{\max} = 285$  nm berechnet. Der Fluss betrug bei dieser Messung 0,5 ml/min.

Aus den Messungen ergab sich der Schluss, dass geringfügige Schwankungen einzelner UV-Lampen des HPLC-Detektors keine Auswirkungen auf die quantitative Auswertung haben.

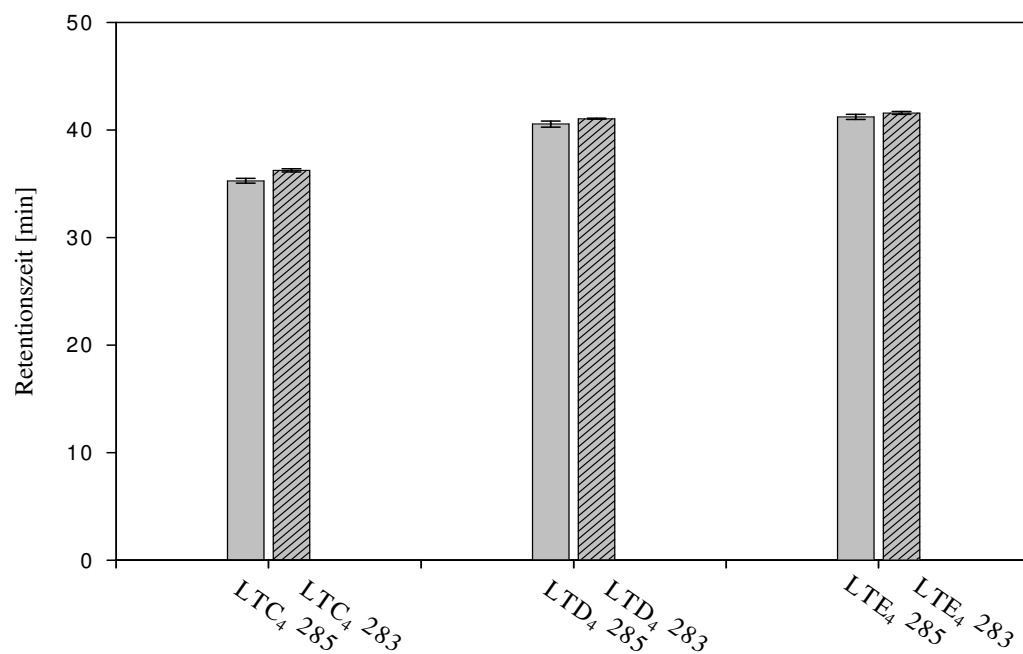


Abb.18: Retentionszeit der Cysteinyl-Leukotriene bei den Wellenlänge 285 nm und 283 nm

( $n = 3$ ;  $\bar{x} \pm SE$ ). Einspritzvolumen je Leukotrien 30  $\mu$ l; Programm III.2 (Vgl. C.1.1.1)

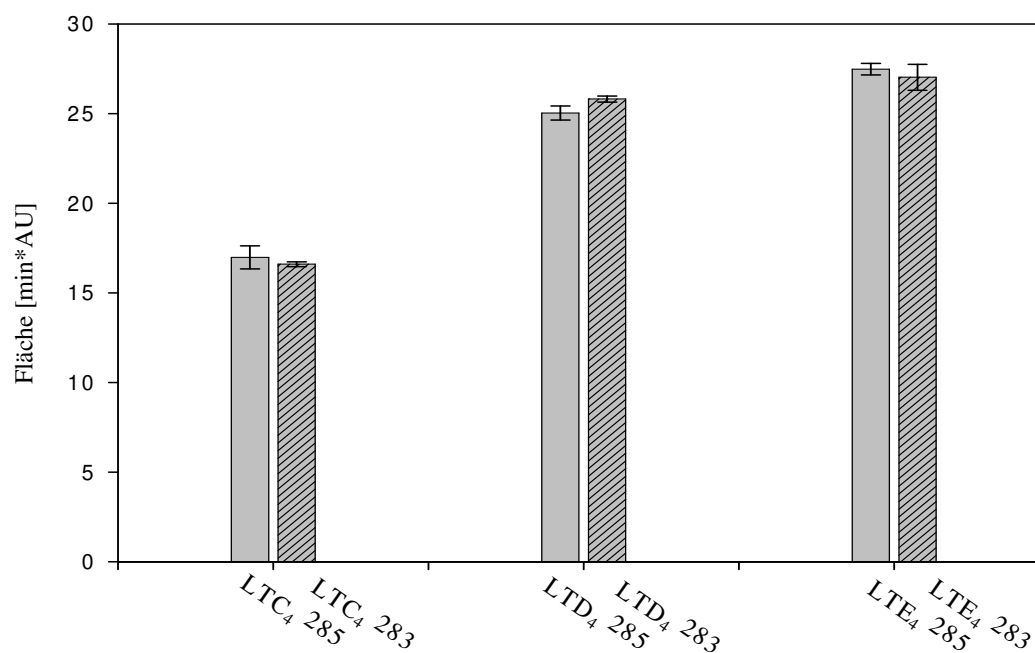


Abb.19: Fläche der Cysteinyl-Leukotriene bei den Wellenlänge 285 nm und 283 nm ( $n = 3$ ;  $\bar{x} \pm SE$ )  
Einspritzvolumen je Leukotrien 30  $\mu$ l; Programm III.2 (Vgl. C.1.1.1)

### Änderung der Flussrate

Die Auswirkung auf die Parameter Retentionszeit und Fläche wurde nach Reduktion des Flusses von 0,6 ml/min auf 0,5 ml/min untersucht.

Wie zu erwarten änderten sich die Retentionszeiten signifikant bei den einzelnen Leukotrienen. Die Änderung der Fläche von LTD<sub>4</sub> und LTE<sub>4</sub> wurde so nicht erwartet. Daraus lässt sich ableiten, dass der Fluss während einer Studienmessung genau eingehalten werden sollte.

Bei allen Leukotrienen zeigte sich eine signifikante Erhöhung der Retentionszeit:

- LTC<sub>4</sub>:  $31,8 \pm 0,31$  vs  $35,3 \pm 0,22$  min,  $p < 0,01$ ;
- LTD<sub>4</sub>:  $37,9 \pm 0,41$  vs  $40,5 \pm 0,26$  min,  $p < 0,05$ ;
- LTE<sub>4</sub>:  $38,8 \pm 0,26$  vs  $41,2 \pm 0,24$  min,  $p < 0,01$ .

Bei den Flächen kam es bei LTD<sub>4</sub> ( $19,5 \pm 0,69$  vs  $25,0 \pm 0,39$  mAU\*min;  $p < 0,05$ ) und bei LTE<sub>4</sub> ( $21,6 \pm 0,45$  vs  $27,5 \pm 0,30$  mAU\*min,  $p < 0,01$ ) zu einer signifikanten Erniedrigung. Die Fläche des LTC<sub>4</sub> veränderte sich nicht signifikant ( $17,0 \pm 0,15$  vs  $16,9 \pm 0,64$  mAU\*min, n.s.). Die Wahrscheinlichkeit wurde auf den Fluss von 0,5 ml/min berechnet.

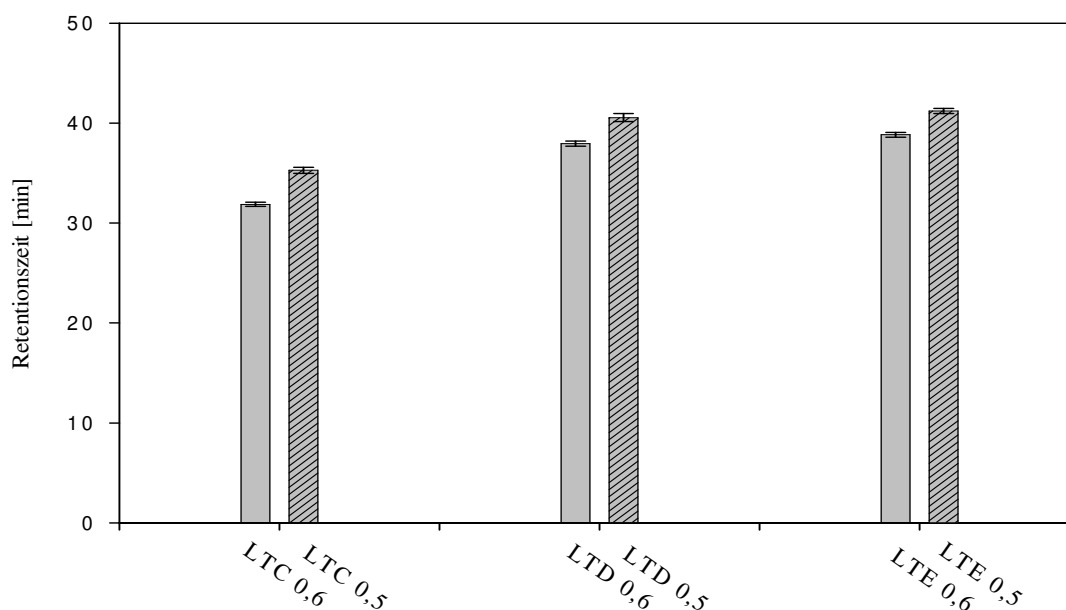


Abb.20: Retentionszeit der Cysteinyl-Leukotriene bei einer Flussveränderung von Fluss 0,6 ml/min auf 0,5 ml/min ( $n = 3$ ;  $\bar{x} \pm SE$ ), Einspritzvolumen je Leukotrien 30  $\mu$ l; Programm III.2 (Vgl. C.1.1.1)



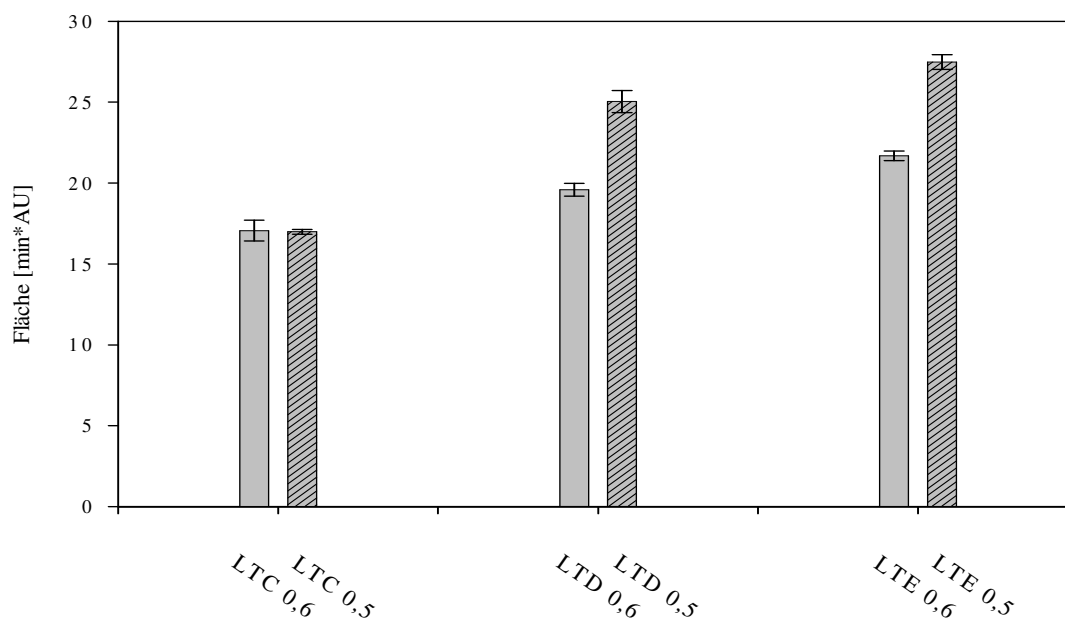


Abb.21: Fläche der Cysteinyl-Leukotriene bei einer Flussveränderung von Fluss 0,6 ml/min auf 0,5 ml/min ( $n = 3$ ,  $\bar{x} \pm SE$ ), Einspritzvolumen je Leukotrien 30  $\mu$ l; Programm III.2 (Vgl. C.1.1.1)

### Änderung des pH-Wertes des Fließmittels

Auf Grund der chemischen Struktur der Cysteinyl-Leukotriene kann eine Abhängigkeit vom pH-Wert erwartet werden, insbesondere in Bezug auf die Retentionszeit.

Wie erwartet unterschieden sich die Retentionszeiten der einzelnen Leukotriene durch die Änderung des Fließmittel-pH-Wertes bei pH = 3,4 und pH = 5,0 jeweils signifikant von jenen, die bei pH = 4,5 erhalten wurden. Eine nicht vorhersehbare Ausnahme war die Retentionszeit von LTC<sub>4</sub> bei einem pH-Wert von 5,0 ( $29,4 \pm 0,64$  vs  $32,2 \pm 0,05$  min; n.s.). Damit zeigten die Retentionszeiten bis auf eine Ausnahme eine deutliche Abhängigkeit vom pH-Wert.

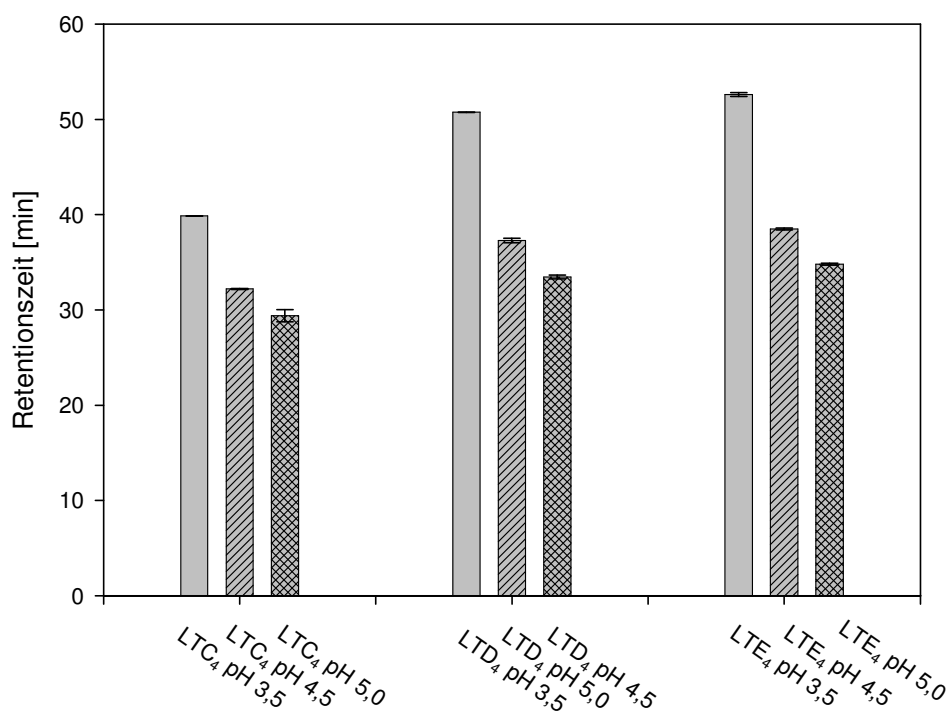


Abb.22: Einfluss des pH-Wertes des Fließmittels auf die Retentionszeiten der Cys-Leukotriene (n = 5;  $\bar{x} \pm SE$ ) Einspritzvolumen je Leukotrien 10  $\mu$ l; Programm III.2 (Vgl. C.1.1.1)

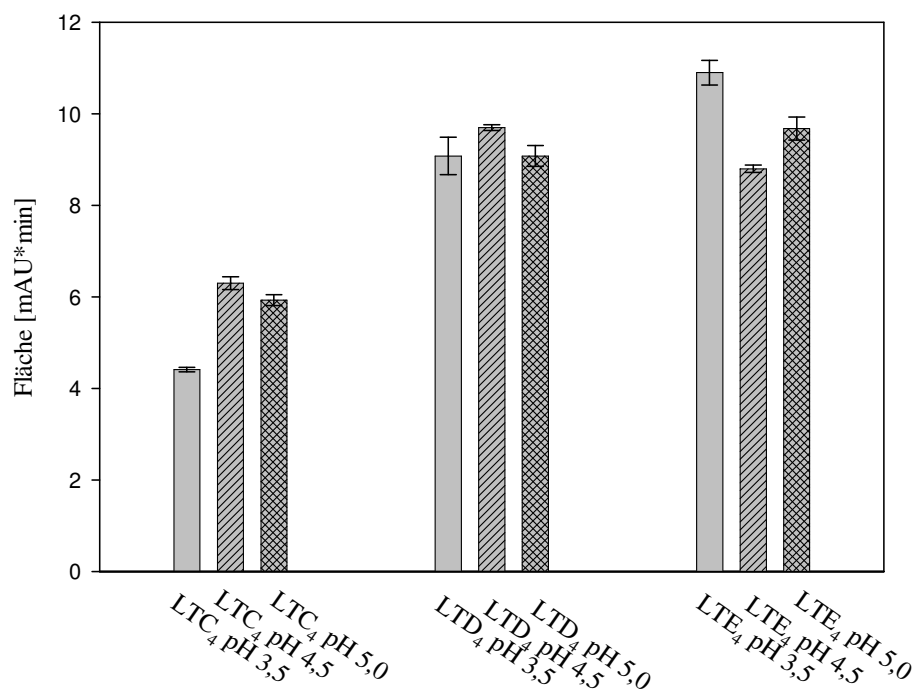


Abb.23: Einfluss des pH-Wertes des Fließmittels auf die Fläche der Cys-Leukotriene (n = 5;  $\bar{x} \pm SE$ ) Einspritzvolumen je Leukotrien 10  $\mu$ l; Programm III.2 (Vgl. C.1.1.1)

| <b>Leukotrien C<sub>4</sub></b> | <b>Retentionszeit<br/>[min]</b> | <b>Wahrscheinlich<br/>keit</b> | <b>Fläche<br/>[min*AU]</b> | <b>Wahrschein-<br/>lichkeit</b> |
|---------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|----------------------------|---------------------------------|
| pH 3,5                          | 39,9 ± 0,03                     | p < 0,001                      | 4,4 ± 0,25                 | n.s.                            |
| pH 4,5                          | 32,2 ± 0,05                     |                                | 6,3 ± 0,14                 |                                 |
| pH 5,0                          | 29,4 ± 0,64                     | n.s.                           | 5,9 ± 0,12                 | n.s.                            |
| <b>Leukotrien D<sub>4</sub></b> |                                 |                                |                            |                                 |
| pH 3,5                          | 50,8 ± 0,01                     | p < 0,001                      | 9,1 ± 0,41                 | n.s.                            |
| pH 4,5                          | 37,3 ± 0,24                     |                                | 9,7 ± 0,06                 |                                 |
| pH 5,0                          | 33,5 ± 0,19                     | p < 0,05                       | 9,1 ± 0,23                 | n.s.                            |
| <b>Leukotrien E<sub>4</sub></b> |                                 |                                |                            |                                 |
| pH 3,5                          | 52,6 ± 0,21                     | p < 0,001                      | 10,9 ± 0,27                | n.s.                            |
| pH 4,5                          | 38,5 ± 0,10                     |                                | 8,8 ± 0,08                 |                                 |
| pH 5,0                          | 34,8 ± 0,10                     | p < 0,01                       | 9,7 ± 0,25                 | n.s.                            |

Tab.6: Abhängigkeit der Retentionszeit bzw. der Fläche von dem pH-Wert des Fließmittels (n = 5;  $\bar{x} \pm SE$ ). Die Wahrscheinlichkeit wurde jeweils auf den pH-Wert von 4,5 bezogen.

Der pH-Wert beeinflusst nur die Retentionszeit, nicht aber die Fläche. Die Änderung der Retentionszeit ist auf Grund der Struktur der Cysteinyl-Leukotriene zu erwarten. Da keine Änderung der Fläche auftritt muss gefolgert werden, dass die einzelnen Leukotriene während der Messung nicht zerfallen oder metabolisiert werden.

### Änderung des Lösungsmittels

Es wurden die Leukotriene LTC<sub>4</sub> und LTE<sub>4</sub> in Fließmittel oder in der Zellsuspension (vgl. B.2.1.3.2) aufgenommen bzw. verdünnt. Die Messung wurde mit einer Flussrate von 0,6 ml/min durchgeführt, das Injektionsvolumen betrug 20 µl.

Bei LTC<sub>4</sub> betrug die Retentionszeit  $30,5 \pm 0,07$  min und die Fläche  $10,5 \pm 0,72$  min\*AU, wenn in der Zellsuspension vermessen wurde. Beim Vermessen des LTC<sub>4</sub> in Fließmittel betrug die Retentionszeit  $30,4 \pm 0,31$  min und die Fläche  $9,1 \pm 1,23$  min\*AU.

Die Retentionszeit bei LTE<sub>4</sub> betrug  $37,6 \pm 0,17$  min und die Fläche  $16,1 \pm 0,42$  min\*AU, wenn in der Zellsuspension vermessen wurde. Aus der Messung des LTE<sub>4</sub> in Fließmittel resultierte die Retentionszeit  $36,6 \pm 0,14$  min und die Fläche  $15,7 \pm 0,72$  min\*AU.

Somit unterschieden sich die Retentionszeiten nicht signifikant und auch die Flächen zeigten keinen signifikanten Unterschied.

Es besteht keine Abhängigkeit der Flächen bzw. der Retentionszeit bezüglich dieser Verdünnungslösungen. Es kommt zu keiner Metabolisierung der Untersuchungssubstanzen.

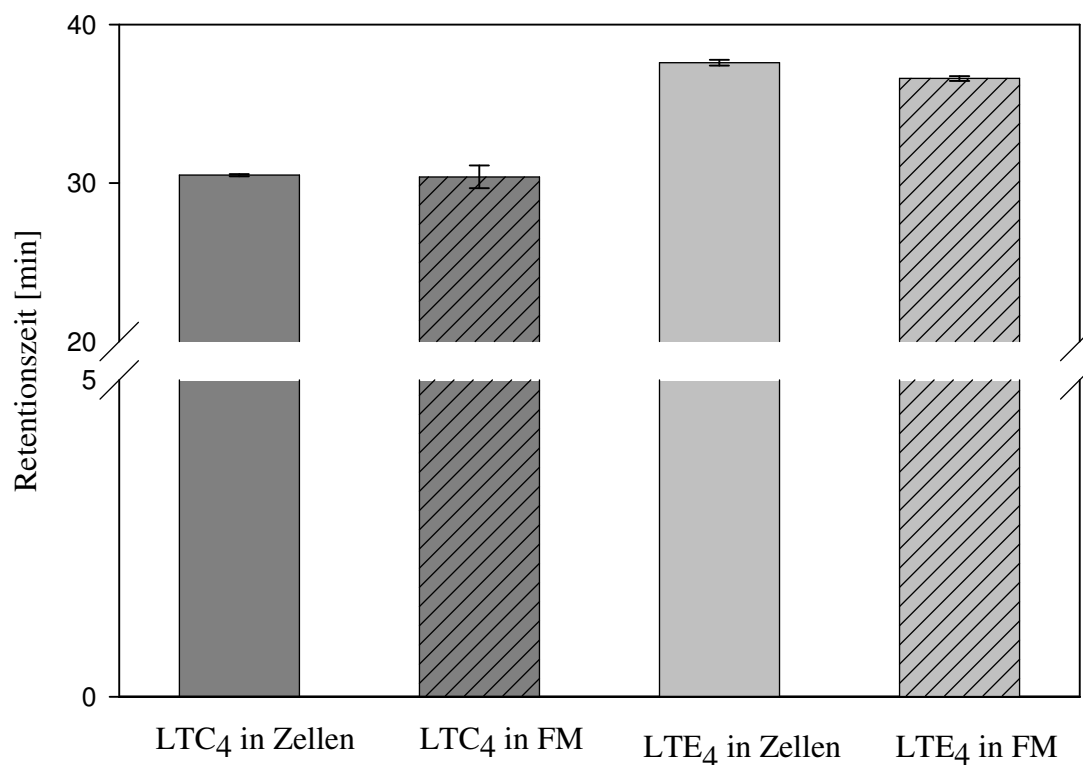


Abb.24: Retentionszeiten bei unterschiedlichen Verdünnungsmitteln (Zellsuspension oder FM) Einspritzvolumen je Leukotrien 10 µl; Programm III.2 (Vgl. C.1.1.1)

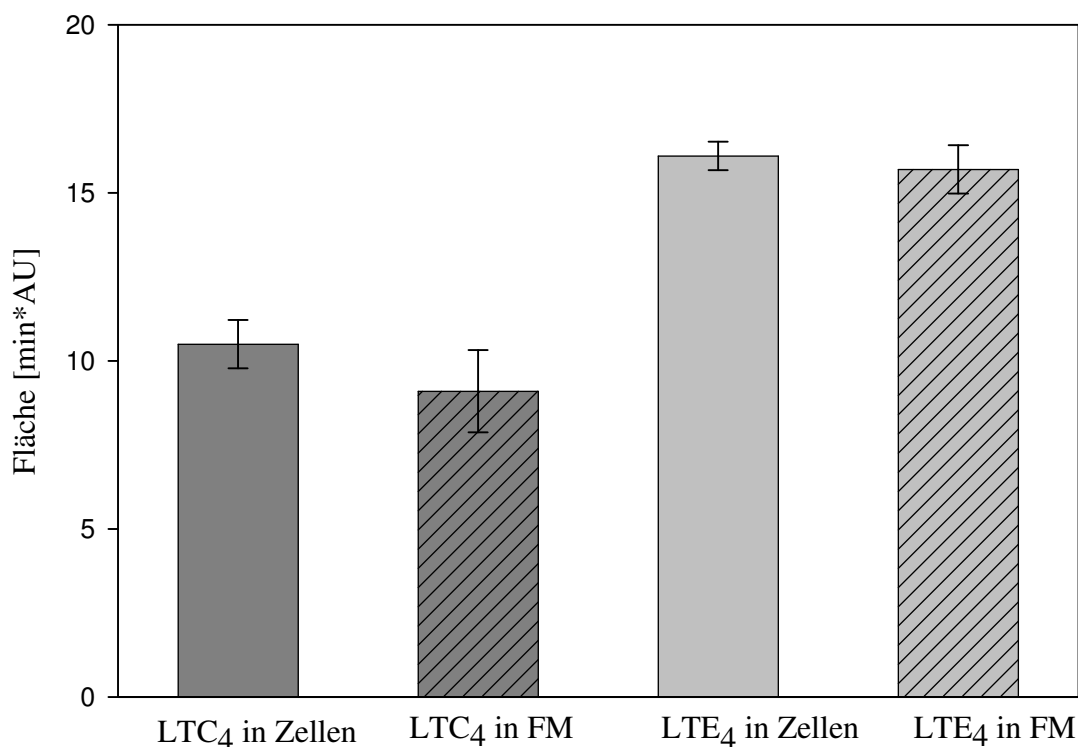


Abb.25: Fläche bei unterschiedlichen Verdünnungsmitteln (Zellsuspension oder FM) Einspritzvolumen je Leukotrien 10  $\mu$ l; Programm III.2 (Vgl. C.1.1.1)

#### C.1.1.2.5 Selektivität und Spezifität

##### **Selektivität:**

Die Peakreinheit sowie die Identität der Peaks lassen sich mit Hilfe eines Photodiodenarray-Detektors überprüfen. Die Identität wurde über den Vergleich von Retentionszeiten und UV-Spektrum bestätigt. Dabei musste darauf geachtet werden, dass die UV-Spektren von LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub> und LTE<sub>4</sub> sehr ähnlich sind und nur geringe Unterschiede bei den Maxima zu finden waren. Eine eindeutige Unterscheidung oder Identifizierung gelang nur bei Vergleich der Retentionszeiten und zusätzlichem Spiken der Reinsubstanz.

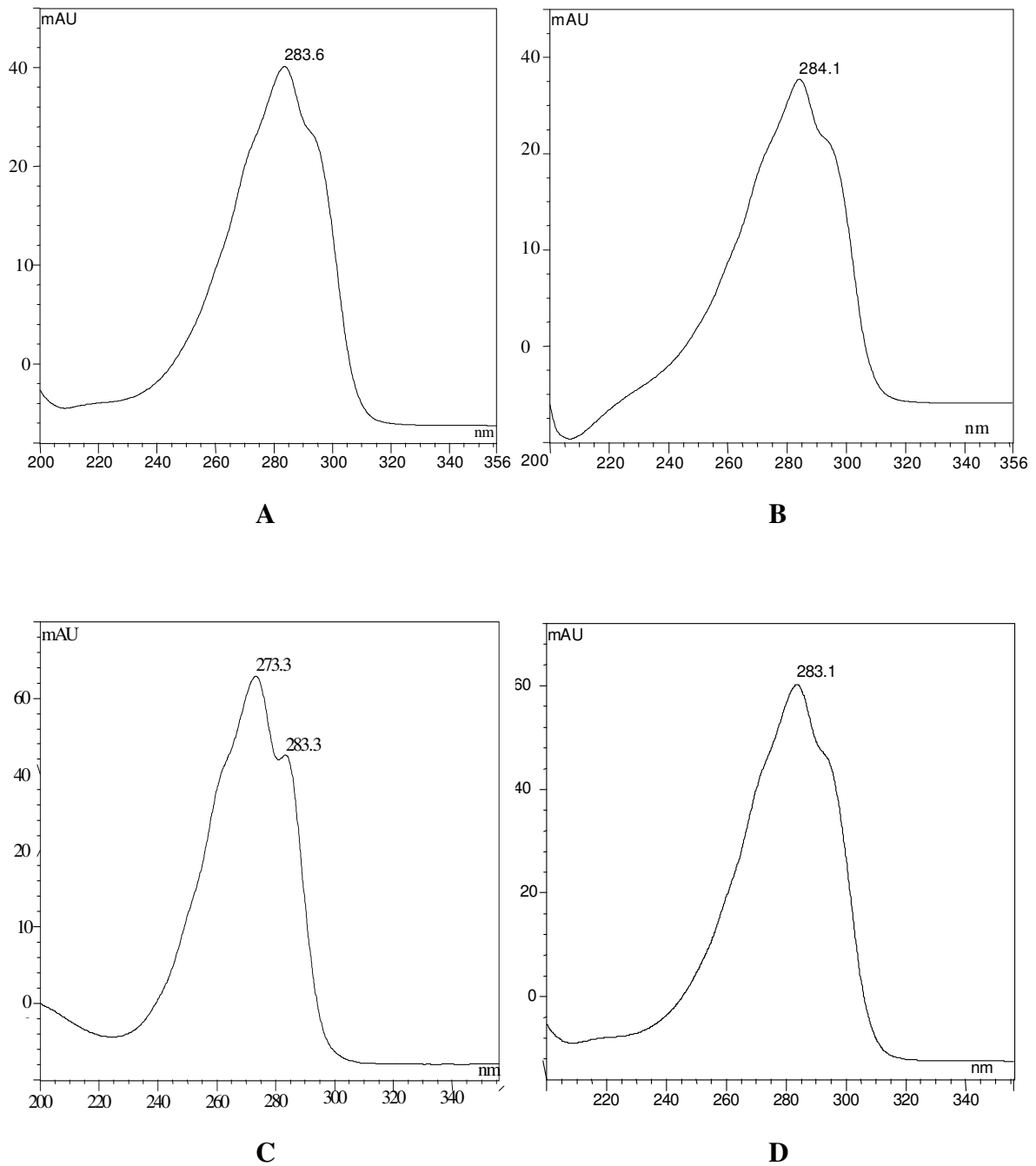


Abb.26: UV-Absorptionsspektrum von Leukotrien E<sub>4</sub> (27,5 µl/ml) (A), Leukotrien C<sub>4</sub> (25,5 µg/ml) (B), Leukotrien B<sub>4</sub> (25,5µg/ml) (C), Leukotrien D<sub>4</sub> (26,0 µg/ml) (D) jeweils in Methanol/H<sub>2</sub>O (70/30); Injektionsvolumen 10µl A und B, 20µl C und D, Programm III.2 (Vgl. C.1.1.1)

Die Maxima der Cysteinyl-Leukotriene stellten sich wie folgt dar:

LTB<sub>4</sub> bei 273,3 nm, LTC<sub>4</sub> bei 284,1 nm, LTD<sub>4</sub> bei 283,1 nm und LTE<sub>4</sub> bei 283,6 nm.

**Spezifität:**

Die Verwechslung mit dem Leukotrien B<sub>4</sub> war auszuschließen, da dies ein Maximum bei 273,3 nm zeigte. Auch eine Verwechslung mit weiteren Arachidonsäure-Metaboliten wie 5-HETE, dem 12-HETE und dem 15-HETE war auf Grund der UV-Spektren auszuschließen (5-HETE:  $\lambda_{\max} = 236,4$  nm; 12-HETE:  $\lambda_{\max} = 237,4$  nm; 15-HETE:  $\lambda_{\max} = 236,5$  nm).

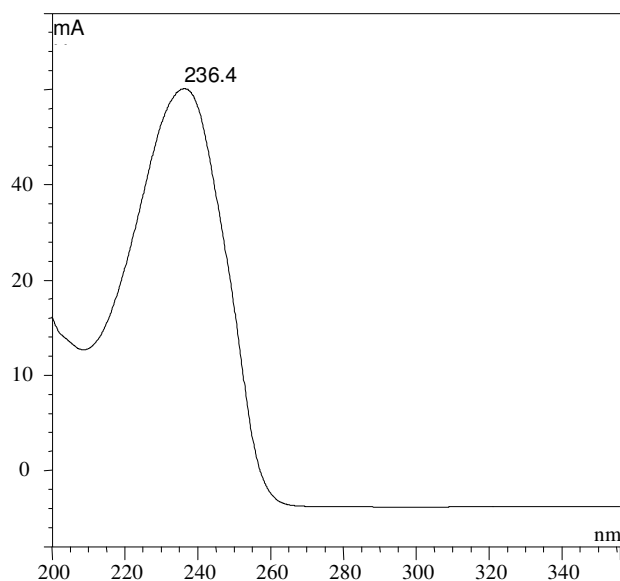


Abb.27: UV-Absorptionsspektrum von 5-HETE (20,5 µg/ml) in Methanol/H<sub>2</sub>O (70/30); Injektionsvolumen 10 µl, Programm III.2 (Vgl. C.1.1.1)

Unter Berücksichtigung der oben genannten Ähnlichkeiten war unter Verwendung der HPLC sowohl bei der Spezifität, als auch bei der Selektivität ein zufriedenstellendes Ergebnis erzielbar.

**C.1.1.2.6 Nachweis- und Bestimmungsgrenze**

Diese zwei Werte sind für jede Methode interessante Parameter, da über diese Werte die Messgrenzen bestimmt werden und so ein direkter Methodenvergleich möglich wird.

### Nachweisgrenze

Die Messungen ergaben für das Leukotrien C<sub>4</sub> den Wert 22,2 ng/ml, für LTD<sub>4</sub> 20,3 ng/ml und für LTE<sub>4</sub> 19,5 ng/ml.

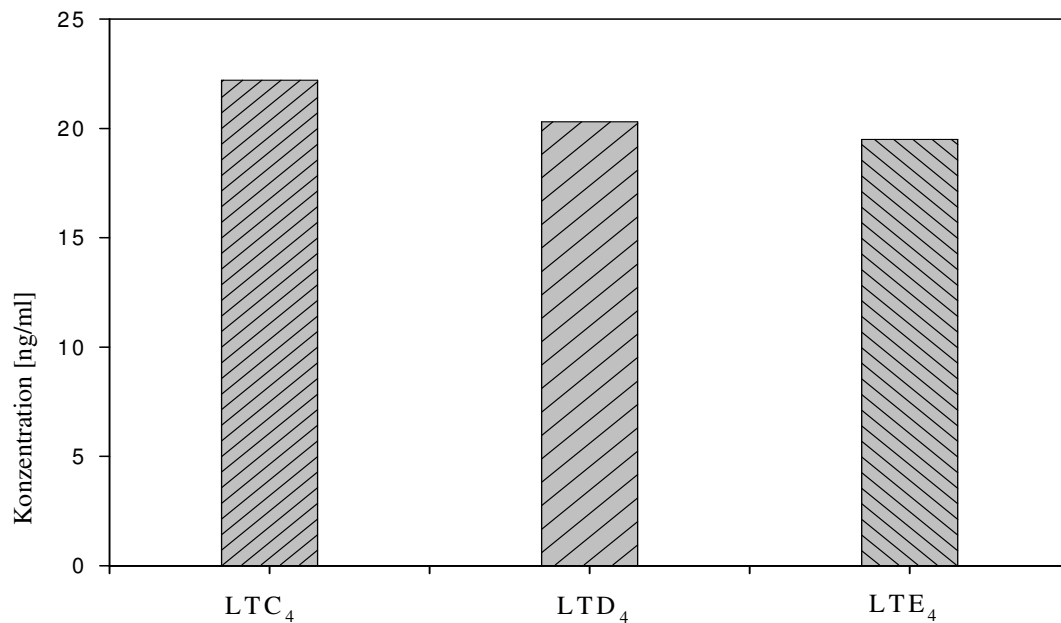


Abb.28: Nachweisgrenze der Cys-Leukotriene; Injektionsvolumen 10µl, Programm III.2 (vgl. C.1.1.1)

### Bestimmungsgrenze

Die Berechnung unter Einbezug des Grundrauschens der HPLC-Anlage ergab für das Leukotrien C<sub>4</sub> den Wert 66,6 ng/ml, für LTD<sub>4</sub> 60,9 ng/ml und für LTE<sub>4</sub> 58,5 ng/ml.



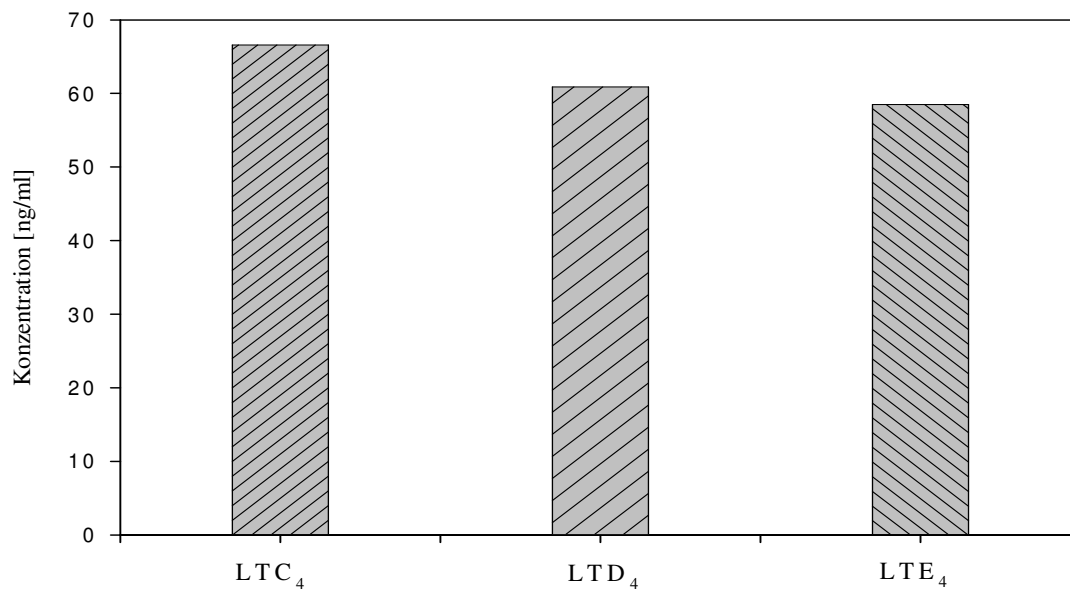


Abb.29: Bestimmungsgrenze der Cys-Leukotriene; Injektionsvolumen 10 $\mu$ l, Programm III.2 (vgl. C.1.1.1)

## **C.1.2 Messungen mittels Assays**

Bei der Überprüfung der Richtigkeit der HPLC-Methode traten Unregelmäßigkeiten des EIA-Kits der Firma Cayman Chemical auf. Daraus resultierten die folgenden Untersuchungen.

### **C.1.2.1 EIA-KIT der Firma Cayman Chemical**

Die folgenden Untersuchungen überprüfen die Richtigkeit der kommerziell erhältlichen Methode. Es wurden zwei Kit-Chargen zur Bestimmung der Konzentration der Leukotriene verwendet. Bei Messungen mit der ersten Charge des EIA-Kits der Firma Cayman Chemical fiel auf, dass die Werte der einzelnen Standardlösungen, die in den Kits mitgeliefert wurden, mit den im Kit vermessenen Sigma-Standardlösungen (externe Standardlösung) nicht übereinstimmten. Beim Vermessen der Sigma-Standardlösung und der Cayman-Standardlösung (mitgelieferte Standardlösung) kam es trotz theoretisch gleichen Gehaltes zu keinen übereinstimmenden Messwerten. Für die Cayman-Standardlösung waren die Daten um den Faktor zehn höher als die Werte der Sigma-Standardlösung; in diesem Fall wurde von der Richtigkeit des Sigma-Standards ausgegangen.

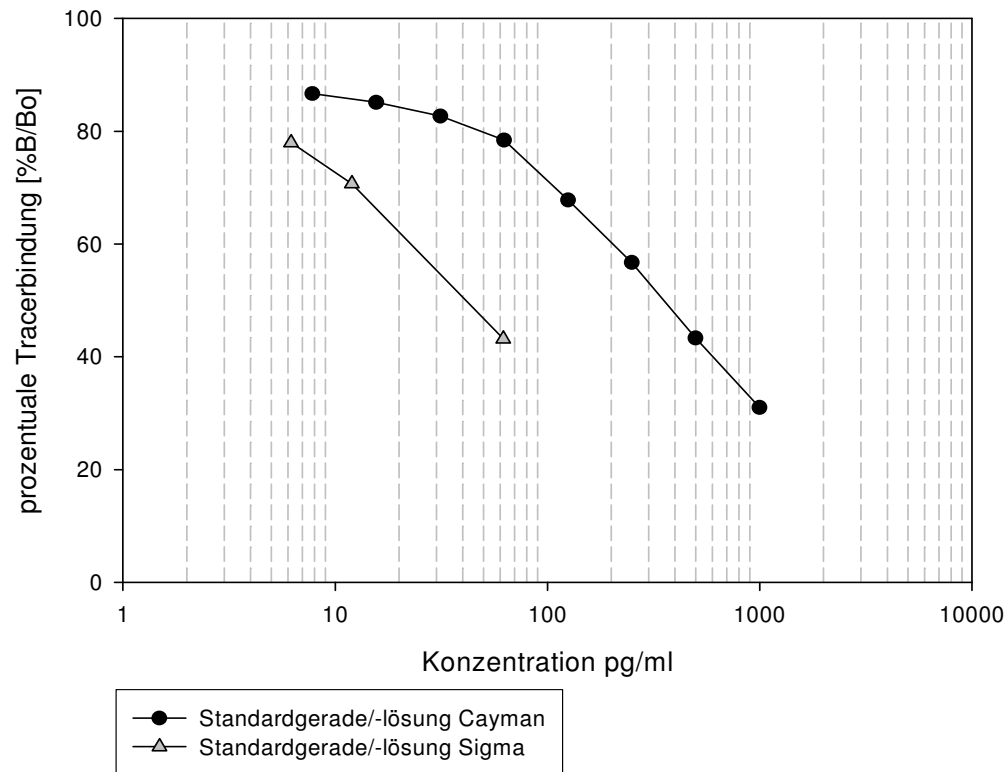


Abb.30: Charge A: Prozentuale Tracerbindung in Abhängigkeit von der Leukotrienkonzentration, Werte des Sigma-Standards (externer Standard) und des Cayman-Standards

Gemäß den oben aufgeführten Ergebnissen forderten wir eine neue Charge (Charge B) des Kits von der Firma Cayman Chemical an und wiederholten die oben beschriebene Messung.

Die darauf folgende Messung der Charge B zeigte keine signifikanten Abweichungen zwischen den einzelnen Standardlösungen der Firma Sigma (externer Standard) und der Firma Cayman Chemical.

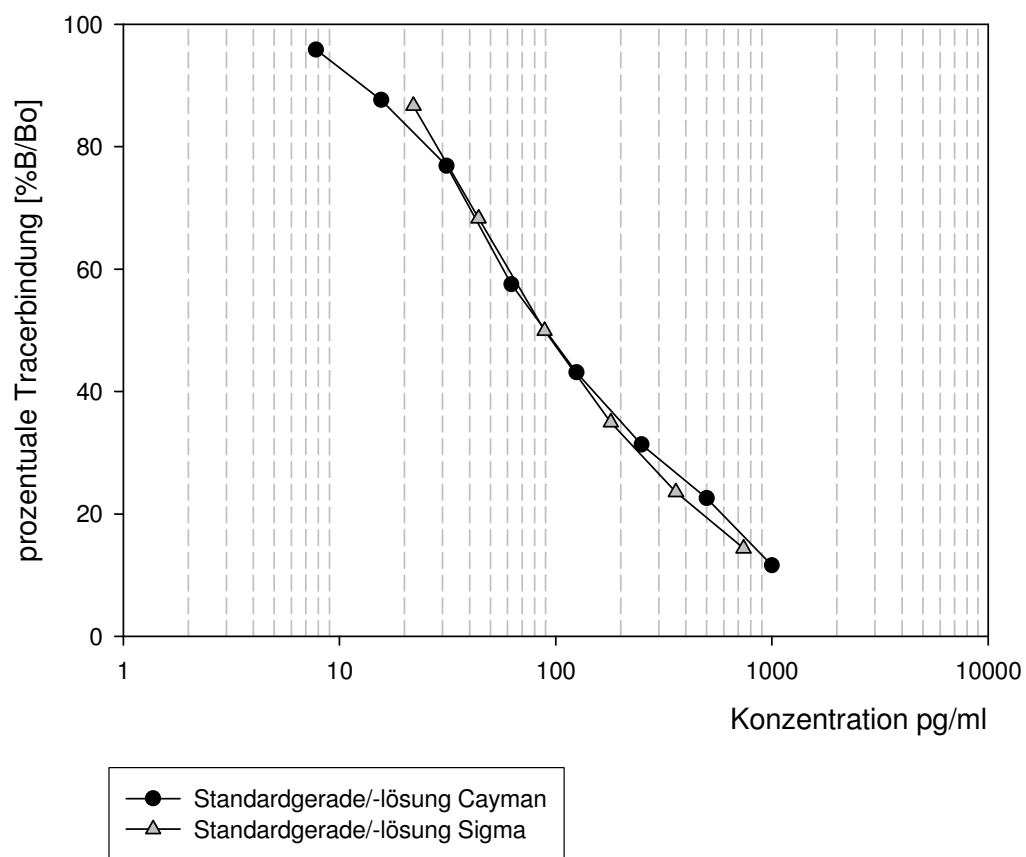


Abb.31: Charge B: Prozentuale Tracerbindung in Abhängigkeit von der Leukotrienkonzentration, Werte des Sigma-Standards und des Cayman-Standards.

### C.1.2.2 ELISA-KIT der Firma Neogen

Es stellte sich nun die Frage nach der Richtigkeit der Kits, daher wurde die gleiche Messung mit einem neuen ELISA Kit der Firma Neogen (Vergleich Sigma- mit Kit-Standardlösung) durchgeführt.

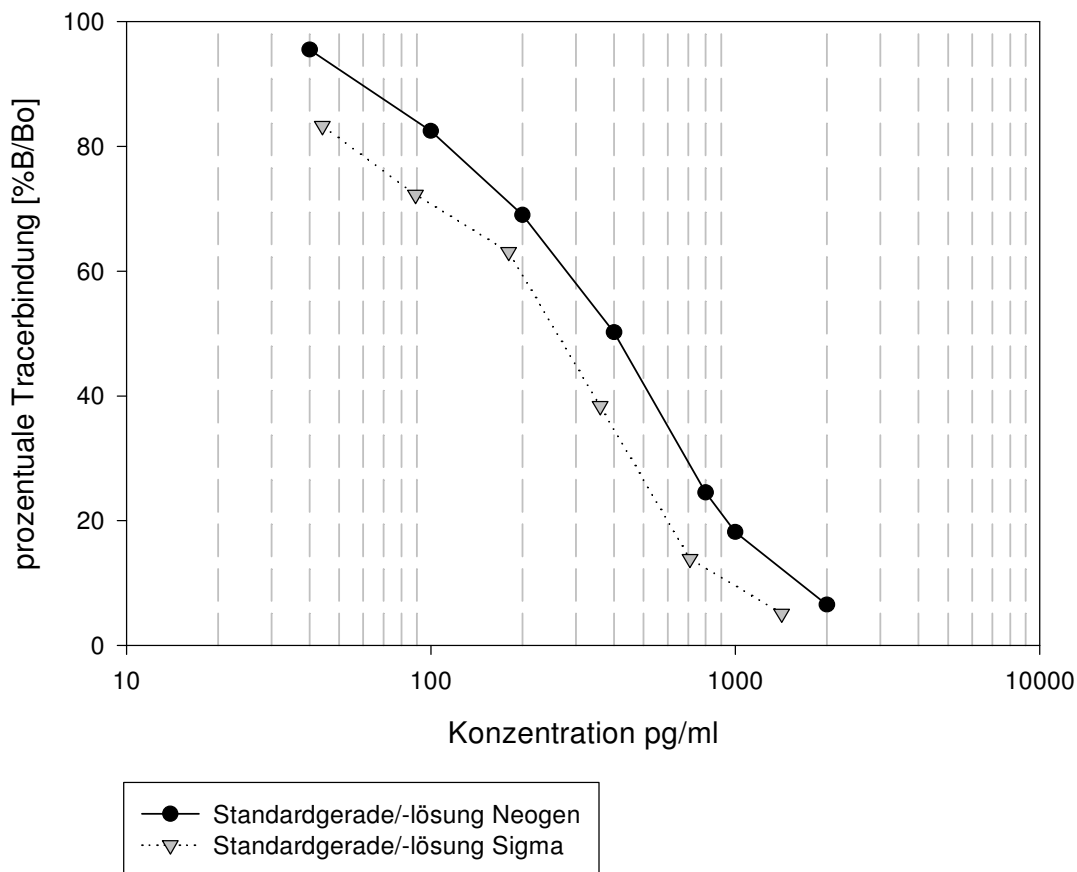


Abb.32: Prozentuale Tracerbindung in Abhängigkeit von der Leukotrienkonzentration, Werte des Sigma-Standards und des Neogen-Standards

Der ELISA-Kit der Firma Neogen wies ebenfalls eine Abweichung des mitgelieferten Standards vom theoretischen Wert auf. Für den Standard der Firma Sigma wurde im Rahmen der Messung ein kleinerer Wert erhalten als für den Standard der Firma Neogen. Die Abweichung war allerdings wesentlich geringer als bei der Charge A des EIA-Kits (Cayman Chemical).

## C.1.3 Probenaufarbeitung mit der Sep-Pak<sup>®</sup>

### C.1.3.1 Vergleich unterschiedlicher Methoden

Die einzelnen Methoden (vgl. B.2.1.1.2) wurden nacheinander durchgeführt und die Ergebnisse verglichen. Zwischen der Sep-Pak<sup>®</sup>-Methode Nr.1 und den anderen Methoden zeigte sich bei der Wiederfindung jeweils ein signifikanter Unterschied.

| Methode           | Nr.1        | Nr.2                     | Nr.3                    | Nr.4                    |
|-------------------|-------------|--------------------------|-------------------------|-------------------------|
| Wiederfindung [%] | 78,9 ± 2,21 | 49,1 ± 4,22<br>p < 0,001 | 67,3 ± 2,52<br>p < 0,01 | 46,5 ± 6,59<br>p < 0,01 |

Tab.7: Vergleich der Wiederfindung der einzelnen Sep-Pak<sup>®</sup>-Methoden. Die Berechnung der Wahrscheinlichkeit bezieht sich auf die Methode Nr.1 (n = 6,  $\bar{x} \pm SE$ ); aufgetragenes Volumen 10 µl LTC<sub>4</sub>.

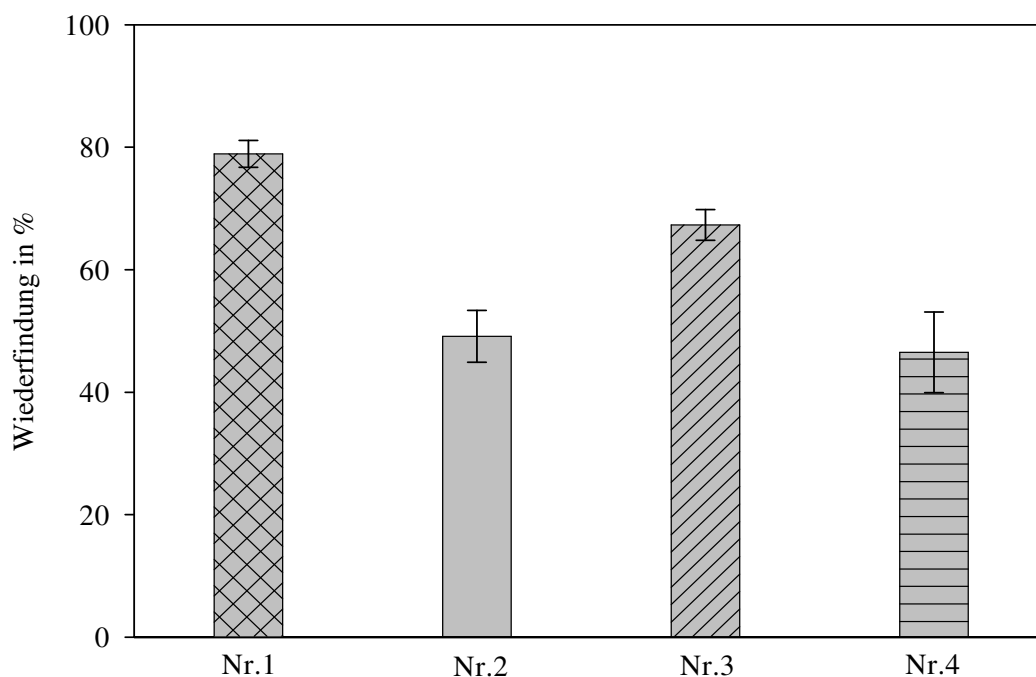


Abb.33: Vergleich der Wiederfindung bei den unterschiedlichen Sep-Pak<sup>®</sup>-Methoden (n = 6,  $\bar{x} \pm SE$ ) Aufgetragenes Volumen 10 µl LTC<sub>4</sub>.

Die Methode Nr.1 lieferte das beste Ergebnis und folglich führten wir die weiteren Versuche mit dieser Methode durch.

Um festzustellen, bei welchen Schritten ein Verlust der Probensubstanz auftrat, wurden weitere Untersuchungen mit der Sep-Pak<sup>®</sup>-Methode Nr.1 durchgeführt.

### C.1.3.2 Unterschiedliche Elutionsmittel

Hierbei untersuchten wir, ob durch unterschiedliche Elutionsmittel die Wiederfindungsrate optimiert werden kann. Sowohl das Elutionsmittel selbst als auch die Elutionsvolumina wurden variiert. Dazu wurde eine Probenkonzentration von 55,0 µg/ml LTC<sub>4</sub> auf die Sep-Pak<sup>®</sup>-Kartuschen aufgetragen. Die Probe wurde mit unterschiedlichen Elutionsmitteln von der Säule eluiert, im IR-Dancer getrocknet und anschließend mit einem Methanol/Wasser-Gemisch (70:30) wieder in Lösung gebracht. Wir verwendeten als Elutionsmittel Methanol, Ethanol und ein Ethanol/Wasser-Gemisch (90:10).

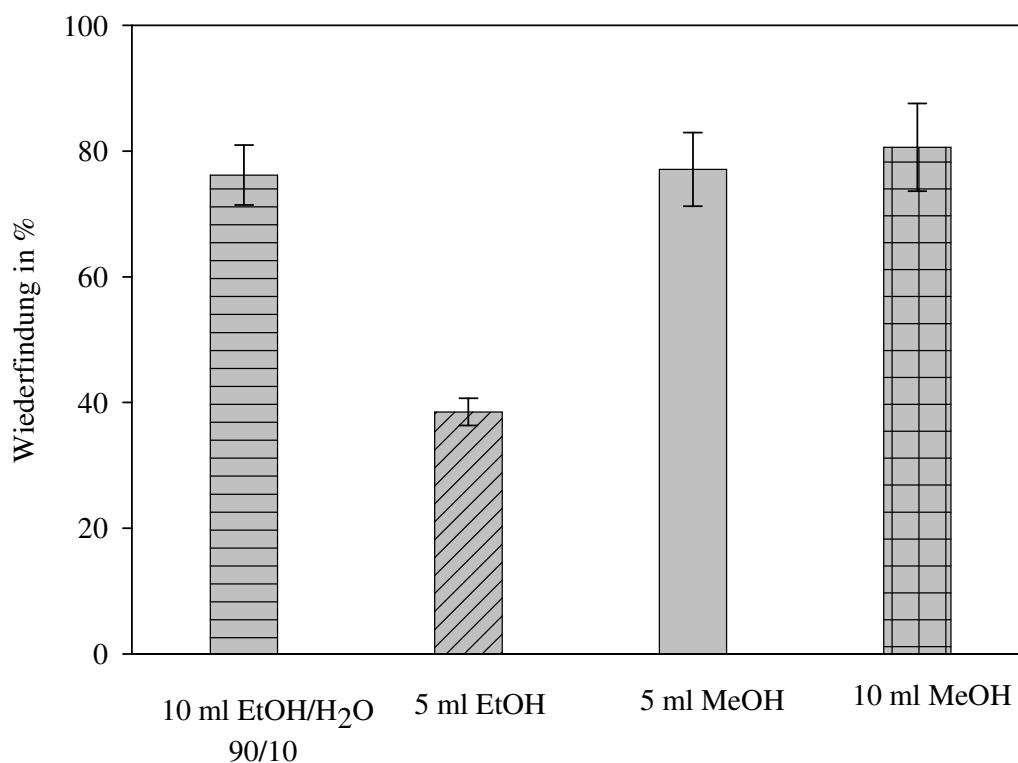


Abb.34: Vergleich der Wiederfindung bei unterschiedlichen Elutionsmitteln bzw. -volumina mit Sep-Pak<sup>®</sup>-Methode Nr.1. (n = 6,  $\bar{x} \pm SE$ )

Zwischen den einzelnen Methoden ergab sich nur eine signifikante Verschlechterung bei der Elution mit 5 ml EtOH im Vergleich zu der Elution 10 ml EtOH/H<sub>2</sub>O ( $38,5 \pm 2,13$  vs  $76,2 \pm 4,77$  %;  $p < 0,05$ ).

Die anderen Methoden zeigten im Vergleich zur Elution mit dem Gemisch 10 ml EtOH/H<sub>2</sub>O keine signifikanten Unterschiede:

MeOH 5 ml:  $77,1 \pm 5,86$  vs  $76,2 \pm 4,77$  %; n.s.

MeOH 10 ml:  $80,6 \pm 6,95$  vs  $76,2 \pm 4,77$  %; n.s.

Die klinischen Versuche wurden mit dem Gemisch EtOH/H<sub>2</sub>O als Elutionsmittel durchgeführt, das ebenfalls für die Kit-Bearbeitung vorgeschrieben wurde.

### **C.1.3.3 Instabilität der Leukotriene unter IR-Trocknung**

Um die Frage zu klären, wie groß der Verlust an Leukotrienen durch das Trocknen der Proben sei, das nach der Aufreinigung über die Sep-Pak<sup>®</sup>-Kartuschen notwendig ist, wurde die folgende Versuchsreihe durchgeführt. Auf Grund der chemischen Struktur der Cysteinyl-Leukotriene wäre ein Zerfall der Substanzen durch die IR-Trocknung zu erwarten.

Es wurde jeweils eine Leukotrien-Lösung (LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub>, LTE<sub>4</sub>: 55 µg/ml) mit 150 µl EIA verdünnt (= LT). Weitere Proben (mit der gleichen Mengen an LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub>, LTE<sub>4</sub>) wurden mit 10 ml EtOH/H<sub>2</sub>O-Gemisch (90/10) aufgefüllt und alle Proben unter Vakuum im IR-Dancer getrocknet. Anschließend erfolgte die Wiederaufnahme mit 150 µl EIA-Puffer und das Einspritzen in die HPLC (= LT trocken). Die Werte zwischen LT trocken und LT waren nur beim Leukotrien C<sub>4</sub> schwach signifikant erniedrigt ( $6,7 \pm 0,48$  vs  $9,8 \pm 0,36$  min\*AU;  $p < 0,01$ ). Bei dem Leukotrien E<sub>4</sub> ( $14,5 \pm 0,5$  vs  $16,0 \pm 0,55$  min\*AU; n.s.) und dem Leukotrien D<sub>4</sub> ( $12,6 \pm 0,35$  vs  $14,6 \pm 1,36$  min\*AU; n.s.) war kein signifikanter Unterschied festzustellen.



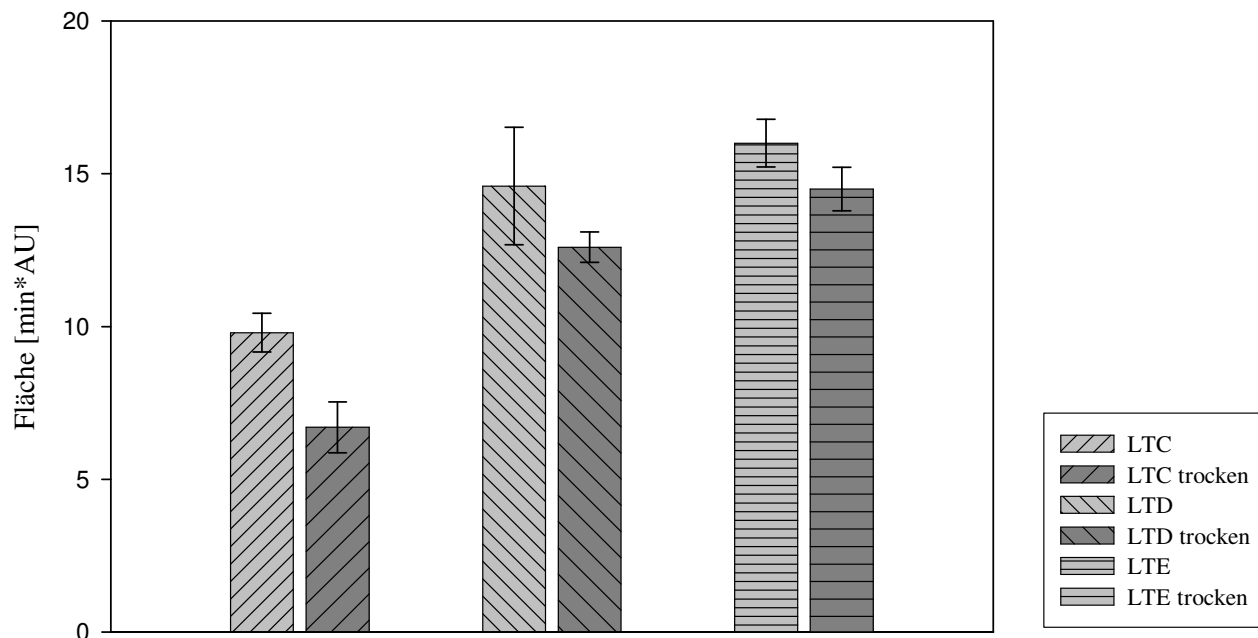


Abb.35: Fläche der Leukotriene LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub> und LTE<sub>4</sub>, 150 µl Elutionsvolumen (n = 6,  $\bar{x} \pm SE$ )

Auf Grund ihrer Triengruppe weist die Gruppe der Leukotriene eine hohe Instabilität auf. Dennoch waren die untersuchten Leukotriene unter der IR-Trocknung ausreichend stabil. Lediglich bei LTC<sub>4</sub> zeigt sich eine wenn auch nur schwach signifikante Erniedrigung der Leukotrienfläche.

Daher wurde keine Änderung in der klinischen Durchführung notwendig und es wurde unter den bisherigen Bedingungen weitergearbeitet.

#### C.1.3.4 Unterschiedliche Lösungsvolumina

Die im IR-Dancer getrockneten Proben mussten für die Vermessung in der HPLC wieder in Lösung gebracht werden. Zu diesem Zweck untersuchten wir, welche Menge an Lösungsmittel notwendig war, um die beste Wiederfindungsrate zu erzielen. Ausgehend vom bisherigen Lösungsvolumen von 150 µl wurden die Lösungsvolumina 85 µl, 300 µl und 450 µl getestet.

Als Probe wurde LTC<sub>4</sub> (10 µl) auf die Sep-Pak<sup>®</sup> aufgetragen, mit 5 ml MeOH eluiert und im IR-Dancer unter Vakuum getrocknet. Die getrocknete Substanz wurde anschließend in EIA-Puffer gelöst und mit der HPLC vermessen.

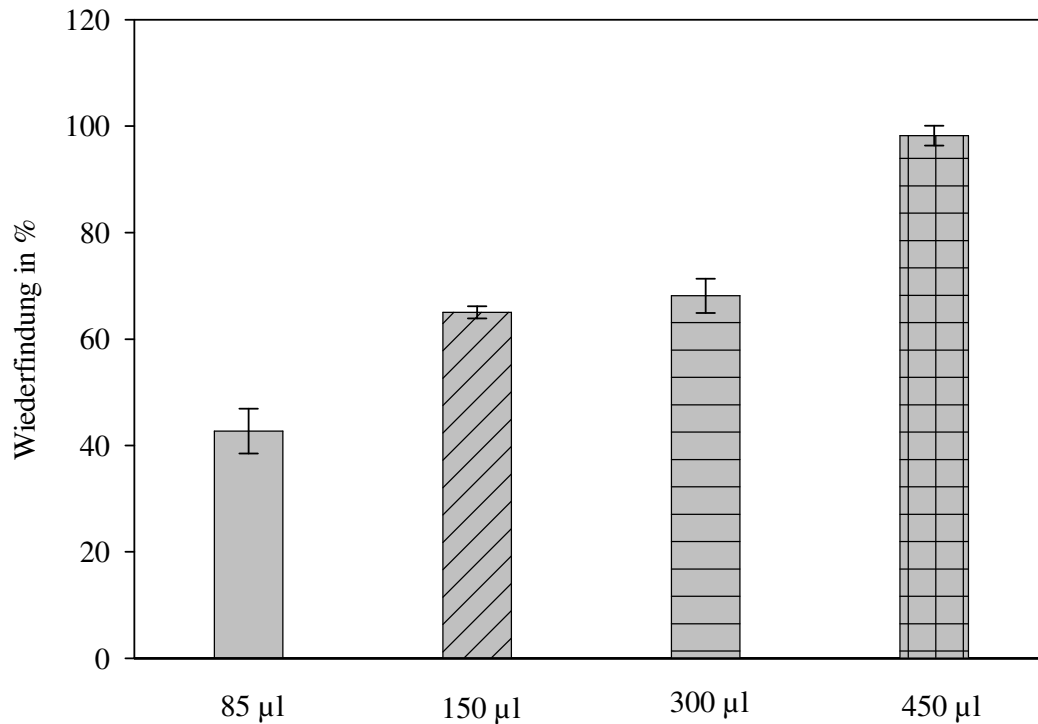


Abb.36: Vergleich der unterschiedlichen Lösungsvolumina (85 µl, 150 µl, 300 µl und 450 µl EIA-Puffer) (n = 6,  $\bar{x} \pm SE$ )

Es traten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Volumina 85 µl ( $42,7 \pm 4,21$  vs  $65,0 \pm 1,14$  %; n.s.) und 300 µl ( $68,1 \pm 3,21$  vs  $65,0 \pm 1,14$  %; n.s.) EIA-Puffer, bezogen auf 150 µl auf. Die Proben mit 450 µl EIA-Puffer waren signifikant erhöht ( $98,2 \pm 1,87$  vs  $65,0 \pm 1,14$  %;  $p < 0,01$ ).

Auf Grund dieses Ergebnisses wurde bei den folgenden klinischen Untersuchungen die getrocknete Substanz jeweils mit 450 µl EIA-Puffer in Lösung gebracht.

## C.1.4 Stimulationsversuche

Vor der klinischen Studie musste zunächst untersucht werden, unter welchen Bedingungen die größte Leukotrienbildung/-freisetzung aus den PBL stimuliert werden kann. Im folgenden Kapitel wird beschrieben, welche Auswirkungen verschiedene Stimulationsbedingungen auf den Leukotriengehalt haben. Die wesentlichen Faktoren **Art der Stimulationsreagenzien** und **Stimulationszeit** wurden zunächst näher untersucht. Als weitere Einflussfaktoren auf die Leukotrienbildung/-freisetzung untersuchten wir auch die Änderung der Zellzahl und den Calcium-Gehalt des Puffers.

### C.1.4.1 Einfluss der Stimulationsreagenzien

#### C.1.4.1.1 Stimulation mit Melittin

Die Konzentration des zugegebenen Melittins variierte von 0,7 bis 10,5  $\mu\text{M}$ . Wie auch in den übrigen Stimulationsversuchen betrug die Inkubationszeit 5 bzw. 15 Minuten.

Vor allem bei einer Inkubationszeit von 15 Minuten zeigte sich eine signifikante Erhöhung bezogen auf den Basalwert.

| Konz. Melittin [ $\mu\text{M}$ ] | 0,00 (basaler Wert) | 0,70                        | 1,75                        | 2,10                       | 3,50                        | 5,25                       | 7,00                        | 10,50                      |
|----------------------------------|---------------------|-----------------------------|-----------------------------|----------------------------|-----------------------------|----------------------------|-----------------------------|----------------------------|
| Stimulationszeit 5 min           | 0,1 $\pm$ 0,01      | 0,5 $\pm$ 0,02<br>p < 0,001 | 0,2 $\pm$ 0,02<br>p < 0,01  | 0,2 $\pm$ 0,02<br>p < 0,01 | 0,3 $\pm$ 0,02<br>p < 0,01  | 0,1 $\pm$ 0,02<br>n.s.     | 0,1 $\pm$ 0,01<br>n.s.      | 0,1 $\pm$ 0,01<br>n.s.     |
| Stimulationszeit 15 min          | 0,1 $\pm$ 0,02      | 1,2 $\pm$ 0,24<br>p < 0,05  | 0,4 $\pm$ 0,01<br>p < 0,001 | 0,3 $\pm$ 0,03<br>p < 0,05 | 0,3 $\pm$ 0,01<br>p < 0,001 | 0,2 $\pm$ 0,01<br>p < 0,05 | 0,2 $\pm$ 0,01<br>p < 0,001 | 0,2 $\pm$ 0,02<br>p < 0,05 |

Tab.8: Leukotriengehalt nach Stimulation mit Melittin bei den Inkubationszeiten 5 oder 15 Minuten in pmol/10<sup>6</sup> Zellen (n = 6;  $\bar{x} \pm \text{SE}$ )

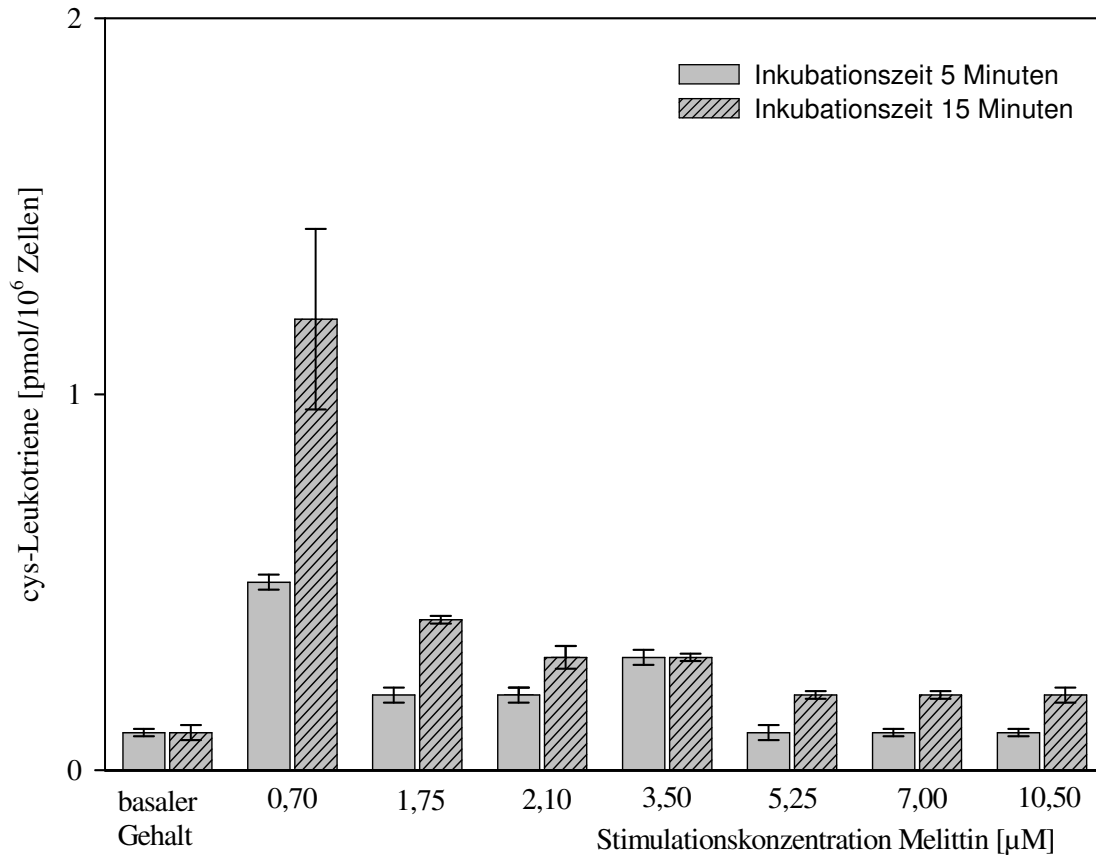


Abb.37: Abhängigkeit des Leukotrien-Gehaltes [pmol/10<sup>6</sup> Zellen] von der Melittinkonzentration bei Inkubationszeiten von 5 bzw. 15 Minuten ( $n = 6$ ,  $\bar{x} \pm SE$ )

Bei der Stimulation mit Melittin zeigte sich eine maximale Stimulierbarkeit bei einer Stimulationskonzentration von 0,70 µM. Die Inkubationszeit spielte vor allem beim Maximum eine Rolle, in den anderen Bereichen kam es zu keinen auffälligen Unterschieden.

Es stellte sich nun die Frage, ob sich ein Unterschied zwischen spezifischem Allergen (Melittin) und einem unspezifischen IgE-Antikörper im Bezug auf die Stimulation von Cysteinyl-Leukotrienen zeigt.

### C.1.4.1.2 Stimulation mit Anti-IgE

Für die Stimulation setzten wir den Zellsuspensionen zwischen 25  $\mu$ l und 400  $\mu$ l einer 1:1000 Verdünnung des Anti-IgE-Serums vom Kaninchen mit einer Proteinkonzentration von 8,3 g/l zu. Die Inkubationszeit betrug entweder 5 oder 15 Minuten.

Sowohl bei der Inkubationszeit von 5 Minuten als auch bei der Inkubationszeit von 15 Minuten erhöhten sich die Werte signifikant, bezogen auf den Basalwert. Ein Maximum wie bei der Stimulation mit Melittin bildete sich nicht.

| Konz<br>Anti-IgE<br>[ $\mu$ g/l] | 0,0<br>(ba-<br>saler<br>Wert) | 0,2                               | 0,3                               | 0,4                               | 0,6                               | 1,2                               | 2,1                               | 3,3                               |
|----------------------------------|-------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| Stimula-<br>tionszeit<br>5 min   | 0,2 $\pm$<br>0,04             | 0,7 $\pm$<br>0,08<br>p <<br>0,01  | 0,5 $\pm$<br>0,03<br>p <<br>0,01  | 0,5 $\pm$<br>0,03<br>p <<br>0,01  | 0,4 $\pm$<br>0,01<br>p <<br>0,001 | 0,4 $\pm$<br>0,01<br>p <<br>0,001 | 0,7 $\pm$<br>0,07<br>p <<br>0,01  | 0,5 $\pm$<br>0,02<br>p <<br>0,001 |
| Stimula-<br>tionszeit<br>15 min  | 0,2 $\pm$<br>0,01             | 2,4 $\pm$<br>0,04<br>p <<br>0,001 | 2,6 $\pm$<br>0,10<br>p <<br>0,001 | 2,0 $\pm$<br>0,10<br>p <<br>0,001 | 2,6 $\pm$<br>0,10<br>p <<br>0,001 | 2,1 $\pm$<br>0,08<br>p <<br>0,001 | 2,1 $\pm$<br>0,08<br>p <<br>0,001 | 2,0 $\pm$<br>0,08<br>p <<br>0,001 |

Tab.9: Leukotriengehalt nach Stimulation mit Anti-IgE bei den Inkubationszeiten 5 oder 15 Minuten in pmol/ $10^6$  Zellen (n = 6;  $\bar{x} \pm$  SE)

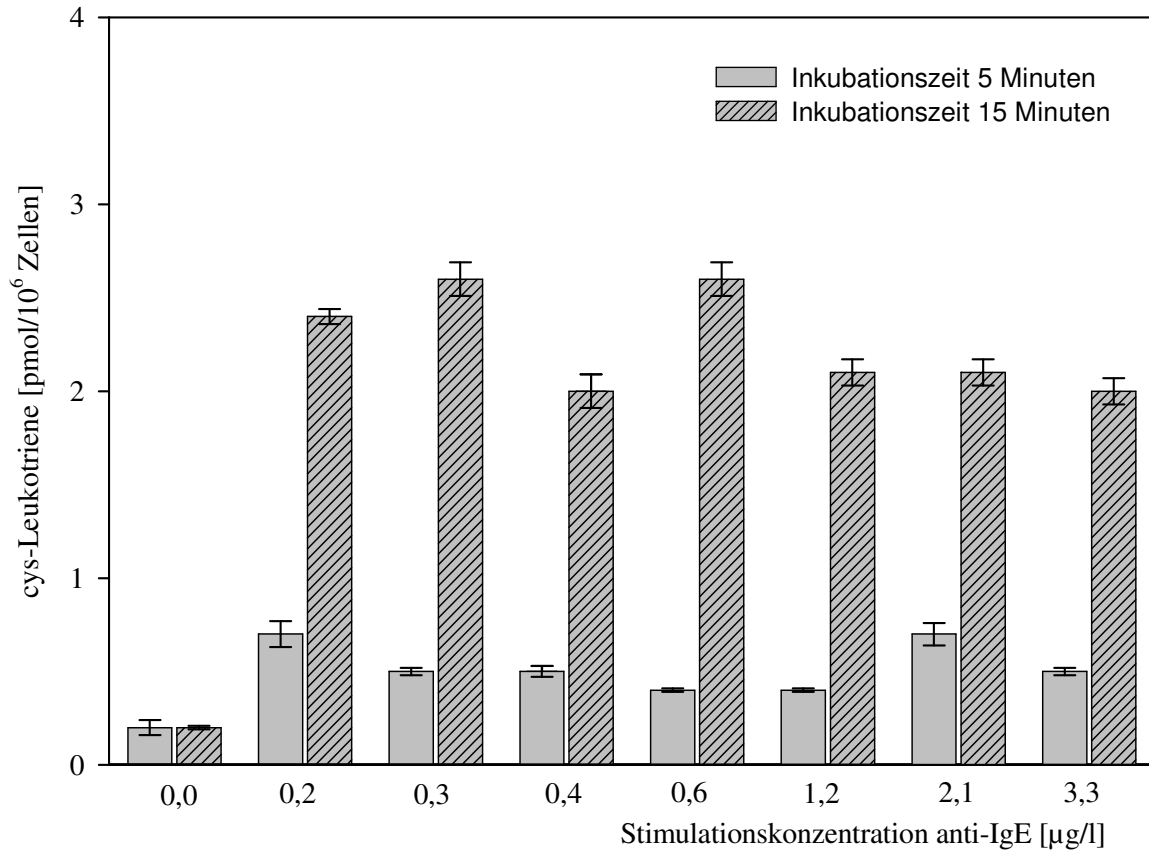


Abb.38: Abhängigkeit des Leukotrien-Gehaltes von unterschiedlichen Anti-IgE Konzentrationen bei den Inkubationszeiten 5 bzw. 15 Minuten [pmol/ $10^6$  Zellen] ( $n = 6$ ;  $\bar{x} \pm \text{SE}$ )

Bei der Stimulation mit dem unspezifischen Allergen zeigte sich keine Abhängigkeit von der eingesetzten Konzentration des IgE-Antikörpers. Die Inkubationszeit nahm aber Einfluss auf die gebildete Menge an Cys-Leukotrienen. Bei einer Inkubationszeit von 15 Minuten bildete sich im Vergleich zu einer Stimulationszeit von 5 Minuten die vierfache Menge an Cys-Leukotrienen.

### C.1.4.1.3 Stimulation mit Calcium-Ionophor A23187

Nachdem sich bei den bisherigen Stimulationsreagenzien nur geringe Mengen an Leukotrienen gebildet hatten, versuchten wir mit einem Calcium-Ionophor auf einem weiteren Weg die Leukotrienproduktion/-freisetzung auszulösen.

Bei den folgenden Versuchsansätzen wurde der Einfluss unterschiedlicher Konzentrationen des Calcium-Ionophors A23187 auf die Leukotrienbildung von PBL untersucht. Es wurden jeweils  $3 \times 10^6$  Zellen/ml fünf bzw. 15 Minuten lang inkubiert und die Reaktion mit kaltem Methanol gestoppt. Es zeigte sich mit Ausnahme der Stimulationszeit von 15 Minuten und einer Konzentration von 0,2  $\mu\text{M}$  A23187 jeweils eine signifikante Erhöhung der Werte im Vergleich zu den Basalwerten.

| Konz. A23187 [ $\mu\text{mol/l}$ ] | 0,0<br>(basaler Wert) | 0,2                          | 0,5                          | 0,8                          | 1,0                          | 1,2                          | 2,0                           | 3,0                           |
|------------------------------------|-----------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| Stimulationszeit 5 min             | 1,8 $\pm$ 0,09        | 28,5 $\pm$ 0,17<br>p < 0,001 | 37,6 $\pm$ 1,92<br>p < 0,001 | 63,0 $\pm$ 0,30<br>p < 0,001 | 82,2 $\pm$ 7,50<br>p < 0,01  | 99,1 $\pm$ 0,85<br>p < 0,001 | 158,2 $\pm$ 1,46<br>p < 0,001 | 159,3 $\pm$ 0,53<br>p < 0,001 |
| Stimulationszeit 15 min            | 1,7 $\pm$ 0,03        | 1,8 $\pm$ 0,01<br>n.s.       | 6,8 $\pm$ 0,12<br>p < 0,001  | 11,7 $\pm$ 0,34<br>p < 0,001 | 16,4 $\pm$ 0,20<br>p < 0,001 | 43,5 $\pm$ 0,15<br>p < 0,001 | 39,2 $\pm$ 0,56<br>p < 0,001  | 30,3 $\pm$ 0,29<br>p < 0,001  |

Tab.10: Leukotriengehalt nach Stimulation mit Calcium-Ionophor nach Inkubationszeiten von fünf und 15 Minuten in  $\text{pmol}/10^6$  Zellen ( $n = 6$ ;  $\bar{x} \pm \text{SE}$ ;) )

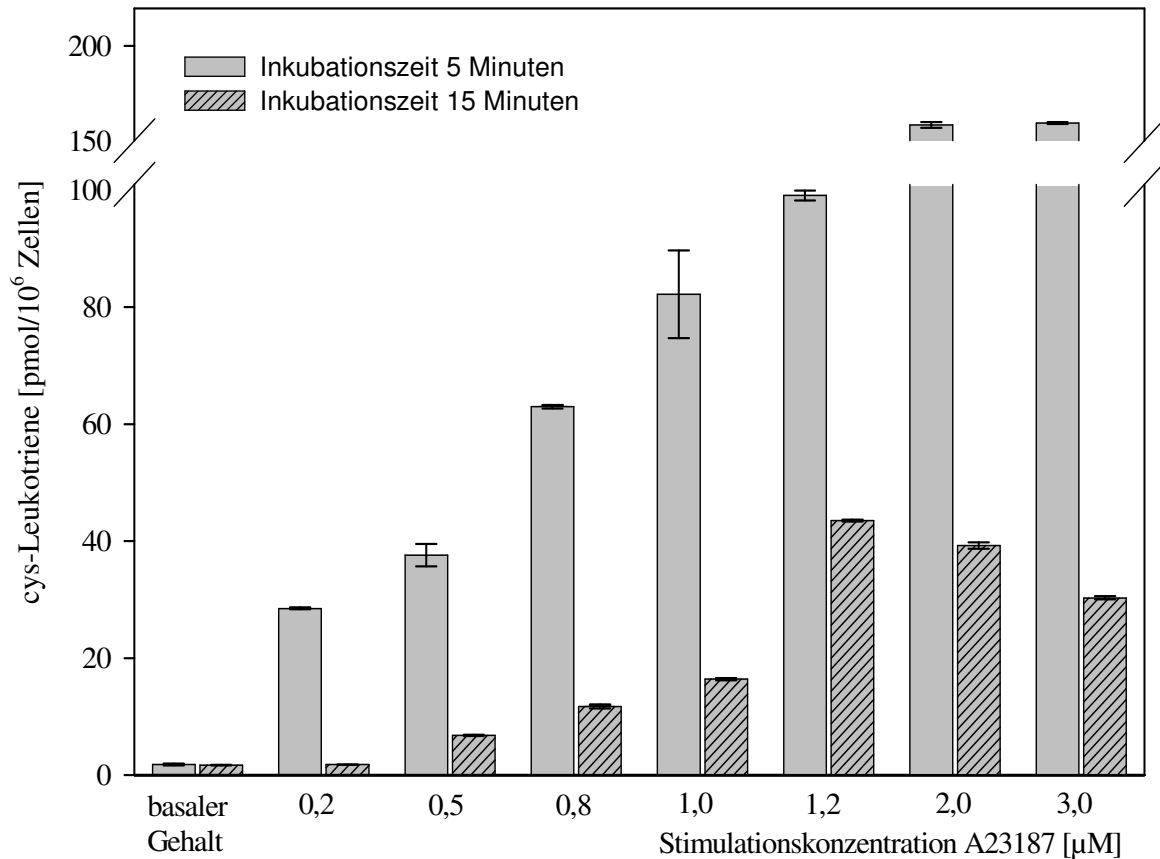


Abb.39: Abhängigkeit des Leukotrien-Gehaltes von der Konzentration an Calcium-Ionophor bei den Inkubationszeiten fünf und 15 Minuten in pmol/10<sup>6</sup> Zellen ( $n = 6$ ;  $\bar{x} \pm SE$ ).

Der Versuch ergab eine zeitliche Abhängigkeit bei der Stimulation mit A23187. Die Stimulation mit dem Calcium-Ionophor bei fünfminütiger Inkubation zeigte kein Maximum der gebildeten Leukotrienmenge, aber ein Plateau. Mit zunehmender Konzentration von A23187 stieg der gesamte Leukotriengehalt an und bildete ein Plateau ab einer Konzentration von 2,0 μM A23187. Bei der kürzeren Inkubationszeit war der Leukotriengehalt der Zellen größer als bei der längeren. Hier entwickelte sich eine maximale Leukotrienmenge von  $43,5 \pm 0,15$  pmol/10<sup>6</sup> Zellen bei einer Stimulationskonzentration von 1,2 μM A23187. Dieses Maximum war um ein vielfaches niedriger als der vergleichbare Gehalt bei einer Inkubationszeit von fünf Minuten. Es kam zu einer deutlich gesteigerten Leukotrienausschüttung im Vergleich zur Stimulation mit Melittin oder Anti-IgE.



#### C.1.4.1.4 Stimulation mit A23187 und Arachidonsäure

Im Rahmen dieser Untersuchung wurde analysiert, ob durch die Zugabe von Arachidonsäure eine Erhöhung des gebildeten Leukotrien-Gehaltes bewirkt werden kann und ob eine Konzentrationsabhängigkeit besteht. Der Zellsuspension wurden jeweils 1,2  $\mu\text{M}$  A23187 hinzugefügt. Die Konzentration der zugegebenen Arachidonsäure variierte zwischen 0,25  $\mu\text{M}$  und 5,00  $\mu\text{M}$ . Die Inkubationszeit betrug entweder fünf oder 15 Minuten. Die Ergebnisse zeigten unter diesen Stimulationsbedingungen signifikant erhöhte Werte im Vergleich zu den Basalwerten.

| Konz. an AA [ $\mu\text{mol/l}$ ] | 0,00 (basaler Wert) | 0,25                         | 0,63                         | 1,00                         | 1,25                         | 2,00                         | 3,75                         | 5,00                         |
|-----------------------------------|---------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| Stimulationszeit 5 min            | 1,9 $\pm$ 0,12      | 66,8 $\pm$ 2,05<br>p < 0,001 | 58,3 $\pm$ 1,56<br>p < 0,001 | 41,6 $\pm$ 0,13<br>p < 0,001 | 50,1 $\pm$ 0,62<br>p < 0,001 | 47,3 $\pm$ 0,78<br>p < 0,001 | 43,3 $\pm$ 0,25<br>p < 0,001 | 40,5 $\pm$ 0,44<br>p < 0,001 |
| Stimulationszeit 15 min           | 1,9 $\pm$ 0,12      | 10,3 $\pm$ 0,48<br>p < 0,001 | 13,8 $\pm$ 0,17<br>p < 0,001 | 11,2 $\pm$ 0,18<br>p < 0,001 | 38,9 $\pm$ 2,29<br>p < 0,001 | 51,2 $\pm$ 0,93<br>p < 0,001 | 75,3 $\pm$ 5,65<br>p < 0,01  | 64,3 $\pm$ 2,90<br>p < 0,01  |

Tab.11: Leukotriengehalt nach Stimulation mit A23187 (1,2  $\mu\text{M}$ ) und einer variierenden Konzentration der Arachidonsäure bei den Inkubationszeiten fünf oder 15 Minuten in  $\text{pmol}/10^6$  Zellen ( $n = 6$ ;  $\bar{x} \pm \text{SE}$ )

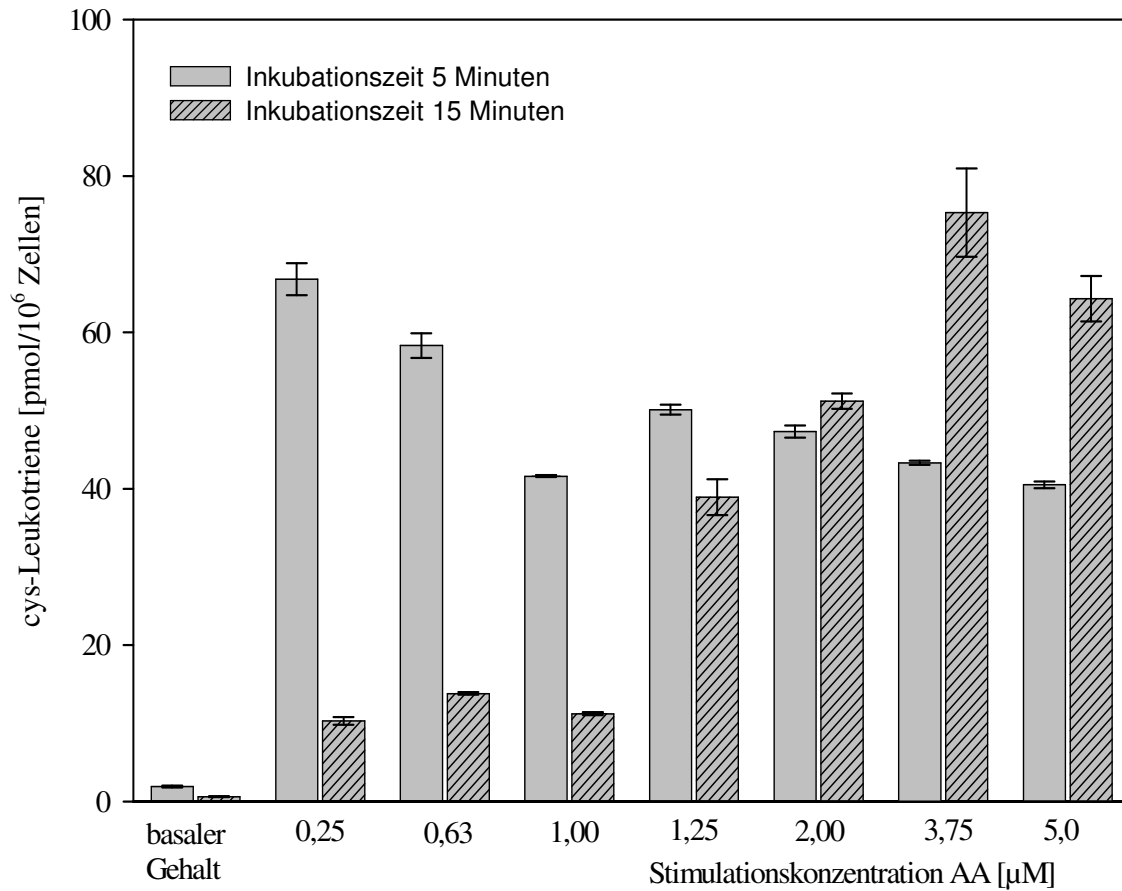


Abb.40: Abhängigkeit des Leukotrien-Gehaltes [pmol/ $10^6$  Zellen] von der Arachidonsäure-Konzentration in Anwesenheit von A23187 (1,2  $\mu\text{M}$ ) bei Inkubationszeiten von 5 und 15 Minuten ( $n = 6$ ;  $\bar{x} \pm \text{SE}$ )

Die Stimulation mit dem Calcium-Ionophor plus Arachidonsäure zeigte eine Abhängigkeit von Stimulationszeit und -konzentration. Bei fünfminütiger Inkubation nahm die Leukotrienmenge mit steigender Konzentration der zugegebenen Arachidonsäure ab. Der Leukotriengehalt war deutlich geringer als bei der alleinigen Stimulation mit A23187. Bei einer Inkubationszeit von 15 Minuten bildete sich bei der Zugabe von 3,75  $\mu\text{M}$  AA ein Maximum. Hier war der Leukotriengehalt bei alleiniger Stimulation mit A23187 wesentlich geringer.

### C.1.4.1.5 Bewertung der Stimulationsreagenzien

Die stimulierte Menge an Leukotrienen, angeregt durch

- ein spezifisches Allergen (Melittin)
- einen unspezifischen IgE-Antikörper
- das Calcium-Ionophor A23187 und
- eine Kombination von Calcium-Ionophor und Arachidonsäure,

ist konzentrations- und zeitabhängig.

Dabei führte die Stimulation mit dem Calcium-Ionophor bei 5-minütiger Stimulationszeit zur größten Cysteinyl-Leukotrienmenge. Das spezifische sowie das unspezifische Allergen bildeten deutlich weniger Leukotriene als das Calcium-Ionophor bzw. die Kombination Ionophor und Arachidonsäure.

Bei der klinischen Untersuchung wurde die Stimulation mit unspezifischem IgE-Antikörper und spezifischem Allergen (Melittin) auf Grund der zu geringen Stimulierbarkeit der Leukotrienmenge nicht weiter berücksichtigt.

Für die Stimulation mit Calcium-Ionophor wurde eine Konzentration von 1,2  $\mu\text{M}$  gewählt, da bei dieser Konzentration bei beiden Inkubationszeiten eine deutliche Erhöhung des Leukotriengehaltes zu beobachten war. Für die Stimulation mit A23187 in Kombination mit Arachidonsäure wurde aus den gleichen Überlegungen heraus eine Konzentration von 2,0  $\mu\text{M}$  AA und 1,2  $\mu\text{M}$  A23187 eingesetzt.

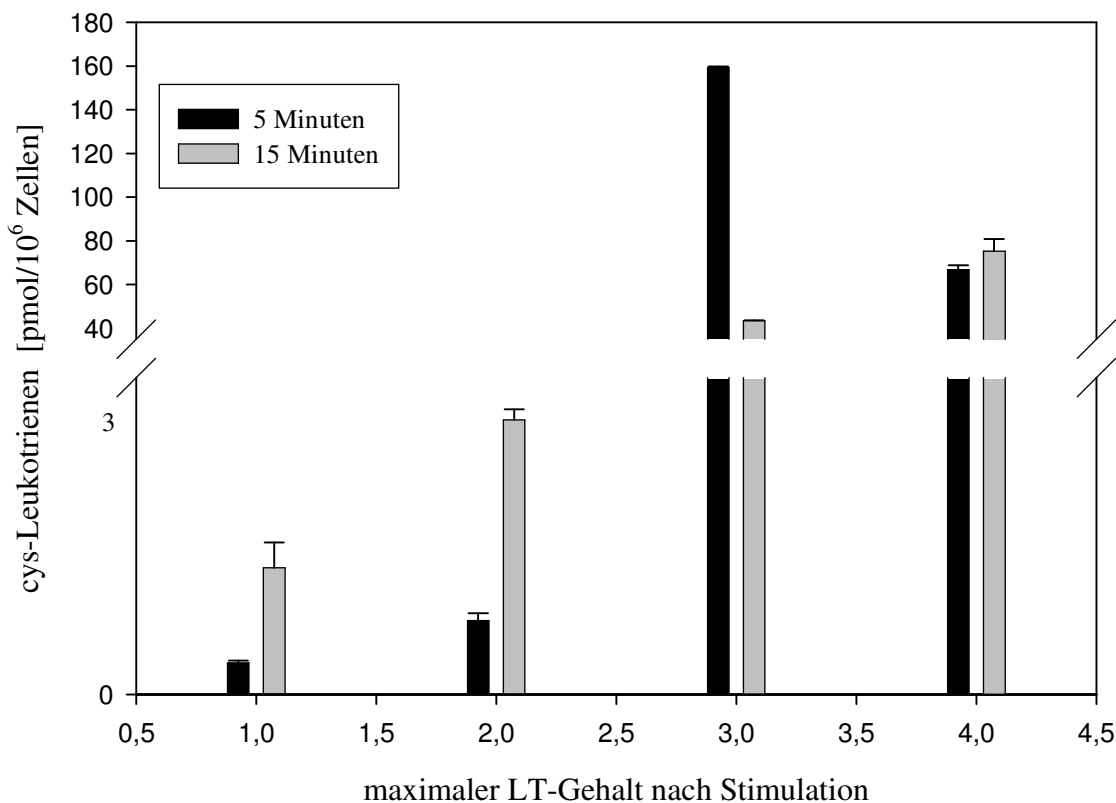


Abb. 41: Vergleich der Stimulationsreagenzien

#### C.1.4.2 Einfluss der Stimulationszeit

Die vorherigen Untersuchungen zeigten eine Zeitabhängigkeit der Stimulation. Bei den folgenden Untersuchungen wollten wir feststellen ob ein mathematischer Zusammenhang zwischen Stimulationszeit und gebildeter Leukotrienmenge besteht. Aus theoretischen Überlegungen könnte ein linearer Zusammenhang möglich sein. Die Zellsuspensionen wurden 5,0 bis 30,0 Minuten mit 1,2  $\mu\text{mol/l}$  A23187 inkubiert. Dieser Einfluss der Inkubationszeit wurde auch bei den Stimulationsversuchen mit 0,7  $\mu\text{M}$  Melittin, 0,4  $\mu\text{g/ml}$  IgE und 1,2  $\mu\text{M}$  A23187 plus 2,0  $\mu\text{M}$  Arachidonsäure untersucht. Als basaler Leukotriengehalt wurde hierbei derjenige

Gehalt angesehen, der in den Zellen zum Zeitpunkt Null Minuten ohne Zusatz von Reagenzien vorlag.

Bei den Stimulationsversuchen mit A23187 und der Kombination von A23187 und Arachidonsäure erhöhten sich die Werte ab einer Inkubationszeit von 5,0 Minuten signifikant. Bei der Stimulation mit Melittin erfolgte eine signifikante Erhöhung der Basalwerte ab einer Stimulationszeit von 7,5 Minuten. Bei der Stimulation mit Anti-IgE zeigten sich erst ab einer Stimulationszeit von 10,0 Minuten signifikant erhöhte Werte.

| Zeit [min] | 0,0 (basaler Wert) | 5,0                      | 7,5                      | 10,0                     | 12,5                     | 15,0                     | 20,0                     | 30,0                     |
|------------|--------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| A23        | 0,5 ± 0,15         | 74,5 ± 0,14<br>p < 0,001 | 33,4 ± 2,81<br>p < 0,01  | 47,3 ± 1,58<br>p < 0,001 | 52,9 ± 2,07<br>p < 0,001 | 52,3 ± 3,59<br>p < 0,001 | 68,2 ± 4,96<br>p < 0,001 | 34,0 ± 5,65<br>p < 0,01  |
| A23 AA     | 0,5 ± 0,07         | 58,5 ± 7,82<br>p < 0,01  | 63,8 ± 3,15<br>p < 0,001 | 42,8 ± 4,11<br>p < 0,01  | 55,2 ± 2,88<br>p < 0,001 | 56,3 ± 4,78<br>p < 0,01  | 64,8 ± 0,71<br>p < 0,001 | 57,3 ± 2,15<br>p < 0,001 |
| Melittin   | 0,5 ± 0,11         | 0,5 ± 0,40<br>n.s.       | 3,1 ± 0,36<br>p < 0,001  | 3,2 ± 0,75<br>p < 0,05   | 2,6 ± 0,31<br>p < 0,01   | 2,7 ± 0,45<br>p < 0,05   | 2,2 ± 0,35<br>p < 0,05   | 2,7 ± 0,34<br>p < 0,01   |
| anti-IgE   | 0,4 ± 0,11         | 0,4 ± 0,09<br>n.s.       | 0,6 ± 0,18<br>n.s.       | 0,8 ± 0,09<br>p < 0,05   | 0,7 ± 0,05<br>p < 0,05   | 0,8 ± 0,08<br>p < 0,05   | 0,9 ± 0,08<br>p < 0,05   | 1,1 ± 0,11<br>p < 0,05   |

Tab.12: Totaler Leukotriengehalt [pmol/10<sup>6</sup> Zellen] bei unterschiedlichen Stimulationsreagenzien und -zeiten (n = 6,  $\bar{x} \pm SE$ )

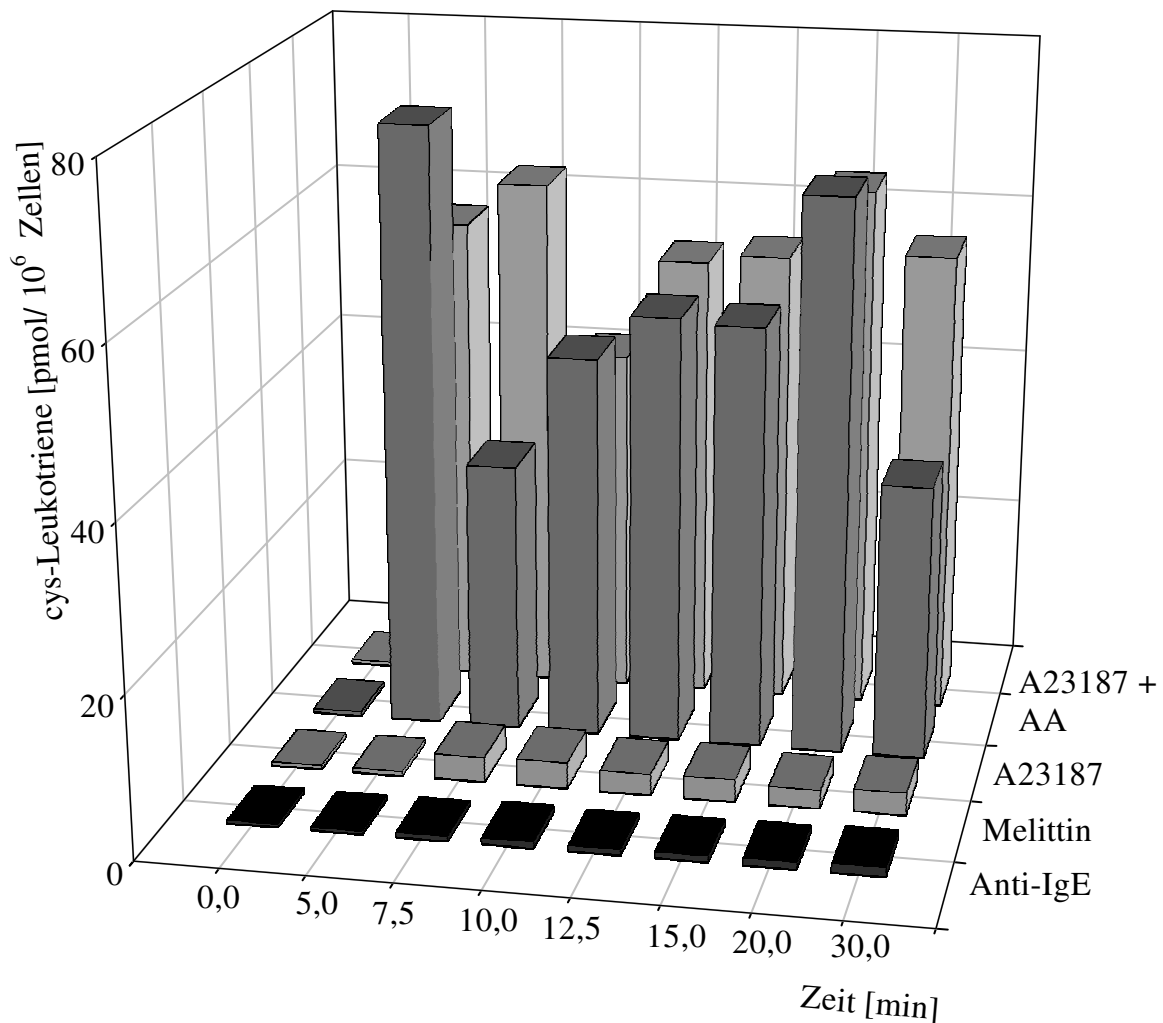


Abb.42: Vergleich des Leukotrien-Gehaltes [pmol/10<sup>6</sup> Zellen] der unterschiedlichen Stimulationsreagenzien bei unterschiedlichen Stimulationszeiten. Aus Übersichtsgründen wurde auf die Darstellung der Fehlerbalken verzichtet; vergleiche hierzu Tabelle 10 ( $n = 6$ ,  $\bar{x} \pm SE$ )

Bei Stimulationen mit Beteiligung des Calcium-Ionophors bildeten sich jeweils zwei Maxima aus; eines bei 5,0 bzw. 7,5 Minuten und eines bei 20,0 Minuten. Es ist deutlich erkennbar, dass bei der Zugabe von Melittin oder Anti-IgE ein Vielfaches weniger an Leukotrienen gebildet wurde als unter Zusatz von A23187.

Die theoretisch denkbare lineare Abhängigkeit der Leukotrienbildung von der Stimulationszeit konnte nicht festgestellt werden.

Für die klinischen Untersuchungen wurden die Stimulationszeiten fünf und 20 Minuten gewählt, da bei diesen Zeiten maximale Leukotrien-Konzentrationen bei der Stimulation mit A23187 und der Kombination A23187 und AA erreicht werden konnten.

### C.1.4.3 Einfluss der Zellzahl

Die Versuche der cAMP-Stimulierung wurden in unserem Arbeitskreis bisher mit einer Zellzahl von 5 bzw.  $6 \times 10^5$  Zellen/ml durchgeführt. Bei den Histaminfreisetzungsversuchen jedoch enthielt der Versuchsansatz  $2,5 \times 10^6$  Zellen/ml, dabei zeigte sich eine Abhängigkeit von der Zellzahl.

Um einen Einfluss der Zellzahl auf den Leukotrien-Gehalt zu untersuchen, wurde ein Stimulationsversuch mit fünf unterschiedlichen Zellkonzentrationen durchgeführt. Die Zellen wurden gemäß B.2.1.3.3 mit A23187 ( $1,2 \mu\text{M}$ ) fünf Minuten inkubiert. Es wurde erwartet, dass mit Erhöhung der Zellzahl auch die Menge an Leukotrienen ansteigt.

|  | $3,0 \times 10^6$<br>[Zellen/ml]<br>ohne Stimulation | $0,5 \times 10^6$<br>[Zellen/ml] | $3,0 \times 10^6$<br>[Zellen/ml] | $6,0 \times 10^6$<br>[Zellen/ml] | $9,0 \times 10^6$<br>[Zellen/ml] | $12,0 \times 10^6$<br>[Zellen/ml] |
|--|--|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|
| Cys-LT ohne Stimulationsreagenz                  | $0,1 \pm 0,02$<br>n.s.                               | $0,1 \pm 0,03$<br>n.s.           | $0,1 \pm 0,02$                   | $0,2 \pm 0,09$<br>n.s.           | $0,3 \pm 0,30$<br>n.s.           | $0,5 \pm 0,24$<br>n.s.            |
| Cys-LT stimuliert mit $1,2 \mu\text{M}$ A23187   | $0,2 \pm 0,36$<br>$p < 0,001$                        | $5,9 \pm 0,23$<br>$p < 0,001$    | $21,5 \pm 0,5$                   | $40,8 \pm 0,71$<br>$p < 0,01$    | $79,0 \pm 0,93$<br>$p < 0,001$   | $78,7 \pm 0,69$<br>$p < 0,001$    |
| Cys-LT stimuliert mit $0,7 \mu\text{M}$ Melittin | $0,1 \pm 0,01$<br>n.s.                               | $0,1 \pm 0,02$<br>n.s.           | $0,2 \pm 0,01$                   | $0,3 \pm 0,02$<br>$p < 0,05$     | $0,9 \pm 0,07$<br>$p < 0,01$     | $3,0 \pm 0,28$<br>$p < 0,01$      |

Tab.13: Einfluss der Zellzahl auf den LT-Gehalt [pmol/ $10^6$  Zellen] bei einer Stimulationszeit von fünf Minuten. Die Wahrscheinlichkeit bezieht sich jeweils auf  $3,0 \times 10^6$  Zellen/ml ( $n = 6$ ,  $\bar{x} \pm \text{SE}$ ).

Dabei stellte sich wie erwartet heraus, dass mit steigender Zellzahl im Bereich  $3 \times 10^6$  bis  $12 \times 10^6$  Zellen/ml, sofern mit A23187 stimuliert wurde, ein steigender Leukotriengehalt gemessen werden konnte. Bei  $9 \times 10^6$  Zellen/ml wurde ein Plateau erreicht.

Bei der Stimulation mit Melittin zeigte sich erst ab der Zellzahl  $6,0 \times 10^6$  Zellen/ml eine signifikante Erhöhung der Werte.

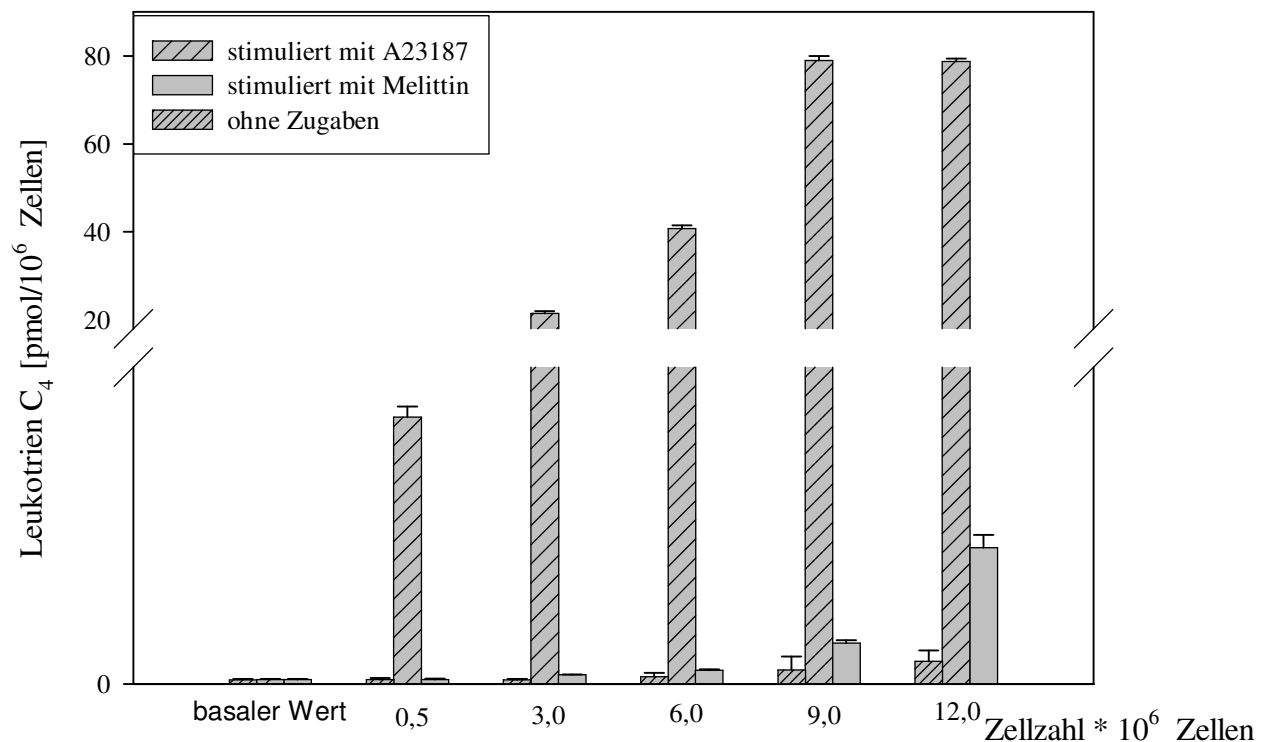


Abb.43: Abhängigkeit des Leukotrien-Gehaltes [pmol/10<sup>6</sup> Zellen] von der Zellzahl mit und ohne Stimulation ( $n = 6$ ,  $\bar{x} \pm SE$ ).

Bei der Stimulation mit A23187 reichte eine Zellzahl von  $3 \times 10^6$  Zellen/ml aus, um eine signifikante Erhöhung des Leukotrien-Gehaltes zu messen. Die optimale Zellzahl von  $9 \times 10^6$  Zellen/ml wurde für die weiteren Versuche nicht gewählt, da dafür ein zu großes Blutvolumen notwendig gewesen wäre.



### C.1.4.4 Einfluss des $\text{Ca}^{2+}$ -Gehaltes des Hank's-Puffers

Die Leukotrienuntersuchungen, die in der Literatur beschrieben sind, wurden mit unterschiedlichen Pufferlösungen durchgeführt, vor allem die Calciumkonzentration variierte stark. So ist aber anzunehmen, dass bei einer Stimulation mit A23187 der Gehalt der Calciumionen eine Rolle spielt. Um die Erkenntnisse dieser Studie mit den Ergebnissen anderer Messungen zu vergleichen, wurde eine Versuchsreihe durchgeführt, bei der mit gleicher Stimulationskonzentration und -reagenz, aber bei unterschiedlicher  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration gearbeitet wurde. Zur Einstellung der Zellzahl der Zellsuspension wurde der modifizierte Hank's-Puffer verwendet.

Die Messung wurde mit drei verschiedenen Puffern durchgeführt:

- modifizierter Hank's-Puffer (B.1.2.2) Calciumchlorid-Konzentration 244,1 mg/l (Puffer 0)
- modifizierter Hank's-Puffer mit der doppelten Konzentration des Calciumsalzes (Puffer 1)
- modifizierter Hank's-Puffer ohne Zusatz des Calciumsalzes (Puffer 2).

Stimuliert wurde jeweils mit 1,2  $\mu\text{M}$  A23187.

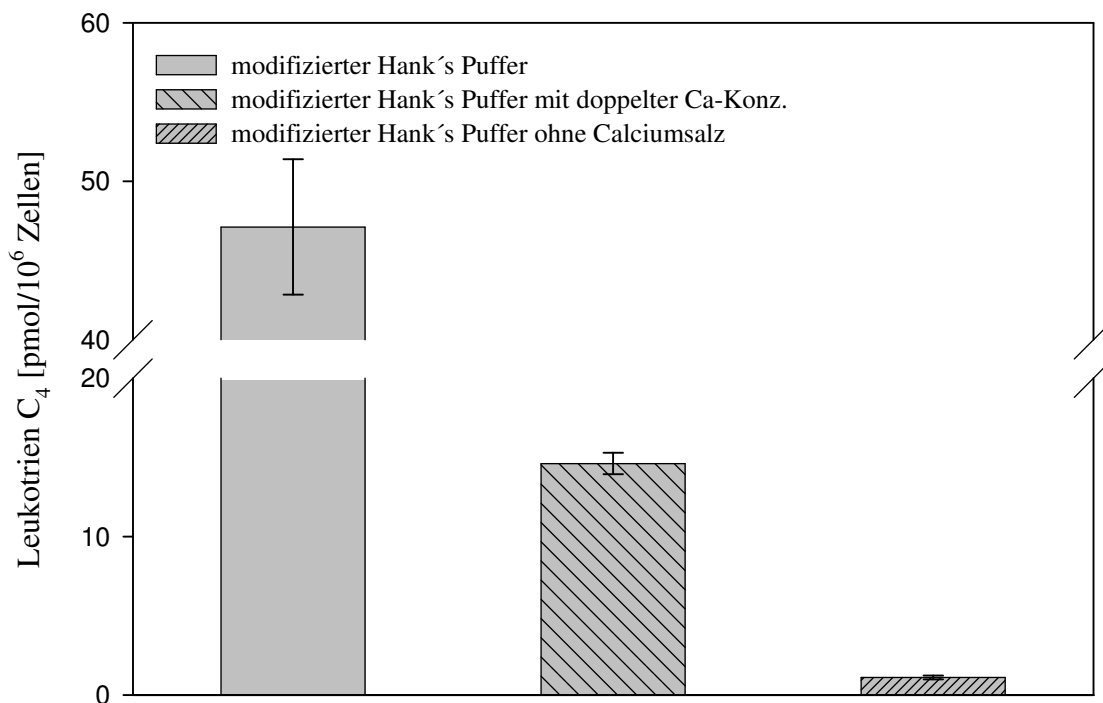


Abb.44: Abhängigkeit der gebildeten Leukotrienkonzentration [pmol/ $10^6$  Zellen] von der Calciumkonzentration des Puffers bei der Stimulation mit A23187 1,2  $\mu\text{M}$  ( $n = 6$ ;  $\bar{x} \pm \text{SE}$ )

Sowohl bei Puffer 1 als auch bei Puffer 2 zeigte sich eine signifikante Erniedrigung der Werte im Vergleich zu dem modifizierten Hank's Puffer. (Puffer 1 ( $14,6 \pm 0,48$  vs  $47,1 \pm 3,03$  pmol/ $10^6$  Zellen;  $p < 0,001$ ); Puffer 2 ( $1,1 \pm 0,08$  vs  $47,1 \pm 3,03$  pmol/ $10^6$  Zellen;  $p < 0,001$ ;  $n = 6$ ). Bei den basalen Werten traten keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf den Calciumgehalt des Puffers auf.

Für die klinischen Studien wurde mit dem modifizierten Hank's Puffer 0 ( $\text{CaCl}_2 = 244,1$  mg/ml) weiter gearbeitet, da mit diesem Puffer die höchste Leukotrienmenge erreicht werden konnte.

## C.2 Ergebnisse der klinischen Untersuchungen

Der Leukotriengehalt wurde für beide Versuchsgruppen (Atopiker- und Kontroll-Gruppe) sowohl in der **symptomarmen Zeit** „Winter“ (Versuchsreihe II), als auch in der **symptomreichen Zeit** „Sommer“ (Versuchsreihe I) gemessen.

### C.2.1 Basaler Leukotriengehalt

#### C.2.1.1 Vergleich Atopiker- und Kontroll-Gruppe

- Vergleich von Atopiker- zu Kontroll-Gruppe innerhalb des symptomarmen bzw. symptomreichen Zeitraums

Der basale Leukotriengehalt im **symptomarmen** Zeitraum (Winter) war bei den Atopikern gegenüber der Kontrollgruppe nicht erhöht ( $0,6 \pm 0,10$  vs  $0,8 \pm 0,13$  pmol/ $10^6$  Zellen; n.s.).

Im **symptomreichen** Zeitraum zeigte sich bei den Atopikern bezogen auf die Kontrolle eine signifikante Erhöhung ( $1,4 \pm 0,36$  vs  $0,4 \pm 0,17$  pmol/ $10^6$  Zellen;  $p < 0,05$ ).

Damit kam es zu einer deutlich gesteigerten Bildung der Cysteinyl-Leukotriene innerhalb der Atopiker-Gruppe gegenüber der Kontrollgruppe in der symptomreichen Zeit.

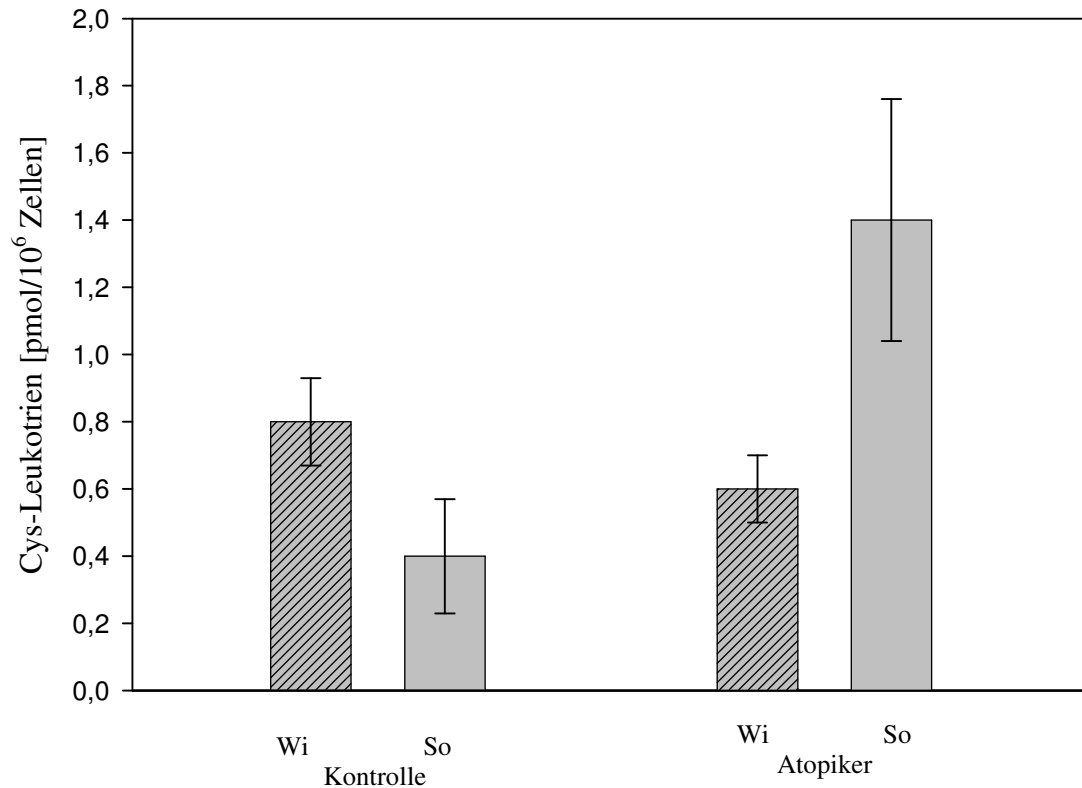


Abb.45: Mittelwerte der basalen Leukotrienmenge im Vergleich von Kontroll- und Atopiker-Gruppe in den jeweiligen Zeiträumen (Wi: „Winter“ bzw. symptomarmer Zeitraum; So: „Sommer“ bzw. symptomreicher Zeitraum) ( $\bar{x} \pm SE$ )

- **Vergleich von symptomarmem und symptomreichem Zeitraum innerhalb einer Gruppe (Atopiker/Kontrolle)**

Bei einem Vergleich der einzelnen Gruppen konnte bei der Kontrollgruppe bezogen auf die symptomarme Zeit kein Unterschied zur symptomreichen Zeit festgestellt werden ( $0,4 \pm 0,17$  vs  $0,8 \pm 0,13$  pmol/10<sup>6</sup> Zellen; n.s.). Die Atopiker-Gruppe zeigte hingegen eine signifikante Erniedrigung des Leukotrien-Gehaltes im symptomreichen verglichen mit dem symptomarmen Zeitraum ( $1,4 \pm 0,36$  vs  $0,6 \pm 0,10$  pmol/10<sup>6</sup> Zellen;  $p < 0,05$ ).

Dies lässt den Schluss zu, dass nur bei den Atopikern eine unterschiedliche Bildungsmenge zwischen symptomreichen und -armen Zeitraum auftritt.

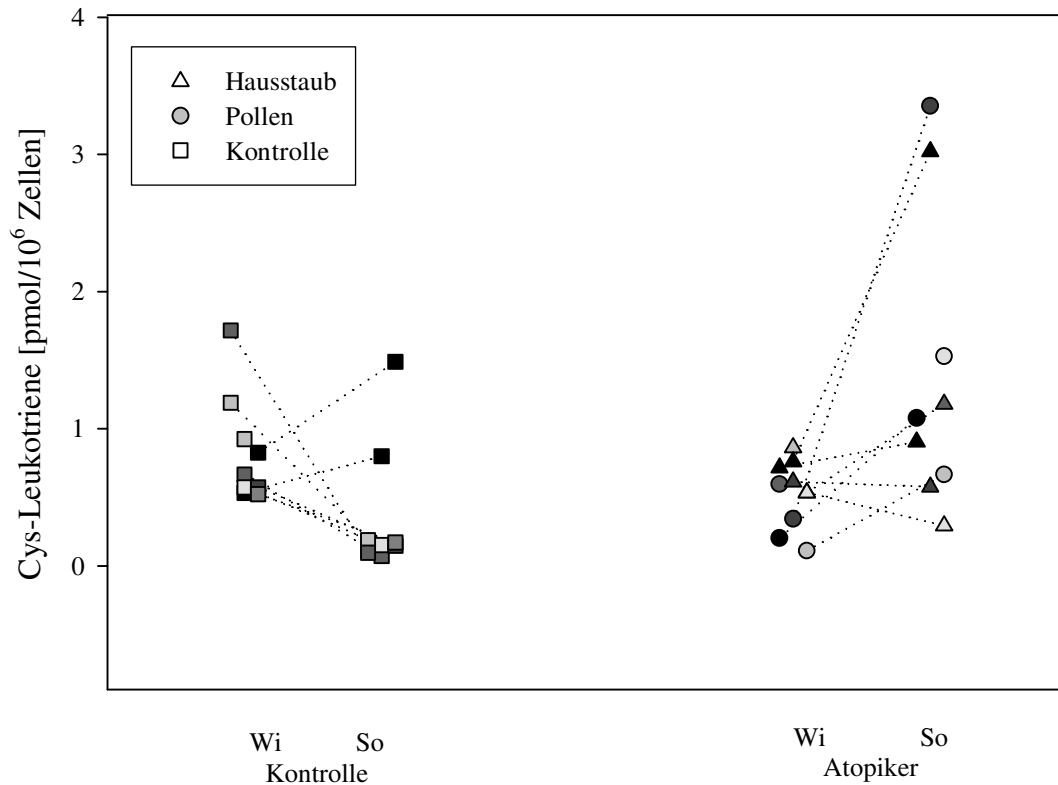


Abb.46: Einzelwerte der basalen Leukotrienmenge im Vergleich Kontroll- und Atopiker-Gruppe; die gestrichelte Linie ..... verbindet die einzelnen Personen (unterschiedliche Graustufen) der unterschiedlichen Versuchsreihen (Wi: „Winter“ bzw. symptomarmer Zeitraum; So: „Sommer“ bzw. symptomreicher Zeitraum)

Bei Betrachtung der Einzelwerte der Atopiker-Gruppe zeigten sich tendenziell unterschiedliche Werte bei Hausstaub- und Pollen-Atopikern. Für eine statistisch gesicherte Studie war die Anzahl  $n$  der einzelnen Atopiker-Gruppen (Hausstaub-Atopiker  $n = 5$ ; Pollen-Atopiker  $n = 4$ ) zu klein, aber es zeigte sich hierbei eine interessante Entwicklung der neu gebildeten bzw. freigesetzten Leukotriene.

### C.2.1.2 Vergleich der Atopikergruppen (Pollen/Hausstaub)

- Vergleich von Pollen- zu Hausstaub-Atopikern innerhalb des symptomarmen bzw. symptomreichen Zeitraums

Der **basale** Leukotriengehalt **in der symptomarmen Zeit Versuchsreihe I (Winter)** war im Gegensatz zur Gesamt-Gruppe der Atopiker bei den Pollen-Atopikern gegenüber der Kontrollgruppe statistisch signifikant erniedrigt ( $0,3 \pm 0,08$  vs  $0,8 \pm 0,13$  pmol/ $10^6$  Zellen;  $p < 0,05$ ). Bezogen auf die Kontrollgruppe zeigte sich hingegen bei den Hausstaub-Atopikern kein statistisch signifikanter Unterschied ( $0,7 \pm 0,05$  vs  $0,8 \pm 0,13$  pmol/ $10^6$  Zellen; n.s.).

Bei den beiden Atopikergruppen „Pollen“ und „Hausstaub“ war der Leukotriengehalt statistisch signifikant erhöht ( $0,7 \pm 0,05$  vs  $0,3 \pm 0,08$  pmol/ $10^6$  Zellen;  $p < 0,01$ ).

Der **basale** Leukotriengehalt **in der symptomreichen Zeit Versuchsreihe II (Sommer)** ergab für die Pollen-Atopiker gegenüber der Kontrollgruppe eine signifikante Erhöhung ( $1,7 \pm 0,53$  vs  $0,4 \pm 0,17$  pmol/ $10^6$  Zellen;  $p < 0,05$ ). Bezogen auf die Kontrollgruppe zeigte sich im Gegensatz zur Gesamt-Atopiker-Gruppe bei den Hausstaub-Atopikern kein signifikanter Unterschied ( $1,2 \pm 0,44$  vs  $0,4 \pm 0,17$  pmol/ $10^6$  Zellen; n.s.). Auch zwischen den beiden Atopiker-Gruppen „Pollen“ und „Hausstaub“ kam es zu keinem signifikanten Unterschied ( $1,7 \pm 0,53$  vs  $1,2 \pm 0,44$  pmol/ $10^6$  Zellen; n.s.).

Weder in der symptomarmen noch in der symptomreichen Zeit zeigte sich ein Unterschied zwischen den Hausstaub-Atopikern und der Kontrollgruppe. Bei den Pollen-Atopikern konnten immer unterschiedliche Werte zur Kontrollgruppe gezeigt werden. Wie zu erwarten war, zeigte sich keine Differenz in der symptomreichen Zeit zwischen den beiden Atopiker-Gruppen.

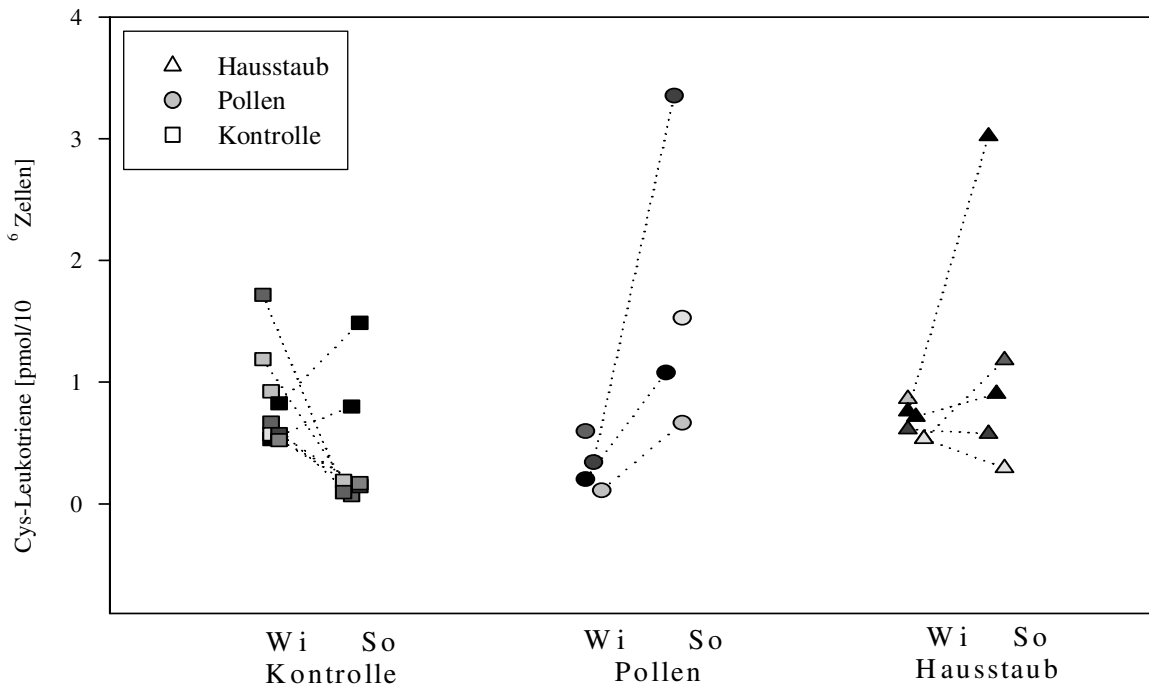


Abb.47: Einzelwerte der basalen Leukotrienmenge bei dem Vergleich der Kontroll-, Pollen- und Hausstaub-Gruppe; die gestrichelte Linie ..... verbindet die einzelnen Personen (verschiedene Graustufen), die sowohl an der Versuchsreihe I als auch an der Versuchsreihe II teilgenommen haben. (Wi: „Winter“ bzw. symptomarmer Zeitraum; So: „Sommer“ bzw. symptomreicher Zeitraum)

Bei den Atopikergruppen konnte während der symptomreichen Zeit („Sommer“) überwiegend eine Steigerung des gemessenen Leukotrien-Gehaltes beobachtet werden, wohingegen bei der Kontrollgruppe eine Erniedrigung stattfand.

- **Vergleich von symptomarmem mit symptomreichem Zeitraum innerhalb der Pollen- und Hausstaub-Gruppe**

Bei den Pollen-Atopikern kam es zu einer signifikanten Erhöhung zwischen Winter- und Sommer-Gehalt ( $0,3 \pm 0,08$  vs  $1,7 \pm 0,53$  pmol/10<sup>6</sup> Zellen;  $p < 0,05$ ). Bei den Hausstaub-

---

Atopikern lag auch ein erhöhter Leukotriengehalt vor, dieser stellte jedoch keinen signifikanten Unterschied dar ( $0,7 \pm 0,05$  vs  $1,2 \pm 0,44$  pmol/ $10^6$  Zellen; n.s.). Die Kontrollgruppe zeigte keine Änderung ( $0,8 \pm 0,13$  vs  $0,4 \pm 0,17$  pmol/ $10^6$  Zellen; n.s.).

Die größte Menge an basalen Leukotrienen bildete die Gruppe der Pollenatopiker innerhalb des symptomreichen Zeitraums.

Bei den Atopikern zeigte sich vorwiegend eine Steigerung des basalen Leukotrien-Gehaltes während der symptomreichen Zeit („Sommer“, Versuchsreihe II). Im Gegensatz dazu ergab sich bei der Kontrollgruppe kein Unterschied.

## **C.2.2 Einfluss der atopischen Erkrankung auf den Leukotriengehalt nach Stimulation**

### **C.2.2.1 Stimulation mit 1,2 $\mu$ M A23187 und 5 Minuten Inkubation**

#### **C.2.2.1.1 Vergleich Atopiker- und Kontroll-Gruppe**

- Vergleich von Atopiker- zu Kontroll-Gruppe innerhalb des symptomarmen bzw. symptomreichen Zeitraums

Innerhalb des **symptomarmen** Zeitraumes zeigte sich zwischen den Gruppen der Atopiker bezogen auf die Kontrollgruppe kein signifikanter Unterschied in der Stimulierbarkeit. ( $80,3 \pm 23,50$  vs  $32,7 \pm 8,01$  %; n.s.).

Die gleiche Messung durchgeführt im **symptomreichen** Zeitraum zeigte einen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen. ( $45,7 \pm 11,86$  vs  $214,1 \pm 20,8$  %;  $p < 0,05$ ).



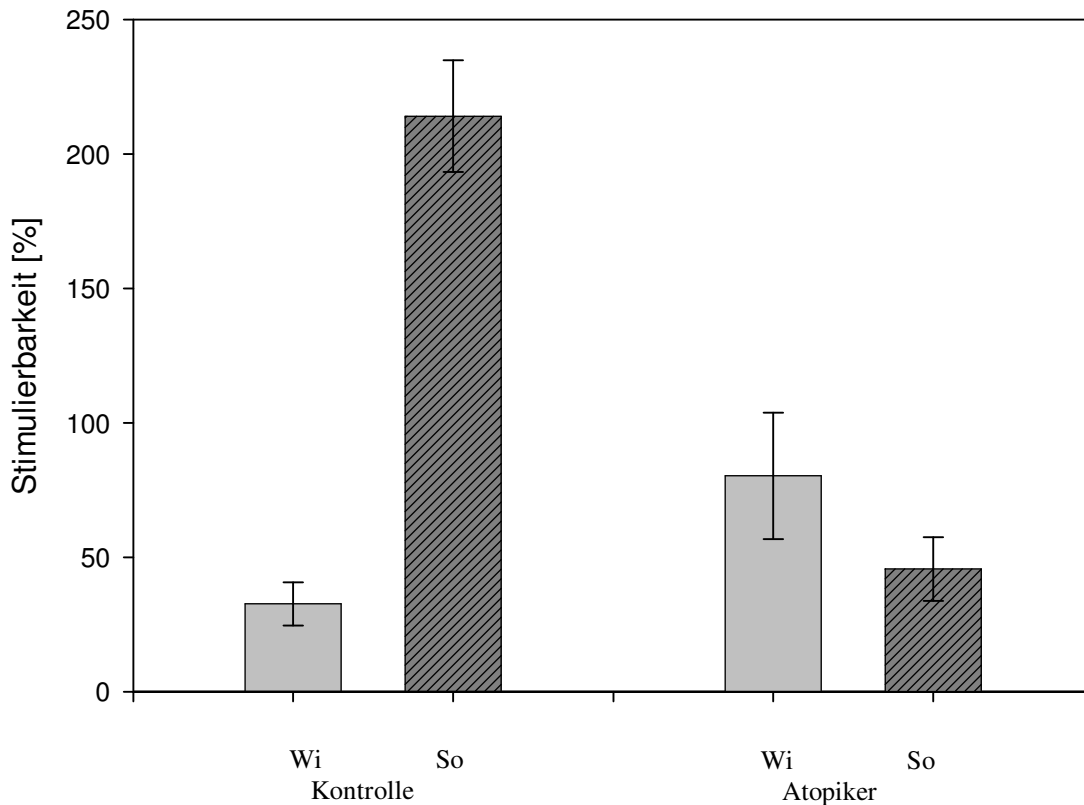


Abb.48: Mittelwerte der Stimulierbarkeit (1,2  $\mu$ M A23187, 5 Minuten) im Vergleich von Kontroll- und Atopiker-Gruppe in den jeweiligen Zeiträumen (Wi: „Winter“ bzw. symptomarmer Zeitraum; So: „Sommer“ bzw. symptomreicher Zeitraum) ( $\bar{x} \pm SE$ )

- **Vergleich von symptomarmem mit symptomreichem Zeitraum innerhalb einer Gruppe (Atopiker/Kontrolle)**

Bei einem Vergleich der einzelnen Gruppen bezogen auf die unterschiedlichen Zeiträume („Winter“ versus „Sommer“) konnte bei der Kontrollgruppe eine signifikante Erhöhung festgestellt werden (32,7  $\pm$  8,1 vs 214,1  $\pm$  20,8 %;  $p < 0,001$ ). Die Atopiker-Gruppe zeigte eine Erniedrigung der Stimulierbarkeit, wobei diese nicht signifikant war (80,3  $\pm$  23,5 vs 45,7  $\pm$  11,86 %; n.s.).

---

Die Atopiker-Gruppe wurde wieder in Pollen- und Hausstaub-Atopiker unterteilt, um zu überprüfen, ob auch hier ein Trend zu erkennen sei, wie schon bei der Messung des basalen Leukotriengehaltes.

#### **C.2.2.1.2 Vergleich der Atopikergruppen (Pollen/Hausstaub)**

- **Vergleich von Pollen- zu Hausstaub-Atopikern innerhalb des symptomarmen bzw. symptomreichen Zeitraums**

Hier zeigte sich bei der Stimulation mit A23187 (1,2  $\mu$ M) und 5-minütiger Inkubation kein signifikanter Unterschied bei den Hausstaub-Atopikern (Hausstaub:  $32,9 \pm 6,36$  vs  $32,7 \pm 8,1$  %; n.s.) **in der symptomarmen Zeit Versuchsreihe I (Winter)**. Im Vergleich der Gruppe der Atopiker mit der Kontrollgruppe war ein signifikanter Unterschied festzustellen (Pollen:  $139,6 \pm 35,23$  vs  $32,7 \pm 8,1$  %,  $p < 0,001$ ), sowie für den Vergleich der beiden Atopikergruppen (Pollen vs Hausstaub) miteinander ( $139,6 \pm 35,23$  vs  $32,9 \pm 6,36$  %;  $p < 0,05$ ).

**In der symptomreichen Zeit Versuchsreihe II (Sommer)** zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Atopikergruppen bezogen auf die Kontrollgruppe (Pollen:  $54,9 \pm 19,35$  vs  $214,1 \pm 20,8$  %,  $p < 0,001$ .; Hausstaub:  $36,5 \pm 13,09$  vs  $214,1 \pm 20,8$  %;  $p < 0,001$ ), bei dem Vergleich der beiden Atopikergruppen nicht (Pollen vs Hausstaub) ( $54,9 \pm 19,35$  vs  $36,5 \pm 13,09$  %; n.s.).

Betrachtet man die Stimulierbarkeit, so lässt sich bei den Pollen-Atopikern im Vergleich zu den beiden anderen Gruppen in der symptomarmen Zeit ein deutlich erhöhter Wert feststellen. Im der symptomreichen Zeit zeigt die Kontrollgruppe gegenüber den Atopikergruppen eine deutliche Erhöhung.

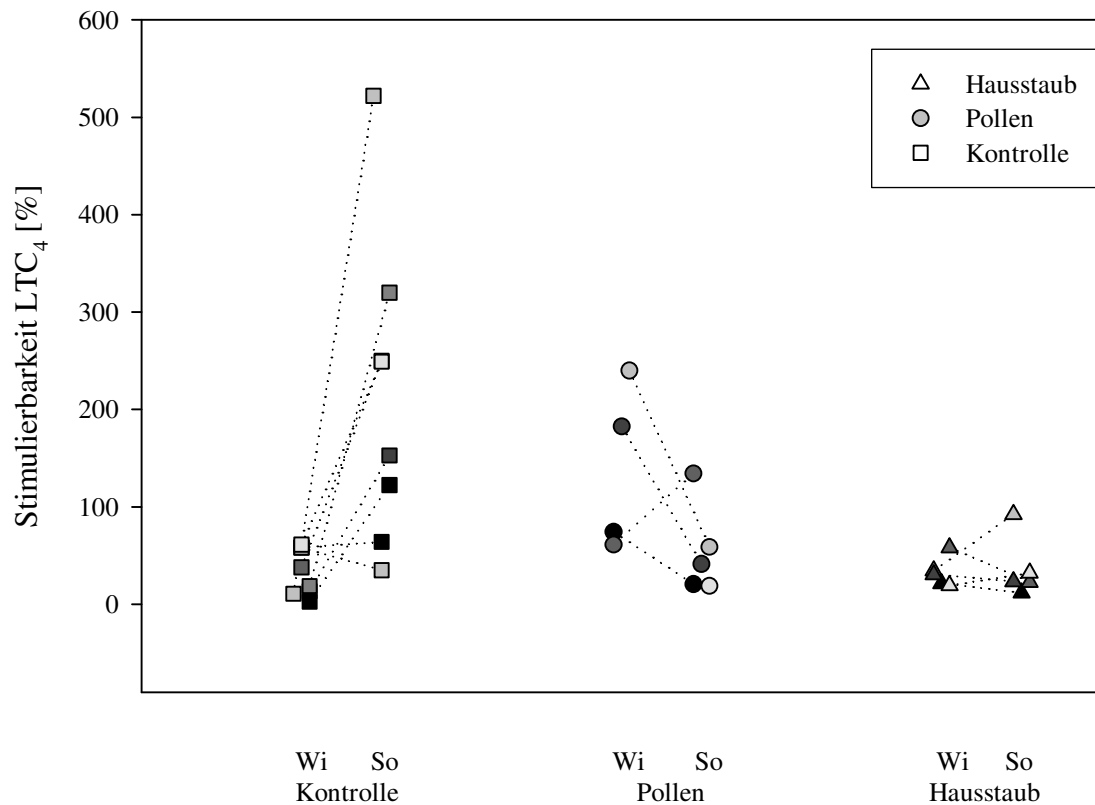


Abb.49: Einzelwerte der Leukotrien-Stimulierbarkeit [%] nach Stimulation mit A23187 1,2  $\mu$ M für 5 Minuten. Vergleich von Kontroll-, Pollenatopiker- und Hausstaubatopiker-Gruppe. Die gestrichelten Linie ..... verbindet die einzelnen Personen (verschiedene Graustufen), die sowohl an der Versuchsreihe I als auch an der Versuchsreihe II teilgenommen haben (Wi: „Winter“ bzw. symptomarmer Zeitraum; So: „Sommer“ bzw. symptomreicher Zeitraum)

Bei Betrachtung der Einzelwerte des Leukotrien-Gehaltes [pmol/ $10^6$  Zellen] kann man tendenziell eine Steigerung bei der Kontrollgruppe während der symptomreichen Zeit beobach-

ten, bei den Pollenatopikern kommt es überwiegend zu einer Erniedrigung in diesem Zeitraum und bei den Hausstaubatopikern sind lediglich geringe Änderungen beobachtbar.

- Vergleich von symptomarmem mit symptomreichem Zeitraum innerhalb einer Gruppe

|                    | Winter vs Sommer [%]          |           |
|--------------------|-------------------------------|-----------|
| Pollen-Atopiker    | 139,6 ± 35,23 vs 54,9 ± 19,35 | n.s.      |
| Hausstaub-Atopiker | 32,9 ± 6,36 vs 36,6 ± 13,09   | n.s.      |
| Kontrolle          | 32,7 ± 8,1 vs 214,1 ± 20,8    | p < 0,001 |
| Atopiker (gesamt)  | 80,3 ± 23,5 vs 45,7 ± 11,86   | n.s.      |

Tab.14: Leukotrien-Werte des Sommer-/Winter-Vergleiches nach einer Stimulation mit 1,2 µM A23187 und 5 Minuten ( $\bar{x} \pm SE$ ).

Einzig bei der Kontrollgruppe zeigte sich eine signifikante Erhöhung der Stimulierbarkeit in der symptomarmen Zeit (p < 0,05). Bei den Atopikergruppen kam es bezogen auf die beiden Versuchsreihen zu keinen signifikanten Unterschieden.

### C.2.2.2 Stimulation mit 1,2 µM A23187 und 20 Minuten Inkubation

#### C.2.2.2.1 Vergleich Atopiker- und Kontrollgruppe

- Vergleich von Atopiker- mit Kontrollgruppe innerhalb des symptomarmen bzw. symptomreichen Zeitraums

Innerhalb des **symptomarmen** Zeitraumes zeigte sich zwischen der Gruppe der Atopiker bezogen auf die Kontrollgruppe kein signifikanter Unterschied bei der Stimulierbarkeit. (Atopiker: 76,9 ± 11,58 vs 42,8 ± 14,2 %; n.s.).

Die gleiche Messung durchgeführt im **symptomreichen** Zeitraum zeigte hingegen einen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen. (Atopiker:  $50,1 \pm 3,51$  vs  $315,2 \pm 25,1$  %;  $p < 0,001$ ).

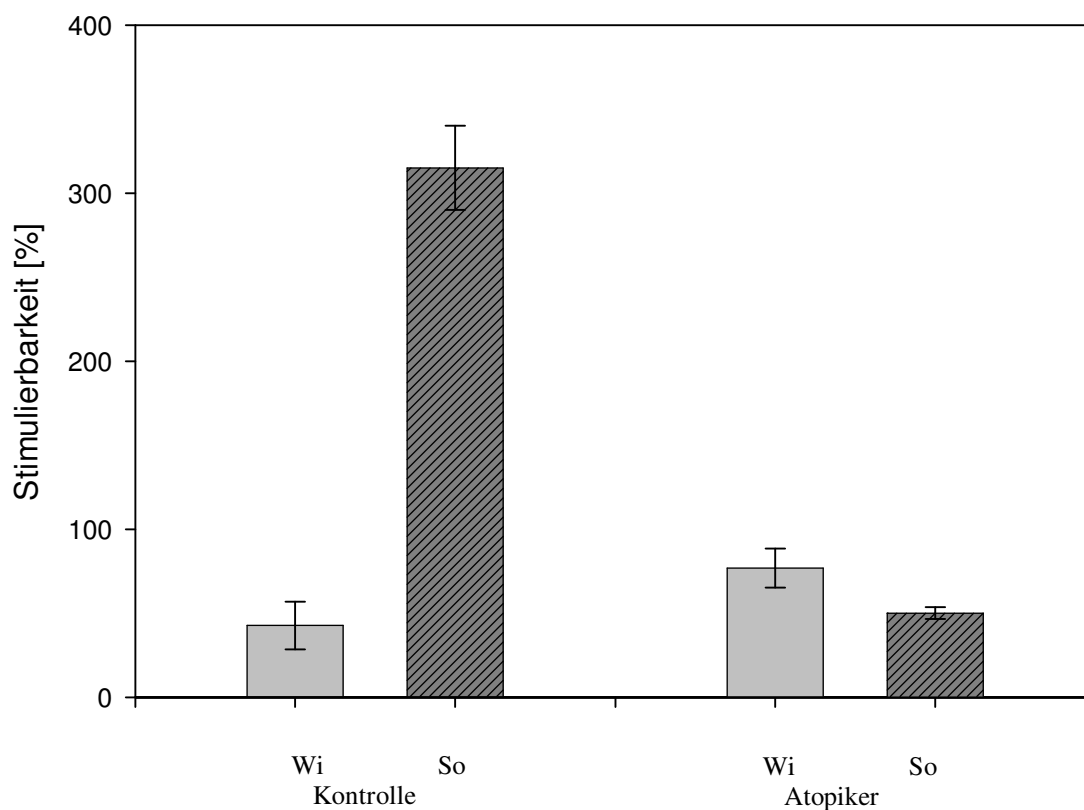


Abb.50: Mittelwerte Stimulierbarkeit (1,2  $\mu$ M A23187, 20 Minuten) im Vergleich von Kontroll- und Atopikergruppe in den jeweiligen Zeiträumen (Wi: „Winter“ bzw. symptomarmer Zeitraum; So: „Sommer“ bzw. symptomreicher Zeitraum) ( $\bar{x} \pm SE$ )

- Vergleich von symptomarmem mit symptomreichem Zeitraum innerhalb einer Gruppe (Atopiker/Kontrolle)

Bei einem Vergleich der einzelnen Gruppen bezogen auf die unterschiedlichen Zeiträume konnte bei der Kontrollgruppe ( $42,8 \pm 14,2$  vs  $315,2 \pm 25,1$  %;  $p < 0,001$ ) ein signifikanter Unterschied festgestellt werden, bei der Atopiker-Gruppe hingegen war dies nicht möglich, hier wurde lediglich eine tendenzielle Abnahme der Stimulierbarkeit in der symptomreichen Zeit nachgewiesen ( $76,9 \pm 11,58$  vs  $50,1 \pm 3,51$  %; n.s.).

Zur Überprüfung eines Trends wurde die Atopiker-Gruppe wieder in Pollen- und Hausstaub-Atopiker unterteilt, dies geschah parallel zu den Messungen des basalen Leukotriengehaltes.

#### **C.2.2.2.2 Vergleich der Atopikergruppen (Pollen/Hausstaub)**

- **Vergleich von Pollen- zu Hausstaub-Atopikern innerhalb des symptomarmen bzw. symptomreichen Zeitraums**

Bei der Stimulation mit A23187 ( $1,2 \mu\text{M}$ ) für eine Dauer von 20 Minuten ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen **in der symptomarmen Zeit Versuchsreihe I („Winter“)**. Dies galt sowohl für den Vergleich der Atopikergruppen mit der Kontrollgruppe (Pollen:  $128,4 \pm 53,67$  vs  $42,8 \pm 14,2$  %, n.s.; Hausstaub:  $35,7 \pm 10,84$  vs  $42,8 \pm 14,2$  %; n.s.) als auch für den Vergleich der beiden Atopikergruppen miteinander ( $128,4 \pm 53,67$  vs  $35,7 \pm 10,84$  %; n.s.).

In der **symptomreichen Zeit Versuchsreihe II („Sommer“)** ergaben sich signifikante Unterschiede zwischen den Atopikergruppen und der Kontrollgruppe. (Pollen:  $68,2 \pm 21,46$  vs  $315,21 \pm 25,1$  %,  $p < 0,001$ ; Hausstaub:  $35,6 \pm 4,89$  vs  $315,21 \pm 25,1$  %;  $p < 0,001$ ). Beim Vergleich der beiden Atopikergruppen miteinander konnte nur ein erhöhter Wert der Pollen-Gruppe gegenüber der Hausstaub-Gruppe beobachtet werden ( $68,2 \pm 21,46$  vs  $35,6 \pm 4,89$  %; n.s.).

In der Gruppe der Pollen-Atopiker fällt die deutliche Erhöhung der Stimulierbarkeit in der symptomarmen Zeit auf, in der symptomreichen Zeit hingegen kommt es zu einer deutlichen Erhöhung der Stimulierbarkeit innerhalb der Kontrollgruppe.

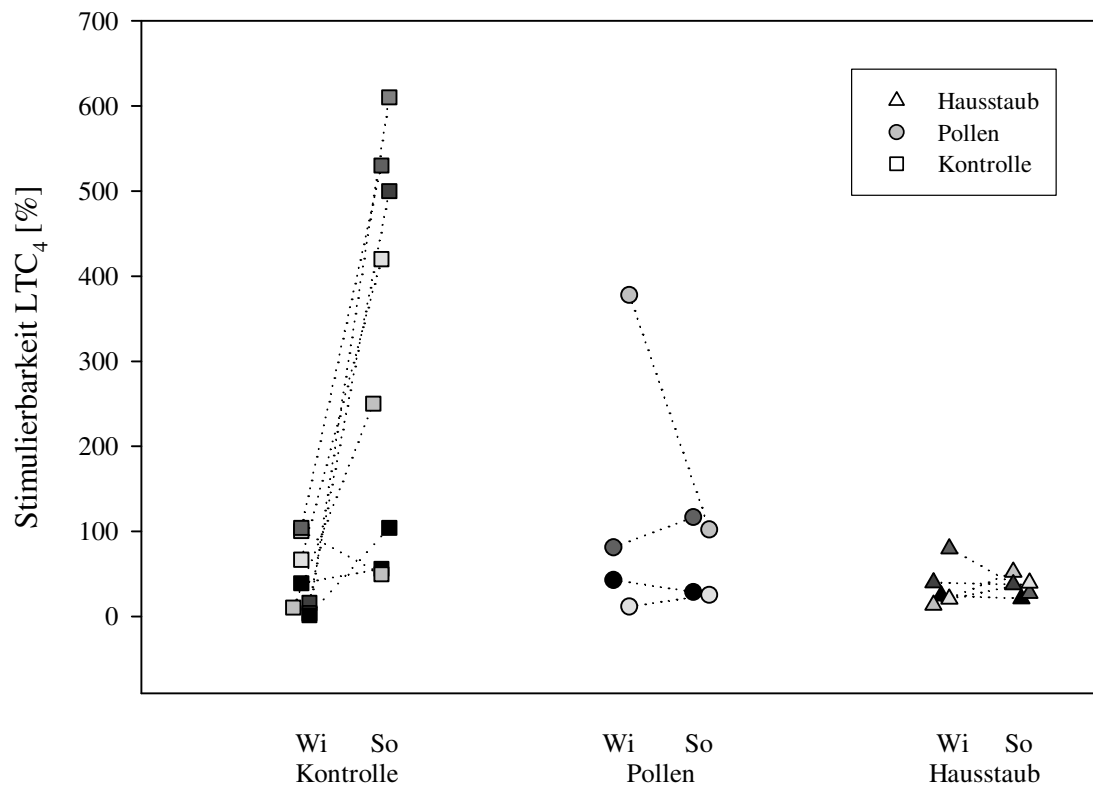


Abb.51: Einzelwerte der Leukotrien-Stimulierbarkeit [%] nach Stimulation mit A23187 1,2  $\mu$ M für 20 Minuten. Vergleich von Kontroll-, Pollenatopiker- und Hausstaubatopikergruppe. Die gestrichelte Linie ..... verbindet die einzelnen Personen (verschiedene Graustufen), die sowohl an der Versuchsreihe I als auch an der Versuchsreihe II teilgenommen haben (Wi: „Winter“ bzw. symptomarmer Zeitraum; So: „Sommer“ bzw. symptomreicher Zeitraum)

Betrachtet man die Einzelwerte, so zeigt sich bei der Atopikergruppe eine geringfügige Änderung im Vergleich zur Kontrollgruppe, es kommt zu einer deutlichen Steigerung im symptomatischen Zeitraum.

- Vergleich von symptomarmem mit symptomreichem Zeitraum innerhalb einer Gruppe

|                   | Winter vs Sommer [%]           |           |
|-------------------|--------------------------------|-----------|
| Pollenatopiker    | 128,4 ± 53,67 vs 68,17 ± 21,46 | n.s.      |
| Hausstaubatopiker | 35,6 ± 10,84 vs 35,6 ± 4,89    | n.s.      |
| Kontrolle         | 42,8 ± 14,2 vs 315,2 ± 25,1    | p < 0,001 |
| Atopiker (gesamt) | 76,9 ± 11,58 vs 50,1 ± 3,51    | n.s.      |

Tab.15: Stimulierbarkeit des Sommer-/Winter-Vergleiches nach einer Stimulation mit 1,2 µM A23187 und 20 Minuten Inkubation ( $\bar{x} \pm SE$ ).

Einzig bei der Kontrollgruppe zeigt sich eine signifikante Erniedrigung der Leukotrienmenge in der symptomarmen Zeit ( $p < 0,001$ ). Bei den Atopikergruppen wurden bezogen auf die beiden Versuchsreihen keine signifikanten Unterschiede beobachtet.

Die Wertung der vorgestellten Ergebnisse lässt den Schluss zu, dass die Phospholipase A<sub>2</sub> bei den Atopikern keinen jahreszeitlich bedingten Schwankungen unterliegt.



### **C.2.2.3 Stimulation mit 1,2 $\mu$ M A23187 + 0,2 $\mu$ M AA und 5 Minuten Inkubation**

Nachdem bei der Phospholipase A<sub>2</sub> keine Abhängigkeit von der Jahreszeit festgestellt werden konnte, wurde anschließend die Stimulierbarkeit der Lipoxygenase überprüft. Zu diesem Zweck wurden der Zellsuspension der Chromophor A23187, sowie Arachidonsäure zugesetzt.

#### **C.2.2.3.1 Vergleich Atopiker- und Kontrollgruppe**

- **Vergleich von Atopiker- mit Kontrollgruppe innerhalb des symptomarmen bzw. symptomreichen Zeitraumes**

Bei der Stimulation, die innerhalb des **symptomarmen** Zeitraumes durchgeführt wurde, zeigte sich zwischen der Gruppe der Atopiker bezogen auf die Kontrollgruppe kein signifikanter Unterschied in der Stimulierbarkeit. ( $85,3 \pm 6,03$  vs  $44,8 \pm 21,8$  %; n.s.).

Die gleiche Messung durchgeführt im **symptomreichen** Zeitraum zeigte bei den Atopikern bezogen auf die Kontrolle eine signifikante Erhöhung ( $114,1 \pm 13,57$  vs  $280,1 \pm 22,44$  %;  $p < 0,001$ ).

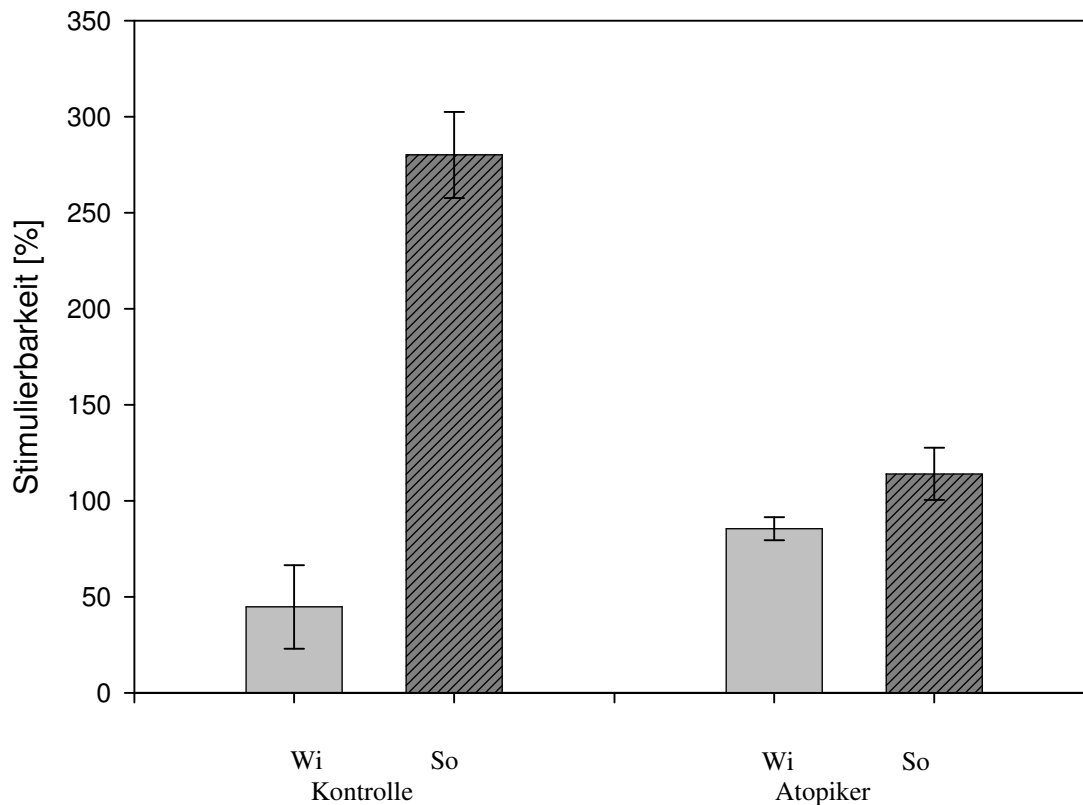


Abb.52: Mittelwerte der Stimulierbarkeit (1,2  $\mu$ M A23187, 0,2  $\mu$ M AA, 5 Minuten) von Kontroll- und Atopikergruppe in den jeweiligen Zeiträumen im Vergleich (Wi: „Winter“ bzw. symptomarmer Zeitraum; So: „Sommer“ bzw. symptomreicher Zeitraum) ( $\bar{x} \pm SE$ )

- Vergleich von symptomarmem mit symptomreichem Zeitraum innerhalb einer Gruppe (Atopiker/Kontrolle)

Bei einem Vergleich der einzelnen Gruppen bezogen auf die unterschiedlichen Zeiträume konnte bei der Kontrollgruppe eine signifikante Erhöhung in der Stimulierbarkeit in der symptomreichen Zeit festgestellt werden ( $44,8 \pm 21,80$  vs  $280,1 \pm 22,4$  %;  $p < 0,001$ ). Die Atopiker-Gruppe zeigte ebenfalls eine signifikante Erhöhung in der symptomreichen Zeit verglichen mit der symptomarmen Zeit ( $85,3 \pm 6,03$  vs  $114,0 \pm 13,57$  %;  $p < 0,1$ ).

Zur Überprüfung eines Trends wurde die Atopikergruppe wieder in Pollen- und Hausstaubatopiker unterteilt, parallel zu den Messungen des basalen Leukotriengehaltes.

#### **C.2.2.3.2 Vergleich der Atopikergruppen (Pollen/Hausstaub)**

- **Vergleich von Pollen- zu Hausstaubatopikern innerhalb des symptomarmen bzw. symptomreichen Zeitraums.**

Hier zeigte sich bei der Stimulation mit A23187 und AA **in der symptomarmen Zeit Versuchsreihe I (Winter)** kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen. Dies gilt sowohl für den Vergleich der Atopiker- mit der Kontrollgruppe (Pollen:  $91,7 \pm 8,58$  vs  $44,81 \pm 21,8$  %, n.s.; Hausstaub:  $92,4 \pm 18,78$  vs  $44,81 \pm 21,8$  %; n.s.) als auch für den Vergleich der beiden Atopikergruppen (Pollen vs Hausstaub) miteinander ( $91,7 \pm 8,58$  vs  $92,4 \pm 18,78$  % ; n.s.).

**In der symptomreichen Zeit Versuchsreihe II (Sommer)** kam es ebenfalls zu keinen signifikanten Unterschieden zwischen den Atopikergruppen ( $70,7 \pm 6,71$  vs  $148,72 \pm 13,57$  %; n.s.), jedoch zu einer signifikanten Erhöhung der Konzentrationen bei den Atopikergruppen bezogen auf die der Kontrollgruppe (Pollen  $70,7 \pm 6,71$  vs  $280,1 \pm 22,4$  %,  $p < 0,001$ ; Hausstaub:  $148,72 \pm 13,57$  vs  $280,1 \pm 22,4$  %;  $p < 0,05$ ).

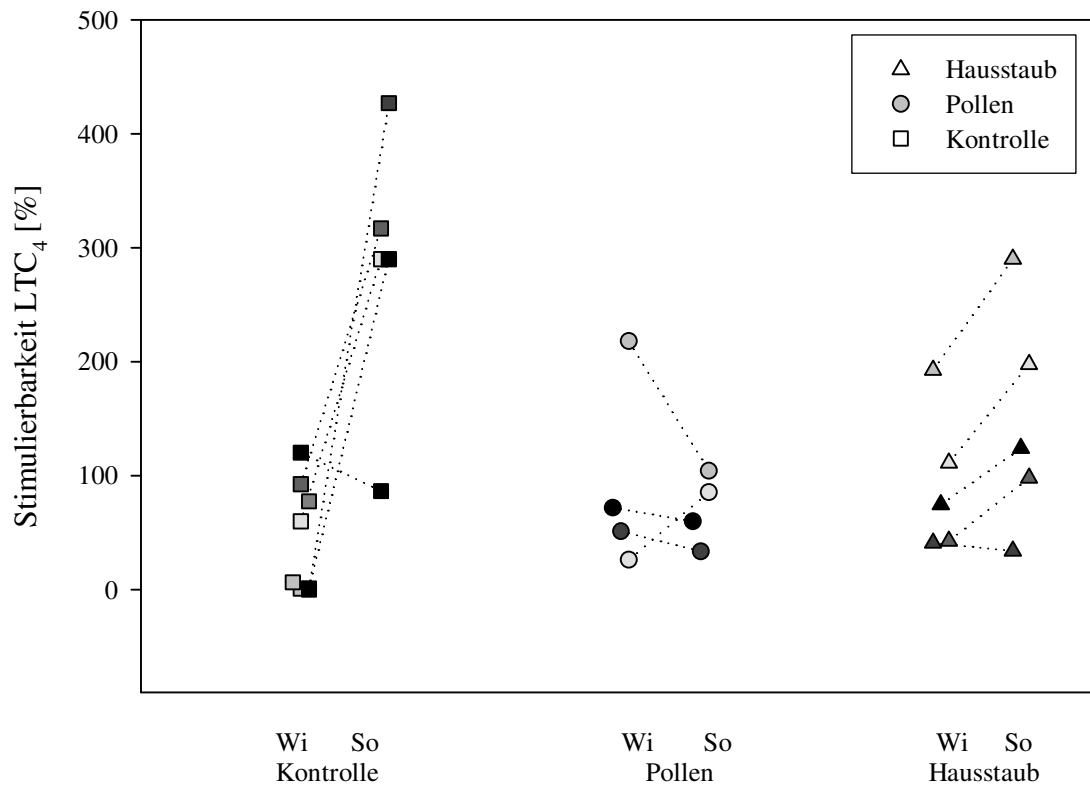


Abb.53: Einzelwerte der Leukotrien-Stimulierbarkeit [%] nach Stimulation mit A23187 1,2  $\mu\text{M}$  und 0,2  $\mu\text{M}$  Arachidonsäure für 5 Minuten. Vergleich von Kontroll-, Pollenatopiker- und Hausstaubatopikergruppe. Die gestrichelte Linie ..... verbindet die einzelnen Personen (verschiedene Graustufen), die sowohl an der Versuchsreihe I als auch an der Versuchsreihe II teilgenommen haben (Wi: „Winter“ bzw. symptomarmer Zeitraum; So: „Sommer“ bzw. symptomreicher Zeitraum)

Bei Betrachtung der Einzelwerte fällt auf, dass bezogen auf den Leukotrien-Gehalt bei der Kontrollgruppe und bei der Hausstaubatopikergruppe eine Steigerung der Werte beobachtet werden kann (symptomarmer vs. symptomreicher Zeitraum).

- Vergleich von symptomarmem mit symptomreichem Zeitraum innerhalb einer Gruppe (Atopiker/Kontrolle)

|                    | Winter vs Sommer [%]          |           |
|--------------------|-------------------------------|-----------|
| Pollen-Atopiker    | 91,7 ± 8,58 vs 70,7 ± 6,71    | p < 0,1   |
| Hausstaub-Atopiker | 92,4 ± 18,78 vs 148,7 ± 13,57 | p < 0,001 |
| Kontrolle          | 44,8 ± 21,80 vs 280,1 ± 22,4  | p < 0,001 |
| Atopiker (gesamt)  | 85,3 ± 6,03 vs 114,1 ± 13,57  | p < 0,1   |

Tab.16: Stimulierbarkeit des Sommer-/Winter-Vergleiches nach einer Stimulation mit 1,2 µM A23187, 0,2 µM Arachidonsäure und 5 Minuten Inkubation ( $\bar{x} \pm SE$ ).

Es zeigte sich bei allen Gruppen eine signifikante Veränderung der Stimulierbarkeit in der symptomreichen Zeit verglichen mit der symptomarmen Zeit. Nach kritischer Wertung der Ergebnisse lässt sich für die Lipoxygenase eine jahreszeitenabhängige Stimulierbarkeit postulieren.

## **D           Diskussion**

### **D.1           Diskussion der methodischen Untersuchung der Leukotrienbestimmung**

Wie das vorangegangene Studium der theoretischen Grundlagen zeigte sind verschiedene Messmethoden für die Bestimmung der Cys-Leukotriene in der Literatur zu finden. Neben dem Radio-Immuno-Assay (RIA), dem Enzym-Immuno-Assay (EIA) oder einer Kombination von Gas-Chromatographie (GC) und Massenspektroskopie (MS), werden auch HPLC-Methoden, die auf der Trennung der Leukotriene durch unterschiedliche Retentionszeiten beruhen, beschrieben (Dawson und McGee 1990; Kumlin 1997; Tagari et al. 1989). Da in unserer Arbeitsgruppe bislang noch keine Leukotrienbestimmung mittels HPLC durchgeführt wurde, bestand die erste Aufgabe darin, eine geeignete Methode zu etablieren. Wir wollten den Vorteil der gleichzeitigen qualitativen und quantitativen Bestimmung der Cysteinyl-Leukotriene mittels HPLC nutzen.

#### **D.1.1        HPLC-Methode**

##### **D.1.1.1     Wahl der geeigneten HPLC-Methode**

In der Literatur werden viele unterschiedliche HPLC-Methoden beschrieben. Eine Normalphasen-Säule zeigt eine gute Trennleistung, ist allerdings sehr abhängig vom Injektionsmedium und damit nur für einige Arachidonsäuremetaboliten geeignet. Ist zum Beispiel Isopropanol im Injektionsmedium vorhanden, so hat dies negative Auswirkungen auf die Trennung der relativ unpolaren Monohydroxy-Metaboliten der Arachidonsäure. Es wird ein Negativpeak mit der gleichen Retentionszeit wie die Monohydroxy-Metaboliten der Arachidonsäure ihn aufweisen beobachtet. Damit kann es zu einer Überlagerung des Isopropanol-Peaks mit einem Peak der Arachidonsäuremetaboliten kommen. Dies beeinflusst die Messdaten (Powell

1985 b). Damit ist diese Methode für den Nachweis von Cysteinyl-Leukotrienen nicht geeignet.

Die allgemeinen Vorzüge der NP-Säulen liegen besonders in der qualitativ hochwertigen Stereo-Isomerentrennung. Dennoch fällt bei der Wahl des stationären Trennmediums die Entscheidung fast immer auf reversed phase-Säulen. Mit diesen werden in sämtlichen Literaturstellen gute Trennleistungen erzielt und auch die Reproduzierbarkeit der Retentionszeit ist immer wieder belegt. Im Fall der Eicosanoid-Trennung spielt bei der RP-Säule das Injektionsmedium keine Rolle (Powell 1985 a). Anstatt der sonst üblichen 150 mm Säulenlänge werden bei der Eicosanoid-Trennung häufig Messungen mit der Säulenlänge 250 mm durchgeführt, um eine bessere Trennleistung der strukturell ähnlichen Arachidonsäuremetaboliten zu erreichen (Dawson und McGee 1990). Je länger die Säule ist, desto häufiger kann sich das für die Trennung wichtige Gleichgewicht zwischen stationärer und mobiler Phase einstellen. Auf Grund dessen werden ähnliche Stoffe mit einer unterschiedlichen Retentionszeit getrennt eluiert. Durch die Wahl des Fließmittels können die Arachidonsäuremetaboliten in zwei Gruppen aufgeteilt werden. Zum einen in die Produkte des Cyclooxygenaseweges, indem ein Acetonitril/Wasser-Gemisch verwendet wird und zum anderen in die Lipoyxygenaseprodukte, bei denen ein Ethanol/Wasser-Gemisch zur Trennung der einzelnen Verbindungen führt (Powell 1985 a). Dieser Unterschied beruht auf den zusätzlichen Aminosäureresten der LIP-Produkte und der daraus resultierenden unterschiedlichen Lipophilie. Durch die verschiedenen Aminosäurereste ergibt sich zudem eine pH-Abhängigkeit der Elution. Häufig wird dem Fließmittel für die pH-Einstellung aus diesem Grund Eisessig zugesetzt, der in zu geringen Konzentrationen wiederum zu Peakverbreiterung und zu schlechterer Reproduzierbarkeit führen kann (Abe et al. 1985). Um diese Effekte einzuschränken kann man der wässrigen Phase des Fließmittels EDTA zugeben oder die Säule immer wieder mit einer EDTA-Lösung (0,1 % ige Lösung) zwischen den einzelnen Messungen waschen (Yu und Powell 1995). Durch Zugabe von 0,1 % EDTA-Salz zur mobilen Phase wird die Anlagerung von Kationen an die stationäre Phase verhindert (Verhagen 1986). Bei den einzelnen Untersuchungen in dieser Arbeit wurde dem Fließmittel sowohl Eisessig (2,5 %) als auch EDTA (0,05 %) zugesetzt, dabei wurde gleichzeitig das Mischungsverhältnis Methanol/Wassergemisch über den Zeitraum der Messung verändert (Gradient: vgl. C.2.1.1.4, Programm IV).

Ein allgemeines Problem bei der Detektion der Cysteinyl-Leukotriene ist ihre chemisch ähnliche Struktur. Eine Möglichkeit zum Erreichen einer guten Trennung besteht in der Zugabe von Tetrahydrofuran zum Fließmittel (Ibe und Campbell 1987). Diese Maßnahme führte bei unseren Messungen jedoch zu keinem zufriedenstellenden Ergebnis (vgl. C.1.1.1 Methode I).

Die Detektion der Leukotriene kann sowohl mit einem Fluoreszenz-Detektor als auch mit einem UV-Detektor erfolgen. Bei der Fluoreszenzdetektion ist eine vorherige Derivatisierung, zum Beispiel mit o-Phthaldialdehyd (OPA), notwendig. Das bedeutet wiederum einen zusätzlichen Arbeitsschritt und damit eine potentielle Fehlerquelle (Beil et al. 1998). Auch eine Derivatisierung mit 2,4-Dinitro-Phenylhydrazin und der anschließenden Bestimmung mittels elektrochemischer Detektion führt zu keiner weiteren Verbesserung der Sensibilität der Methode (Steffenrud und Salari 1989).

Nachdem in unserer Arbeitsgruppe bereits gute Erfahrungen mit der Kombination aus HPLC und UV-Detektion gemacht wurden, wie z.B. bei der Vermessung von Olanzapin haben wir uns für diese Bestimmungsmethode entschieden (Dawson und McGee 1990; Thien et al. 1993). Wir verwendeten zur Detektion einen Photodiodenarray-Detektor, der in der Lage ist, die UV-Spektren der eluierten Stoffe aufzuzeichnen, um damit deren Identifizierung zu erleichtern. Allerdings unterscheiden sich die Cysteinyl-Leukotriene nur geringfügig in ihrem Spektrum und müssen zusätzlich über die Retentionszeit identifiziert werden. Das UV-Spektrum wird stark durch die Allyl-Bindung der Leukotrienstruktur bestimmt. Dieses Faktum ist auch für die anschließende Validierung von zentraler Bedeutung.

#### **D.1.1.2 Validierung der HPLC-Methode**

Sowohl **Präzision** als auch **Linearität**, die in ihrer Durchführung einfach zu bestimmen sind, waren bei der Validierung gegeben. Für die **Richtigkeit** konnte durch das Spiken mittels EIA-Standardlösung eine qualitative Identifizierung vorgenommen werden. Eine quantitative Aussage konnte nicht mit Sicherheit getroffen werden. Der LTC<sub>4</sub>-Peak der HPLC-Methode hat zwar die gleiche Retentionszeit wie der Peak der Standardlösung des Kits, weist allerdings ein „schlechtes“ UV-Spektrum auf. Das typische Maximum bzw. der Kurvenverlauf des LTC<sub>4</sub>-Peaks sind jedoch zu erkennen. Eine mögliche Ursache für die schlechte Identifizierbarkeit des LTC<sub>4</sub>-Peaks könnte eine zu geringe Konzentration bei der Messung oder eine „Verunreinigung“ sein. Eine mögliche „Verunreinigung“ könnte dadurch zustande kommen, dass dem Kit-Standard noch weitere Substanzen zugesetzt wurden, um bei der Vermessung des Kits qualitativ und quantitativ reproduzierbare Werte zu erzielen.

Die Methode stellte sich bei der Überprüfung der **Robustheit** als empfindlich heraus, weshalb die vorgegeben Parameter immer genau eingehalten werden sollten. Am unempfindlichsten war der Parameter „Wellenlänge“, was durch die Darstellung einer relativ breiten Spitze des UV-Maximums der Leukotriene begründet ist. Wurden dagegen der Fluss (0,5 ml/min – 0,6



ml/min) oder der pH-Wert (3,4 bis 5,0) des Fließmittels geändert, kam es zu signifikanten Unterschieden zwischen den einzelnen Messungen. Dass der Fluss auf die Retentionszeit eine Auswirkung hat, war vorhersehbar. Interessant war in diesem Fall, welche geringen Veränderungen des Flusses bereits die Retentionszeiten beeinflussten. Eine Erniedrigung der Flussrate um 0,1 ml/min bewirkte eine Verlagerung der Retentionszeit bis zu vier Minuten. Ebenso war bei der Änderung des pH-Wertes des Fließmittels auf Grund der polaren Gruppen der Cysteinyl-Leukotriene eine Abhängigkeit zu erwarten. Zu Metabolisierung oder sogar Zerfall kam es bei den Cysteinyl-Leukotrienen durch die pH-Änderung nicht, da keine Änderung der Fläche festzustellen war und auch kein zusätzlicher Peak im Spektrum auftrat.

Ein weiterer interessanter Punkt war die Abhängigkeit der Messung der Leukotriene vom Verdünnungsmedium und ob ein Unterschied darin besteht, die Proben nur mit Lösungsmittel oder mit der Zellsuspension bei den einzelnen Arbeitsschritten zu verdünnen. In der Zellsuspension können noch weitere Stoffe und Substanzen enthalten sein, die einen Einfluss auf die Probe und auf die Messung haben können. Allerdings kam es zu keinem signifikanten Unterschied, somit spielt das Verdünnungsmedium keine Rolle bei der Messung der Cysteinyl-Leukotriene mittels HPLC.

Die **Spezifität** der HPLC-Methode, d.h. die Unterscheidung der Cysteinyl-Leukotriene von anderen Arachidonsäure-Derivaten war gut. Die Arachidonsäure-Derivate weisen in ihrem UV-Absorptionspektrum ein Maximum bei circa 236 nm auf und zeigen bei 285 nm keine Absorption. Sie werden bei der Detektion der Cysteinyl-Leukotriene, die bei 285 nm stattfindet, nicht erfasst.

Die **Selektivität**, d.h. die Unterscheidung der Cysteinyl-Leukotriene untereinander ist ebenfalls für die HPLC-Methode gegeben. Zum einen erfolgt sie über die Retentionszeit und zum anderen über die UV-Spektren der einzelnen Peaks. Auf Grund der Ähnlichkeit der UV-Spektren ist es ratsam über ein Spiken mit den einzelnen Leukotrienen die Bestimmung abzusichern.

Einen wichtigen Parameter bei der Validierung stellt die **Nachweisgrenze** dar. Die Arbeitsgruppe Metz (Metz et al. 1982) berichtet von einem Detektionslimit von 4-6 ng/ml. Es werden allerdings auch Methoden beschrieben bei denen die Nachweisgrenze wesentlich höher liegt (25-30 ng/ml; Levine et al. 1981). In der Methode von Ibe und Campbell werden Nachweisgrenzen von 7-9 ng/ml beschrieben (Ibe und Campbell 1988). Die Ergebnisse von Ibe und Campbell waren auf unsere Versuchsdurchführung nicht übertragbar, da eine Trennung der Leukotriene auf diesem Wege nicht erreicht werden konnte. Der Nachteil der erarbeiteten Methode liegt in der relativ hohen Nachweisgrenze von 20 ng/ml.

Die erarbeitete HPLC-Methode ist gut geeignet für eine qualitative und quantitative Bestimmung der einzelnen Leukotriene (LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub> und LTE<sub>4</sub>), wenn man bereit ist die Nachweisgrenze von 20 ng/ml in Kauf zu nehmen.

## **D.1.2 Messmethoden und deren Vergleich**

Um die entwickelte HPLC-Methode beurteilen zu können, haben wir sie mit weiteren Methoden für die Leukotrienbestimmung verglichen, die jeweils mit dem Ziel unserer Arbeitsgruppe (gleichzeitige Bestimmung der Cys-Leukotriene in einem Messvorgang) konform sein mussten.

### **D.1.2.1 Gas-Chromatographie und Massen-Spektroskopie**

Eine Möglichkeit des Vergleiches besteht in der Messung mit einer GC/MS-Kombination. Da uns zur Durchführung dieser Methode kein geeignetes Gerät zur Verfügung stand und uns auf Grund der hohen Anschaffungskosten das Kosten-/Nutzen-Verhältnis zu ungünstig erschien, verzichteten wir hier auf einen direkten Methodenvergleich. Bei beiden Methoden handelt es sich um sehr selektive Messmethoden, wobei die Massen-Spektroskopie meist nur in Kombination mit GC verwendet wird. In Bezug auf die Nachweisgrenzen liegen sie in etwa bei den nachfolgenden Assays (MS: 0,1 ng/ml; GC: 0,42 ng/ml) (Takamoto et al. 1995; Doyle et al. 1990)

### **D.1.2.2 Radio-Immuno-Assay**

Eine in der Literatur häufig aufgeführte Art der Bestimmung der Cysteinyl-Leukotriene ist die Messung mittels RIAs, diese werden vor allem in älteren Veröffentlichungen aufgeführt. Deren Vorteil liegt in einer hohen Spezifität und Selektivität (Peters und Schulmann 1983). Ein Einsatz dieser Methodik war jedoch nicht durchführbar, da die Beschaffung von kommerziell erhältlichen RIAs, bei denen die drei Cys-Leukotriene gleichzeitig bestimmt werden können, nicht möglich war. Zum momentanen Zeitpunkt werden nur noch RIAs auf dem Markt geführt, die für die Bestimmung eines einzelnen Leukotriens gedacht sind (entweder für LTC<sub>4</sub>, für LTD<sub>4</sub> oder für LTE<sub>4</sub>) und damit für unsere Messungen nicht in Betracht kamen. Die Firma Amersham bietet keinen Kit zur Bestimmung der Cys-Leukotriene mittels RIA mehr an, da

sie bereits ebenso genaue EIAs mit dem Vorteil des nichtradioaktiven Arbeitens (Vermeidung von radioaktivem Abfall) zur Verfügung stellen kann. Die Entwicklung eines in der Literatur genannten RIA als Alternative zu kommerziellen RIAs zogen wir nicht in Erwägung, da sie einen großen Arbeitsaufwand mit unsicheren Erfolgsaussichten bedeutet hätte. Wir zogen deshalb als Vergleichsmethode die Bestimmungsmethode mittels EIA heran, wie nachfolgend beschrieben.

### **D.1.2.3 Enzym-Immuno-Assay**

Bei der Wahl des EIAs hatten wir uns für den Kit der Firma Cayman Chemical entschieden, hier können die drei Leukotriene LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub> und LTE<sub>4</sub> in einem Messvorgang in einem Wert bestimmt werden. Mit diesem Kit wurden bereits gute Ergebnisse in anderen Arbeitsgruppen erzielt (Pierzchalska et al. 2000; Sheikh et al. 2001). Die Durchführung der Probenaufarbeitung im Rahmen der Arbeitsvorschrift gestaltete sich unkompliziert. Als Nachteil erwies sich eine Inkubationszeit von 18 Stunden, bevor die Entwicklung gestartet werden konnte. Mit dem Kit werden die Leukotriene LTC<sub>4</sub> und LTD<sub>4</sub> zu 100 % und LTE<sub>4</sub> zu 67 % bestimmt. Zu Kreuzreaktionen kommt es bei LTC<sub>5</sub>, LTD<sub>5</sub> und LTE<sub>5</sub> zwischen 41 und 61%, beim N-Acetyl-Leukotrien E<sub>4</sub> zu 10,5 % (die Pentaenvarianten kommen physiologisch wesentlich seltener vor als die Tetraen-Strukturen und beeinflussen daher das Gesamtergebnis nur geringfügig). Ein großer Vorteil des Kits ist die Detektionsgrenze von 13 pg/ml, wobei sich der Messbereich von 7,8 pg/ml bis 1000,0 pg/ml erstreckt (Arbeitsvorschrift Cayman Chemical 2001).

Als weiteren Immuno-Assay wählten wir den ELISA der Firma Neogen. Die Inkubationszeit beträgt bei diesem Kit 1,5 Stunden. Das Leukotrien C<sub>4</sub> wird hier zu 100 % bestimmt und die Leukotriene LTD<sub>4</sub> und LTE<sub>4</sub> jeweils zu 80%. Zu einer Crossreaktion kam es nur bei Leukotrien A<sub>4</sub> (>1%). Auf die Pentaenstrukturen wurde nicht weiter eingegangen. Der Messbereich erstreckte sich von 0,04 ng/ml bis 2,00 ng/ml, wobei keine exakte Detektionsgrenze angegeben wurde (Arbeitsvorschrift Neogen 2001).

#### **D.1.2.3.1 EIA von Cayman Chemical**

Bei den Messungen der ersten Kits der Firma Cayman trat ein uns zunächst nicht erklärbares Phänomen auf. Wurden in diesen Kits Standardlösungen der Firma Sigma (Sigma-Standard) mit bekannten Konzentrationen vermessen, differierten diese mit den Ergebnissen des Kit-Standards um eine 10er Potenz. Da Verdünnungsfehler ausgeschlossen werden konnten, setzten wir uns mit der Firma Cayman in Verbindung. Sie begründete dieses Phänomen mit einer Instabilität der Kit-Standardlösung. Allerdings wiesen auch unterschiedliche Chargen ähnliche bis gleiche Ergebnisse auf, was bei einer Instabilität so nicht der Fall wäre. Zudem lagen die durch den Kit errechneten Werte höher als die tatsächlich für den Sigma-Standard errechneten Werte; das Verhältnis müsste sich bei einer Instabilität somit genau umgekehrt verhalten. Nachdem wir neue Kits mit neuen Chargennummern erhalten hatten konnten wir keine der oben genannten Abweichungen mehr feststellen. Da die neuen Chargen in anderen Fläschchen geliefert wurden und die Volumina der Standardlösung um ein Vielfaches verändert waren - in den alten Chargen wurden uns 250 µl geliefert, in den neuen 1000 µl – lag die Vermutung nahe, dass der Fehler jeweils durch die unterschiedliche Abfüllmenge verursacht worden sei. Nachdem das Volumen wie oben beschrieben um das 4-fache zugenommen hatte, ist es wahrscheinlich, dass bei der ersten Charge mit einem Gesamtvolumen von 250 µl anstelle von ursprünglich 100 µl nur 25 µl für die Standardreihe hätten entnommen werden dürfen, was leider vom Hersteller in den Kits beigelegten Arbeitsanleitungen nicht vermerkt wurde.

Damit Verwendung der neuen Kits keine Abweichungen mehr auftraten, konnten die Messungen fortgesetzt werden. Aufgrund der beschriebenen Unregelmäßigkeiten bei den Produkte der Firma Cayman entschieden wir uns die Messungen mit einem Kit der Firma Neogen durchzuführen.

#### **D.1.2.3.2 ELISA von Neogen**

Der ELISA-Kit der Firma Neogen bestimmt die drei Leukotriene LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub> und LTE<sub>4</sub> in einem Messvorgang. Er wurde als erstes auf seine Richtigkeit untersucht. Auch bei diesem Kit kam es zu einer Abweichung zwischen dem eingesetzten Standard der Firma Sigma und dem eigentlichen Kit-Standard. Der Ist-Wert lag erneut unterhalb des Soll-Wertes, wie schon bei dem Kit der Firma Cayman. Die Unterschiede zwischen den einzelnen Werten waren jedoch wesentlich kleiner. Nach dieser Feststellung traten wir mit der Firma Neogen in Kontakt

und fragten nach einer Erklärung für diese Abweichung. Als Begründung wurde uns - wie bereits von der Firma Cayman - eine mögliche Instabilität des mitgelieferten Standards genannt, die für die Firma aufgrund der Tatsache, dass die Leukotriene allgemein keine sehr stabile Struktur aufweisen, offenbar die wahrscheinlichste Fehlerquelle darstellt. Bei weiteren Kits, die uns neu zugesandt wurden, kam es zwar noch immer zu leichten Abweichungen, diese waren jedoch vernachlässigbar gering.

#### D.1.2.4 Vergleich der Methoden

Für den Vergleich der Methoden zur Leukotrienbestimmung wurden der ELISA-Kit der Firma Neogen, der EIA-Kit der Firma Cayman und die selbsterstellte HPLC-Methode herangezogen. Verglichen wurden die Parameter Nachweisgrenze, Selektivität und Spezifität, Richtigkeit, Arbeitsaufwand und Kosten.

Ein Vorteil des EIA-Kits war die gute **Nachweisgrenze** von 0,013 ng/ml, der ELISA-Kit schnitt hier mit 0,04 ng/ml nur geringfügig schlechter ab. Mit einem Wert von 20 ng/ml lieferte die HPLC-Methode mit ihrer vergleichsweise geringen Empfindlichkeit kein zufriedenstellendes Ergebnis. Die erwarteten Leukotrien-Konzentrationen liegen im Plasma bei 0,53 ng/ml (Chavis et al. 1997) oder bei Nicht-Atopikern wie in den klinischen Untersuchungen nachgewiesen bei etwa 0,40 ng/ml in PBL.

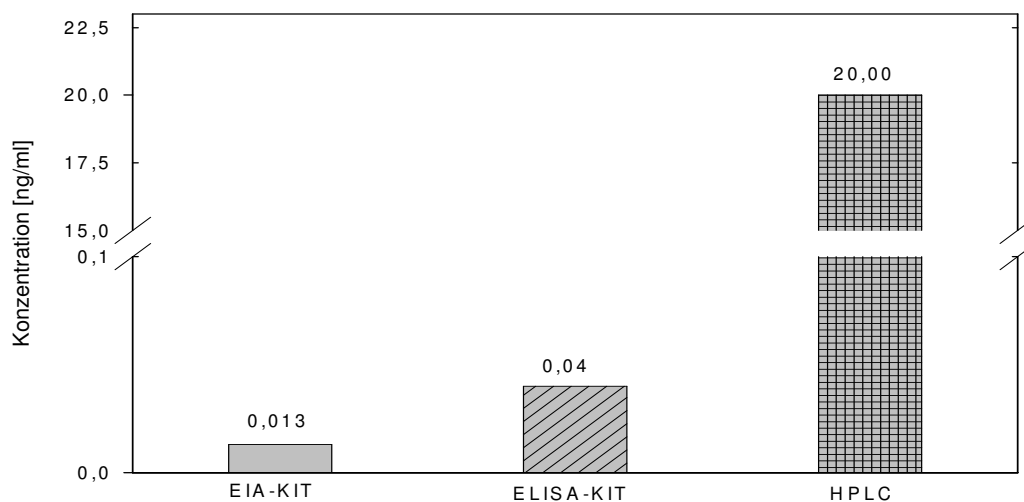


Abb.54: Nachweisgrenzen [ng/ml] der EIA- und ELISA-Kits sowie der HPLC

Beim Vergleich der **Selektivität** und der **Spezifität** schnitt die HPLC - mit dem UV-Detektor - deutlich besser ab als die beiden anderen Methoden. Durch das automatische Aufzeichnen des jeweiligen UV-Spektrums der Untersuchungssubstanz waren Peaküberlagerungen und damit enthaltene Unreinheiten schnell feststellbar. Bei der HPLC werden die Leukotriene LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub> und LTE<sub>4</sub> jeweils mit einem eigenen Peak dargestellt. Zur Überlagerung mit weiteren Verbindungen wie dem LTB<sub>4</sub> oder dem Prostaglandin D<sub>2</sub> kommt es nicht, da diese andere Retentionszeiten haben. Auch bei den Abbauprodukten 5-HETE, 12-HETE und 20-HETE findet keine Überlagerung der Signale statt, da diese Verbindungen ihr Absorptionsmaximum bei 236 nm und nicht wie die Leukotriene bei 285 nm zeigen.

Bei den beiden aufgeführten Kits werden die gesamten Cysteinyl-Leukotriene in einem Messwert erfasst. Es ist daher nicht möglich, die einzelnen Leukotriene aufzutrennen. Die Derivate von HETE-Verbindungen sowie das Prostaglandin D<sub>2</sub> werden in diesen Kits nicht erfasst. (Arbeitsvorschrift Cayman 2001 und Neogen 2001).

Bei Betrachtung der **Richtigkeit** wird aufgrund der oben genannten Probleme bei den Kits eine Überprüfung jeder neu erhaltenen Charge empfohlen bzw. es sollte immer ein externer Standard bei den Messungen mitbestimmt werden. Obwohl es sich um kommerziell erhältliche Kits handelt, kann es auch hier zu beträchtlichen Abweichungen kommen. Wird eine solche Abweichung nicht bemerkt, sind unkorrekte Schlussfolgerungen durch fehlerhafte Ergebnisse nicht auszuschließen, was je nach Sachlage fatale Folgen haben kann. Kommt es auf Grund der gemessenen Daten zu einer medikamentösen Therapie wird die erforderliche Dosierung nicht gefunden werden.

Der **zeitliche Aufwand** für die Durchführung der Versuche konnte in Arbeitsaufwand (Aufreinigung, Pipetierschema) und Messaufwand unterteilt werden. Nachdem sowohl bei den Kits als auch bei der HPLC eine Aufreinigung notwendig war, konnte sich hier keine Methode als vorteilhaft gegenüber der anderen erweisen. Durch die Erfordernis jede Probe einzeln zu pipettieren wurde für die Kits je Probe mehr Zeit aufgewendet als bei der HPLC. Bei dieser wurden die Proben nur in die einzelnen Gläschen pipettiert und in den Probenhalter zur Messung gestellt. Möchte man hier unterschiedliche Konzentrationen messen, so kann dies über verschiedene Injektionsvolumina geschehen. Die Probenkonzentration kann frei gewählt werden, ohne dass eine Verdünnungsreihe hergestellt werden muss. Da auch das HPLC-Programm von vorherigen Messungen übernommen werden konnte, war die HPLC, was den Arbeitsaufwand anbelangt, den anderen Methoden überlegen. Für den Vergleich der Mess-

dauer der einzelnen Methoden musste beachtet werden, dass bei der HPLC die Konzentration der einzelnen Leukotriene und bei den Kits die Gesamtkonzentration der Cysteinyl-Leukotriene bestimmt wurde. Um die Messzeiten vergleichbar zu machen, gingen wir deshalb von einer Verwendung von drei Kits aus, in denen die Konzentration eines der Leukotriene LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub> oder LTE<sub>4</sub> ermittelt wird.

Der EIA-Kit hatte eine Inkubationszeit von insgesamt 19,0 h, beim ELISA betrug sie 1,5 h. Beim EIA-Kit wurden in dieser Zeit 36 Proben in Doppelbestimmung quantifiziert, beim ELISA waren es 40 Proben in Doppelbestimmung. Die Zeit für die Messvorbereitungen betrug bei beiden Kits 1,0 h. Für die HPLC betrug die Zeit für die Messvorbereitung etwa 0,5 h. Die Messdauer pro Probe betrug 1,0 h, woraus für 36 Proben in der Doppelbestimmung eine Messdauer von 72,0 h resultierte.

Ein Vergleich der Messdauer ergab unter genannten Umständen einen zeitlichen Vorteil für die HPLC.

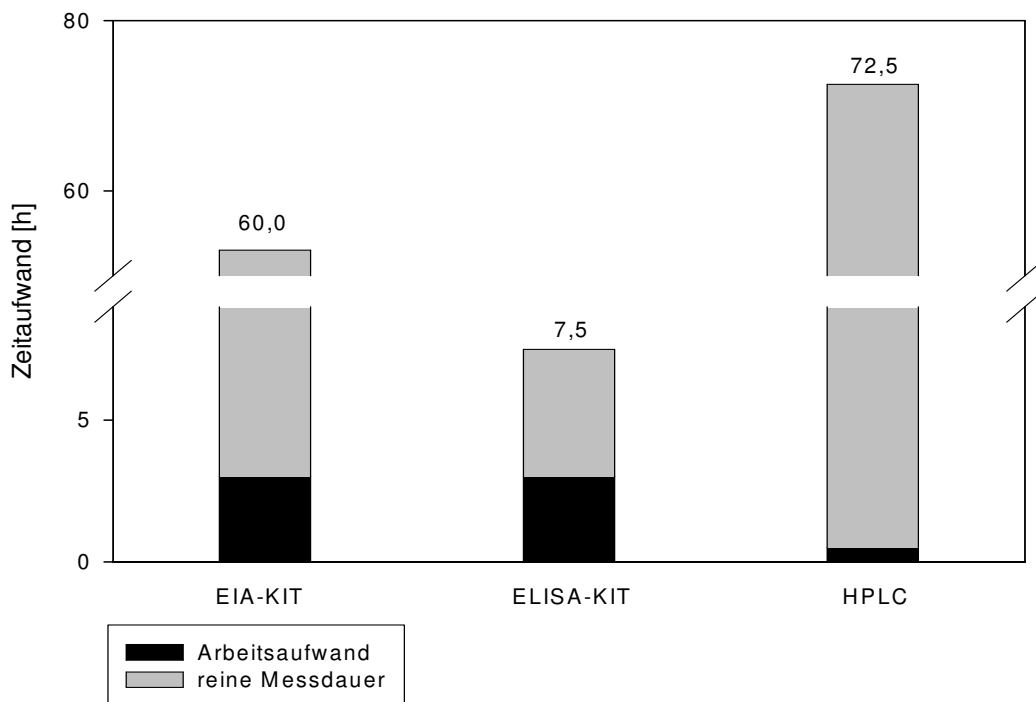


Abb.55: Zeitaufwand und Arbeitszeit für die Messung von 36 Proben

Bei der HPLC kam es im Rahmen eines Messvorgangs zur sofortigen Bestimmung der einzelnen Leukotriene. Bei den Immuno-Assays wurden die Leukotriene LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub> und LTE<sub>4</sub> in einem Wert erfasst. Um sie einzeln zu bestimmen, müsste für jedes Leukotrien separat ein

Kit verwendet werden, wodurch der Arbeitsaufwand für den EIA auf 60,0 h und für den ELISA auf 7,5 h ansteigen würde.

Somit war der Arbeitsaufwand bei der HPLC-Messung am geringsten, die Messdauer jedoch am längsten. Der ELISA-Kit hatte die kürzeste Gesamtmessdauer.

Wesentliche Einflussfaktoren bei einem Vergleich der **Kosten** für die Durchführung der jeweiligen Methode sind die Anzahl der Messungen sowie die geplante Auslastung der HPLC-Anlage. So eignet sich eine HPLC im Bezug auf die Kosten nur, wenn weitere Versuche geplant sind oder dieses Thema über einen längeren Zeitraum untersucht werden soll. Ist dies nicht der Fall, sind die Kosten der HPLC wesentlich höher als die für die jeweiligen Kits.

Dieser Methoden-Vergleich zeigt, dass im Bezug auf die Arbeitszeit wesentlich mehr Messungen mit der HPLC durchgeführt werden können als bei Verwendung der Kits. Je nachdem was untersucht werden soll liefert die HPLC auch in Sachen Nachweisgrenze ausreichende Daten. So könnte bei einem Stimulationsversuch mit A23187 genau bestimmt werden welche Leukotriene gebildet werden: LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub>, oder LTE<sub>4</sub>.

Für unsere weiteren Versuche bei denen auch der basale Wert in PBL bestimmt werden soll, musste mit einem Kit gearbeitet werden. Weder der Kostenvorteil (HPLC war bereits vorhanden) noch der geringere Zeitaufwand (Arbeitszeit) konnten den Nachteil der schlechteren Nachweisgrenze aufwiegen.

### **D.1.3 Probenaufarbeitung**

Ein wichtiger Arbeitsschritt bei der Versuchsdurchführung für die Cysteinyl-Leukotrienmessung war die Probenaufarbeitung bzw. -reinigung. Wird mit nicht gereinigtem Probenmaterial gearbeitet enthält das Probenmaterial zu viele verunreinigende Substanzen, die die nachfolgende Messung stören. Ein Problem waren die großen Substanzverluste während der Probenaufarbeitung, die es zu minimieren galt. Untersucht wurden vier in der Literatur häufig genannte Sep-Pak<sup>®</sup>-Methoden, um die vor der eigentlichen Leukotrienbestimmung notwendige Aufreinigung durchzuführen (vgl. B.2.1.1.2).

Bei der HPLC-Methode musste der Aufreinigungsschritt vor der Messung durchgeführt werden, da es sonst zu einer Überladung der Säule mit Matrixsubstanzen hätte kommen können



und damit die Auswertbarkeit der Messergebnisse gefährdet worden wäre. Bei den verwendeten Kits bestand die gleiche Problematik.

Die Sep-Pak<sup>®</sup>-Methode Nr. 1 (vgl. B.2.1.1.2) war jene Aufarbeitungsmethode, die die Firma Cayman für ihre EIA-Kit Messungen vorschreibt (Cayman 2001). Die Konditionierung erfolgte mit Methanol und Wasser, den typischen Lösungsmitteln für eine RP-C<sub>18</sub>-Säule. Im Rahmen der Konditionierung wird das chromatographische Bett der HPLC-Säule gereinigt und auf die Trennung vorbereitet.

Die Sep-Pak<sup>®</sup>-Methode Nr. 2, die untersucht wurde, unterscheidet sich von den anderen drei Methoden darin, dass die Kartusche bei den Konditionierungsschritten zusätzlich mit einer EDTA-Lösung 0,1 % gespült wurde (Ibe und Cambell 1988). Die EDTA-Lösung sollte eine erhöhte Reinheit der Säule gewährleisten (Powell 1985).

Bei den Waschschritten treten die größten Differenzen beim Vergleich der einzelnen Methoden auf. Die Methoden Nr. 2 und Nr. 3 verzichteten ganz auf diese Schritte, um keine Zielsubstanzen aus dem chromatographischen Bett der Kartusche herauszuwaschen und damit den Verlust möglichst klein zu halten (Wheelan und Murphy 1997). Bei den Methoden Nr. 1 und Nr. 4 hingegen wurde die Säule mit einer polaren (5 % MEOH) als auch unpolaren (Hexan) Flüssigkeit gewaschen, um den größten Teil der unterschiedlichen Begleitstoffe der auf die Säule aufgetragenen Probe zu entfernen. Die polare Flüssigkeit verdrängt andere polare Substanzen und die unpolare Flüssigkeit verdrängt unpolare Substanzen, so dass nach dem Waschgang im Idealfall nur noch Analysesubstanz auf der Sep-Pak<sup>®</sup>-Kartusche vorhanden sein sollte. Im Hinblick auf die Auswertung der Ergebnisse galt es zu bedenken, dass der geringe Anteil an Methanol in der Waschflüssigkeit einen Teil der Leukotriene mit heraus spülen kann (Patella et al. 1995).

Als Elutionsmittel wurde Methanol, Ethanol oder eine Mischung aus Wasser und Ethanol verwendet. Die Elutionsmittel unterschieden sich sowohl in ihrem Volumen als auch in ihrer Polarität. Es war zu beachten, dass mit einem großen Volumen an Elutionsmittel zwar viel Untersuchungssubstanz von der Säule herunter gelöst wurde, aber daraus eine längere Eindampfzeit resultierte. Ein großes Volumen kann somit den oxidativen Abbau der Untersuchungssubstanz begünstigen. Deshalb wurde bei der Trockenphase in den Versuchen auf zusätzliche Wärme bei der IR-Trocknung verzichtet, unter diesen Bedingungen kam es auch zu keinem signifikanten Unterschied an nachweisbaren Leukotrien bei einem Elutionsvolumen von 5 bzw. 10 ml MeOH.

Die Polarität des Elutionsmittels muss deutlich größer sein als die der zu untersuchenden Substanz, da sie sonst nicht von der Bindungsstelle auf der Sep-Pak<sup>®</sup>-Kartusche herausgelöst

werden. Auffallend war die signifikant verringerte Wiederfindung bei Verwendung des Elutionsmittels Ethanol bei Methode Nr. 2, welche möglicherweise auf die vergleichsweise geringe Polarität von EtOH im Vergleich zu MeOH zurückzuführen sein könnte. Die vom eingesetzten Alkohol abhängigen Polaritätsunterschiede der Fließmittel wurden durch Wasserzusatz bei Methode Nr. 1 ein wenig ausgeglichen. Somit war die gesamte Polarität bei den Methoden Nr. 1, Nr. 3 und Nr. 4 sehr ähnlich, das erklärt die vergleichbaren Ergebnisse.

Ein weiterer Punkt, der sich auf die Wiederfindung auswirkt, war der Trocknungsverlust, welcher vor allem beim Leukotrien LTC<sub>4</sub> auftrat. Hier konnte der größte Substanzverlust beobachtet werden, was auch die in der Literatur getroffenen Aussagen bestätigte. LTC<sub>4</sub> ist das instabilste der drei Leukotriene und wird in LTD<sub>4</sub> bzw. LTE<sub>4</sub> umgewandelt, so dass bei Betrachtung des gesamten Cys-Leukotriengehaltes kein Substanzverlust feststellbar ist (Samuelsson 1983 b).

Zum anderen wirkte sich das Volumen der Flüssigkeit, mit der das getrocknete Eluat in Lösung gebracht wurde, auf die Wiederfindung aus. Hier musste im Rahmen der Probenaufarbeitung ein optimales Volumen gefunden werden, um zum einen das getrocknete Eluat bei Wiederaufnahme nicht zu stark zu verdünnen und zum anderen zu gewährleisten, dass die eingesetzte Menge Lösungsmittel das getrocknete Eluat vollständig zu lösen vermochte. Die Versuche zeigten, dass mit steigender Menge an eingesetztem Lösungsmittel, mit dem das getrocknete Eluat in Lösung gebracht wurde, eine bessere Wiederfindung einherging. Bei einem Volumen von 450 µl konnte annähernd 100 % der Ausgangssubstanz gefunden werden.

Auf Grund der genannten Ergebnisse kamen wir zu dem Schluss, die Aufreinigung innerhalb der klinischen Studie mit der Methode Nr. 1 durchzuführen. (Konditionieren mit je 5 ml MeOH und H<sub>2</sub>O, waschen mit je 5 ml H<sub>2</sub>O und Hexan und mit 10 ml EtOH/H<sub>2</sub>O-Gemisch Eluieren). Das getrocknete Eluat wurde anschließend in 450 µl EIA-Puffer aufgenommen. Diese Bedingungen erwiesen sich für uns als ideal. Es war festzustellen, dass sich die angeblich sehr instabilen Leukotriene bei der IR-Trocknung stabiler als erwartet zeigten.

Weitere Möglichkeiten der Aufreinigung mit anderen Methoden, wie zum Beispiel mit Ionenaustauscherharz, wurden nicht durchgeführt, da hier im Zusammenhang mit Leukotrienen nur wenige Erfahrungen vorlagen (Cayman 2001).

## **D.1.4 Einfluss auf den Leukotriengehalt**

### **D.1.4.1 Einfluss der Stimulationsreagenzien und der Stimulationszeiten**

In dieser Arbeit wurde mit verschiedenen Stimulationsreagenzien gearbeitet: Dem Calcium-Ionophor A23187, Anti-IgE und Melittin. Deren Auswirkungen auf die Leukotrienbildung bzw. -freisetzung wurden untersucht. Die Reagenzien wurden so ausgesucht, dass unterschiedliche Mechanismen mit ihren jeweiligen Auswirkungen auf die Gesamtleukotrienbildung beurteilt werden konnten. Diese Vorversuche waren notwendig, um Bedingungen für die klinische Studie festzulegen und die Fragen der klinischen Studie beantworten zu können. Die methodischen Versuche zur Leukotrienbildung bzw. -freisetzung wurden von uns unter zwei Schwerpunkten durchgeführt. Zum einen wurde die Konzentration der Stimulationsreagenzien variiert, zum anderen die Inkubationszeit.

#### **D.1.4.1.1 Calcium-Ionophor**

Seit Jahrzehnten werden in der Literatur für die Stimulation von Leukotrienen an PBL Versuche mit dem Calcium-Ionophor beschrieben (Clancy und Hugli 1983; Miadonna et al. 1995). Bei den einzelnen Versuchsbeschreibungen wurde mit unterschiedlichen Konzentrationen (von 0,2 bis 30  $\mu\text{M}$ ) und Inkubationszeiten (von 4 bis 30 Minuten) gearbeitet (Ford-Hutchinson et al. 1980; Ibe et al. 1997; Razin et al. 1982; Surette et al. 1994). Diese auffällig große Variationsbreite lässt zwei Vermutungen zu: Die gewählten Bedingungen haben keinen großen Einfluss auf die Stimulation oder es existieren verschiedene optimale Stimulationsbedingungen. Aus diesem Grund führten wir zunächst Vorversuche mit den Konzentrationen (0,2 – 3,0  $\mu\text{M}$ ) und den Inkubationszeiten (5,0 – 30 min) durch, um eine eventuelle Abhängigkeit der Konzentration von diesen Parametern zu überprüfen. Wir wählten als kürzeste Inkubationszeit eine Dauer von 5 Minuten, da frühestens nach dieser Zeitspanne reproduzierbar gearbeitet werden konnte.

Bei der Stimulation mit Calcium Ionophor bildete sich nach einer fünfminütigen Stimulation ein Konzentration-Plateau ab 2,0  $\mu\text{M}$  A23187, bei einer Stimulation von 15 Minuten hingegen bildete sich ein Maximum bei einer Konzentration von 1,2  $\mu\text{M}$  A23187. Damit zeigt sich sowohl eine Zeit- als auch Konzentrationsabhängigkeit bei der Stimulation der Leukotriene. Mit

dem Ansteigen der Konzentration des Ionophors stieg die Konzentration des intrazellulären Calciums und daraus folgend auch die Bildung der Leukotriene an. Der Abfall der Kurve bei 20 Minuten kann durch eine zu hohe Ionophor-Konzentration erklärt werden, durch welche der Calciumeinstrom gehemmt wird. Dieses Phänomen wird bei Dedkova als der Ionophor-Effekt bezeichnet (Dedkova 2000). Es ist anzunehmen, dass es bei der Inkubation von 5 Minuten und einer weiteren Erhöhung der Calcium-Ionophor-Konzentration nach dem oben genannten Plateau zu einem Abfall der Werte kommt. Das leicht exponentielle Ansteigen der Kurve kann durch ein positives Feedback unterstützt werden (Goodwin 1985). Sowohl die Umwandlung der membrangebundenen Phospholipide als auch die Leukotriene selbst können eine positive Rückkopplung auf die aufzunehmende Calcium-Konzentration ausüben. Ein weiterer Grund für den Abfall der Kurve bei 15 Minuten findet sich in der Instabilität der Leukotriene. Die große Reaktivität, durch die konjugierte Doppelbindung der Leukotriene erzeugt, konnte bei den weiteren Versuchen immer wieder beobachtet werden. Bei der Stimulation mit dem Ionophor A23187 werden zum Beispiel sehr aktive Verbindungen wie das Superoxid-Radikal gebildet, die sich unverzüglich an die Doppelbindungen der Leukotriene anlagern können (Mansour und Agha 1999).

#### **D.1.4.1.2 Calcium-Ionophor plus Arachidonsäure**

Bei Stimulationsversuchen, in denen Arachidonsäure in unterschiedlichen Mengen zugesetzt wurde, konnte ein interessanter Verlauf der Kurven beobachtet werden. Während bei einer Inkubationszeit von 5 Minuten eine Hemmung vorlag, konnten wir bei einer Inkubationszeit von 20 Minuten eine Steigerung der Leukotrienproduktion feststellen. Die frühzeitige Hemmung bei fünfminütiger Inkubation wurde vermutlich durch unterschiedliche Faktoren beeinflusst, die nicht nur von der Stimulationszeit abhängig waren. So kann die Hemmung unter anderem durch die Bildung des Eicosanoids 15-HETE verursacht werden, das sich nur bildet, wenn der Reaktion Arachidonsäure zugesetzt wird (Laclos et al. 1984; Peters-Golden und Shelly 1988). Das 15-HETE bildet sich linear mit der Zugabe der Arachidonsäure und hemmt den gesamten 5-Lipoxygenase-Weg. Es übt dabei nach Auffassung von Petrich jedoch nicht die Funktion eines richtigen Enzymhemmers aus, sondern wirkt als Substratkonkurrent zu dem „natürlichen Substrat“ Arachidonsäure um die 5-LIP (Petrich et al. 1995). Andererseits wird das 15-HETE auch als endogener Lipoxydase-Hemmer bezeichnet (Ring und Dorsch 1985). Dieser Hemmeffekt wurde in unseren Versuchen dadurch bestätigt, dass die Messwerte des Stimulationsversuches mit A23187 immer höher ausfielen, als bei der Stimulation von

A23187 zusammen mit Arachidonsäure. Es wird angenommen, dass sich die OH-Gruppe des C<sub>15</sub>-Atoms von 15-HETE an eine rezeptorähnliche Struktur der 5-LIP bindet (Petrich et al. 1995). Eine weitere Erklärungsmöglichkeit für die Verminderung des Leukotrien-Gehaltes ist eine Blockade der Calciumkanäle durch die Arachidonsäure selbst (Dekova et al. 2000).

In unserem Fall müssten die oben genannten Hemmeffekte bei der 20-minütigen Inkubation jedoch aufgehoben sein bzw. eine untergeordnete Rolle spielen. Es besteht die Eventualität, dass die natürliche Arachidonsäure in Pools vorliegt, die innerhalb kurzer Zeit nach etwa fünf Minuten aufgebraucht werden (Johnson et al. 1999; Sandborg 1988). Anschließend wird die Arachidonsäure aus der Membran herausgelöst und sofort über die 5-LIP oder die Cyclooxygenase weiter metabolisiert, so dass kein Überschuss an AA vorliegt, aus der das blockierende 15-HETE gebildet werden kann (Fonteh und Chilton 1993). Zusätzlich könnte der Effekt der positiven Rückkopplung nach einer längeren Inkubationszeit zum Tragen kommen. Letztgenannte Punkte wären eine Erklärung dafür, dass das Maximum bei der Kombinationsstimulation erst bei 10 Minuten auftrat und bei fünf Minuten im Vergleich zur A23187-Stimulation ein niedrigerer Wert erzielt wurde.

Bei der Stimulation mit A23187 und der Kombination aus AA und A23187 konnten wir Parallelen feststellen, die auf die Funktionsweise von A23187 zurückzuführen waren. Eine eindeutige Abhängigkeit der Versuche vom Faktor Zeit wurde sichtbar. Beide Stimulationsversuche hatten jeweils zwei Maxima; das erste Maximum lag bei 7,5 Minuten (A23187) bzw. bei 10 Minuten (A23187 + AA) und das zweite Maximum bei jeweils 20 Minuten. Das Auftreten von zwei Maxima erklärt die Vielzahl unterschiedlicher Zeitangaben (4 bis 30 Minuten) in der Literatur, bei denen gemessen wurde. Die Kurvenverläufe sind durch die differierenden Bildungsmengen der einzelnen Leukotriene bedingt. So wurde schon von Salari ein LTC<sub>4</sub>-Maximum bei 5 Minuten, ein LTD<sub>4</sub>-Maximum bei 20 Minuten und ein LTE<sub>4</sub>-Maximum bei 30 Minuten beschrieben. Das LTE<sub>4</sub> kann unter anderem weiter in LTF<sub>4</sub> metabolisieren (Samhoun et al. 1989). In unseren Versuchen fielen die Maxima von LTD<sub>4</sub> und LTE<sub>4</sub> zeitlich zusammen (Salari et al. 1985/1987). Durch die Umwandlung von LTC<sub>4</sub> über LTD<sub>4</sub> in LTE<sub>4</sub> nahm wie erwartet die Konzentration von LTC<sub>4</sub> ab und die von LTE<sub>4</sub> zu. LTF<sub>4</sub> wurde nicht von den in dieser Arbeit verwendeten Messmethoden erfasst.

Der Kurvenverlauf wird nicht ausschließlich durch den Faktor Zeit beeinflusst, denn neben der Zeit üben auch weitere methodische Faktoren Einfluss auf die Messungen aus. So war bei dem von uns verwendeten EIA-Kit zu beachten, dass aus methodischen Gründen nur 60 % des Leukotriens LTE<sub>4</sub> bestimmt wurden.

### D.1.4.1.3 Anti-IgE

Bei der Anti-IgE-Stimulation stieg die Leukotrienkonzentration mit weiterer Zugabe von Anti-IgE stetig an. Durch die geringe Menge an gebildeten Leukotrienen wurde erst nach 30 Minuten ein signifikanter Anstieg in Bezug auf den Nullwert ohne Stimulation beobachtet. Die Steigung kann durch eine ansteigende Anti-IgE-Konzentration erklärt werden, die zu immer mehr Andockstellen führt und somit auch zu einer größeren Leukotrienausschüttung. Die sehr geringen Werte lassen allerdings darauf schließen, dass die optimale Stimulationskonzentration bei den durchgeführten Versuchen nicht gefunden wurde. Die Anti-IgE Konzentration wurde unter anderem in Anlehnung an die Histaminversuche unsere Arbeitsgruppe gewählt, um einen späteren Vergleich zu ermöglichen. Wie schon bei der Stimulation von A23187 war auch bei der Stimulation mit Anti-IgE eine zeitliche Abhängigkeit zu beobachten. Im Vergleich zur fünfminütigen Stimulation konnte bei einer Inkubationszeit von 15 Minuten die doppelte Leukotrienmenge gefunden werden; diese war jedoch wesentlich geringer als die gebildete Leukotrienmenge bei der Stimulation mit dem Calcium-Ionophor.

Bei der Stimulation mit Anti-IgE muss ein bestimmtes Verhältnis von Zellzahl und zugegebener Konzentration des Anti-IgEs eingehalten werden, da sich zum Beispiel bei zu geringer Zellkonzentration Anti-IgE-Aggregate bilden können und damit nur noch ein ungenügendes Signal für die nachfolgende Freisetzung ausgelöst werden kann (MacGlasham et al. 1983). Je weniger Zellen im Reaktionsgefäß vorhanden sind, desto größer ist der Überschuss an Anti-IgE. Dieses Phänomen wurde in unserer Arbeitsgruppe bereits in der Arbeit von Räderer beschrieben (Räderer 1996). Durch Stimulation mit Anti-IgE werden viele präformierte Mediatoren (insbesondere Histamin) ausgeschüttet, die in Verbindung mit den Leukotrienen eine allergische Reaktion auslösen (Ring 1995). Wenn nach der bereits etablierten Methode unserer Arbeitsgruppe Histamin und Leukotriene gleichzeitig aus einer Probe bestimmen werden sollen, muss darauf geachtet werden, dass bei der Anti-IgE-Stimulation unterschiedliche Konzentrationen verwendet werden, da sonst keine messbaren Signale bei der Leukotrienbildung zu erwarten sind. Eine weitere Möglichkeit der gleichzeitigen Histamin- und Leukotrienbildung wäre eine Stimulation mit dem Calcium Ionophor. Histamin wird theoretisch durch eine fünfminütige Stimulation mit A23187 in gut messbaren Konzentrationen von PBL ausgeschüttet (Conroy et al. 1976; Salari et al. 1985).

#### **D.1.4.1.4 Melittin**

Eine Stimulationskonzentration von 70  $\mu\text{M}$  Melittin erzeugte bei beiden Stimulationszeiten (5 bzw. 15 Minuten) ein frühes Maximum. Die Leukotrienkonzentration erreichte nach der fünfzehnminütigen Inkubationszeit eine höhere Konzentration als nach der fünfminütigen Stimulation, fiel im Vergleich zur Ionophor-Stimulation jedoch wesentlich geringer aus. Ein Grund für die geringe gebildete Menge könnte die vorwiegend durch Melittin stimulierte  $\text{LTB}_4$ -Produktion sein, die mit dem hier verwendeten EIA nicht erfasst wurde (Salari 1987). Da die Funktionen des Melittins noch nicht alle bestimmt wurden, kann - da es sich um ein cytotoxisches Molekül handelt - angenommen werden, dass bei zu großen Konzentrationen Zelltod eintritt und damit sämtliche Leukotriene und weitere Stoffe nach einer bestimmten Zeit nicht mehr gebildet werden können (Kourie und Shorthouse 2000). Melittin setzt zudem die Bildung der Leukotriene in Gang, indem es eine ionenkanalartige Struktur bildet, wodurch z.B. Calcium in die Zelle einströmen kann. Dies wurde in unseren Versuchen durch das schmale Maximum dokumentiert.

#### **D.1.4.1.5 Vergleich der Stimulationsreagenzien**

Bei dem Vergleich der unterschiedlichen Stimulationsreagenzien konnte eine Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit festgestellt werden. Bei der Stimulation mit Melittin und dem Calcium-Ionophor konnte sowohl eine Abhängigkeit von der eingesetzten Konzentration als auch von der Stimulationsdauer gezeigt werden. Eine Ursache für die Abhängigkeit sowohl von der Zeit als auch von der Konzentration liegt im Stimulationsmechanismus. Bei Einsatz des Calcium-Ionophor und des Peptids Melittin wird das extrazelluläre Calcium über einen „Kanal“ in das Zellinnere transportiert, mit dem Unterschied das bei Einsatz des Peptids die Zellen rasch zerstört werden und es nur frühzeitig zu einem Anstieg an Leukotrienen kommt. Mit dem Anti-IgE wurde über eine Antigen-Antikörper-Reaktion die Stimulation der Leukotriene ausgelöst. Hierbei kommt es zu einer zeitlichen und konzentrationsbedingten Abhängigkeit der Leukotrienbildung. Das Anti-IgE hat in dem untersuchten Konzentrationsbereich keinen größeren Einfluss auf die Bildung der Cysteinyl-Leukotriene. Dieser Konzentrationsbereich wurde in unsere Arbeitsgruppe bereits für die Untersuchungen am Histamin verwendet. Bei einer Stimulation mit A23187 wird eine 20fach höhere Konzentration an gebildeten bzw. freigesetzten Leukotrienen als bei der Stimulation mit Anti-IgE und Melittin gemessen.

---

Bei diesen Vorversuchen konnten gleichzeitig die Bedingungen für die folgenden klinischen Untersuchungen, bei denen die Abhängigkeit der Leukotrienbildung von der atopischen Erkrankung beobachtet werden soll, festgelegt werden. So verwendeten wir aufgrund der Ergebnisse aus den Vorversuchen für die klinischen Untersuchungen eine Stimulation mit 1,2  $\mu\text{M}$  A23187 und eine Kombination aus 1,2  $\mu\text{M}$  A23187 und 2,0  $\mu\text{M}$  Arachidonsäure mit einer Stimulationszeit von 5 bzw. 20 Minuten.

#### **D.1.4.2 Einfluss der Zellzahl**

Bei den in der Literatur beschriebenen Stimulationsversuchen für die Bildung der Leukotriene wurde mit sehr unterschiedlichen Zellkonzentrationen gearbeitet. Die Arbeitsgruppen von Abe und Surette setzten bei ihren Versuchen Zellkonzentrationen von bis zu  $10^7$  bzw.  $10^8$  Zellen/ml ein, die Arbeitsgruppe von Miadonna hingegen arbeitete mit wesentlich geringeren Zellkonzentrationen wie z.B.  $2 \times 10^5$  Zellen/ml (Abe et al. 1985; Miadonna 1995; Surette et al. 1994).

Auf Grund dieser Vorgaben untersuchten wir die Auswirkung der variierenden Zellzahl auf die Leukotrienbildung und zeigten, dass eine Erhöhung der Zellzahl im Bereich von  $5,0 \times 10^5$ , bis  $1,2 \times 10^7$  Zellen/ml sowohl einen Einfluss auf den basalen Leukotriengehalt als auch auf die Leukotrienstimulierbarkeit hatte. Es muss daher beachtet werden, dass die Resultate dieser Arbeit nur dann mit den Werten der Literatur verglichen werden können, wenn mit der gleichen Zellkonzentration gearbeitet wurde und die übrigen Reaktionsbedingungen in den Versuchen weitgehend übereinstimmen. Eine Veränderung der Zellkonzentration war in vielen Versuchsreihen, zum Beispiel auch in früheren Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe bei der Stimulation mit Anti-IgE (anti-IgE-Aggregation), ein ausschlaggebender Faktor (Goller 1998; MacGlasham et al. 1983). Möchte man in einem Versuchsansatz sowohl Histamin als auch Cysteinyl-Leukotriene bestimmen, um eine gegenseitige Beeinflussung zu untersuchen, so müssen bei einem Vergleich mit den Daten vorheriger Messungen der Arbeitsgruppe auf alle Fälle die unterschiedlichen Zellzahlen beachtet werden. Für die klinische Untersuchung der Cys-Leukotriene wurde mit einer Zellzahl von  $3 \times 10^6$  Zellen/ml gearbeitet, da hiermit die besten Ergebnisse erzielt wurden.



### D.1.4.3 Einfluss des Hank's Puffers

Ein weiterer Parameter, der sich neben der Zellzahl in den unterschiedlichen Literaturstellen immer wieder unterscheidet, war die Zusammensetzung des Hank's Puffers. Besonders auf den Calcium-Gehalt musste geachtet werden, da dieser Auswirkungen auf die Zellstimulation hat. Das Calcium ist sowohl für die Aktivierung des Enzyms Phospholipase A<sub>2</sub> als auch für die Bindung von FLAP an die Lipoxygenase und damit für dessen Aktivierung der Arachidonsäure-Metabolisierung notwendig (Leff 2001).

Bei der Stimulation mit dem Calcium-Ionophor war der Calcium-Gehalt des Puffers eine wichtige Größe, da das Ionophor ohne Calcium keinen Effekt erzielen kann. Die Tatsache, dass in unseren Versuchen bei Verwendung eines Puffers ohne Calcium die kleinste Menge an Leukotrienen gefunden wurde, bestätigte diese Abhängigkeit. Aufgefallen ist, dass eine kleine Menge an Leukotrienen ohne Ablauf einer Stimulation gemessen wurde. Leukotriene müssten deshalb in Granula oder ähnlichem gespeichert und somit bereits in den Zellen vorhanden gewesen sein. Diese Schlussfolgerung widerspricht indes dem Ergebnis der Untersuchungen, die von Peters-Golden und Dennis durchgeführt wurden (Dennis 1997; Peters-Golden 1998). Diese Arbeitsgruppen haben in Versuchen bewiesen, dass Leukotriene nicht in irgendeiner Form gespeichert vorliegen, sondern bei Bedarf sofort neu gebildet werden. Diese Möglichkeit wird in der Literatur immer wieder kontrovers diskutiert. So wurde von der Arbeitsgruppe Jakschik (1985) die alleinige Stimulation der Zellen mit dem Calcium-Ionophor postuliert, während die Arbeitsgruppe von Werz die Möglichkeit beschrieb, dass durch "Zellstreß" die Aktivierung der 5-Lipoxygenase und damit die Bildung von Mediatoren ausgelöst wird (Wertz et al. 2002).

Da bei der doppelten Menge an Calcium im Puffer geringe Mengen der Cysteinyl-Leukotriene auftraten, liegt die Vermutung nahe, dass das Calcium-Ionophor bei einem Calciumüberschuss andere Bindungsverhältnisse eingehen könnte. Also nicht wie üblich zwei Ionophore plus ein Calciumion, sondern gegebenenfalls auch ein Ionophor plus ein Calciumion. Durch solch eine Blockierung des Ionophors kann kein weiteres Calciumion in den Intrazellulär-Raum der Zelle gelangen, um dort eine Reaktion auszulösen.

So muss bei Vergleichen von Ergebnissen unterschiedlicher Studien wiederum darauf geachtet werden, welcher Puffer bei den einzelnen Untersuchung verwendet wurde. Es wird durch oben beschriebene Versuche gezeigt, dass ein Vergleich der gefundenen Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen, die mit anderen Vorgaben Untersuchungen durchgeführt haben, sehr schwierig ist, da sich immer Arbeitsschritte bzw. -bedingungen unterscheiden.

So wird auch häufig dem Puffer Vitamin C als Antioxidans zugesetzt, was im Falle einer Leukotrienbestimmung durchaus Wirkung zeigt, da es sich bei den Leukotrienen um Verbindungen mit einer Allyl-Struktur handelt und sie damit oxidativ instabil sind. In einigen Literaturangaben wurde TEMPO als Oxidationsschutz von Leukotrienen zugegeben, wobei sich diese Zugabe nur bei der Messung von uLTE<sub>4</sub> etablieren konnte (Nicoll-Griffert et al. 1990; Rodger et al. 1997). Ferner finden sich immer wieder Aussagen über Versuche, bei denen die Zugabe dieses Antioxidans keinen Einfluss auf die Leukotrienbildung nahm (Kumlin et al. 1995).

## **D.2      Diskussion der klinischen Untersuchungen zur Leukotrienbestimmung**

Für die klinische Untersuchung hatten wir aus der Gruppe der Atopiker die Patienten mit saisonaler allergischer Rhinokonjunktivitis ausgewählt. Diese Patienten, die vor allem auf die Pollen von Gräsern und Bäumen allergisch reagierten, eigneten sich besonders gut für die Untersuchungen, da es sich um eine jahreszeitlich abhängige Erkrankung handelt. Im Gegensatz zu den Sommermonaten sind die jeweiligen Probanden in den Wintermonaten symptomfrei. In der pollenreichen Saison, die von Februar bis September dauern kann, zeigten diese Patienten starke Symptome wie brennende Augen und laufende Nase, letzteres häufig mit Niesreiz. Meist schon kurz nach dem Ende des Pollenfluges klangen all diese Symptome völlig ab, und die Patienten waren bis zum nächsten Allergenkontakt beschwerdefrei. Einige der untersuchten Patienten wiesen zusätzlich zu ihrer Pollenallergie auch eine Überempfindlichkeit gegen Hausstaubmilben und/oder Katzenhaare auf. Diese war aber stets schwächer ausgeprägt als die Pollenallergie. Da bezüglich dieser beiden Allergene (Hausstaub/Katze) keine Allergenkarenz der Probanden möglich war, wurde in den Versuchen in der Gruppe der Atopiker zwischen Hausstaubmilben/Katzenhaar- und Pollenallergiker unterschieden. Bei keinem der Patienten aus der Gruppe der Atopiker war eine ganzjährige, starke Rhinokonjunktivitis festzustellen.

Im Gegensatz zu Patienten mit echtem allergischem Asthma bieten Patienten mit saisonaler allergischer Rhinokonjunktivitis den Vorteil für klinische Untersuchungen, dass sie oft ohne

Einnahme von Arzneimitteln auskommen. So konnte der Einfluss einer medikamentösen Therapie auf unsere Untersuchungsergebnisse ausgeschlossen werden. Keiner der Probanden hatte in den letzten sieben Tagen vor einer Blutentnahme antiallergische Arzneimittel eingenommen. Der Einfluss von tageszeitlichen Schwankungen auf die Untersuchungsergebnisse konnte durch einheitliche, morgendliche Blutentnahme ausgeschlossen werden. Ebenso wurde auf eine annähernde einheitliche Verteilung des Geschlechtes in den Probandenkollektiven geachtet (Haen et. al. 1996).

Die Definition der Atopiker erfolgte nach folgenden Kriterien: positive Eigen- und Familienanamnese, Nachweis von positiven Pricktest und RAST-Werten (Plasma). Die Definition der Nicht-Atopiker erfolgte nach den gleichen Kriterien allerdings jeweils als negatives Ergebnis. Die sorgfältige Charakterisierung war notwendig, da eines dieser Kriterien alleine nicht als zuverlässiges Indiz für eine vorliegende atopische Veranlagung ausreichen kann (Ring 1995).

## **D.2.1 Basaler Leukotriengehalt: Vergleich Atopiker und Kontrollen**

Auf den Untersuchungen basierend kann die Behauptung aufgestellt werden, dass der Leukotriengehalt bei den Atopikern einer jahreszeitlichen Abhängigkeit unterliegt.

So lässt sich bei den Atopikern zwischen dem symptomfreien Zeitraum im Winter und dem symptomatischen Zeitraum im Sommer ein Unterschied im basalen Leukotriengehalt feststellen. Der Leukotriengehalt bei den Atopikern ist im symptomfreien Zeitraum geringer als im symptomatischen. Auf Grund dieser Tatsache kann der basale Leukotriengehalt während des symptomreichen Zeitraums als Parameter für die atopische Erkrankung angewandt werden. Beachtet man den Trend zwischen Pollen- und Hausstaub-Atopiker kann die oben genannte Behauptung so eingegrenzt werden, dass der basale Leukotriengehalt nur ein Parameter für Pollen-Atopiker ist. Der Unterschied zwischen diesen Atopikergruppen beruht darauf, dass die Pollen-Atopikergruppe nur während des symptomatischen Zeitraums im Sommer den für diese Gruppe symptomauslösenden Allergenen ausgesetzt ist, während bei den Hausstaub-Atopikern eine ganzjahreszeitliche Belastung besteht. Somit kommt es auch zu einem signifikanten Unterschied zwischen diesen beiden Gruppen im Bezug auf den Leukotriengehalt im symptomarmen Zeitraum. Es wäre zu erwarten gewesen, dass die Leukotrienkonzentration der Hausstaub-Atopiker höher als die der Kontrolle liegt und keine Abhängigkeit von der Jah-

reszeit aufweist. Diese Erwartung wurde durch die gemessenen Daten nicht bestätigt. Deshalb sollte dieser Tatbestand mit einem größeren Patientenkollektiv abgesichert werden, um die Frage, ob ein Unterschied im Leukotriengehalt zwischen Pollen und Hausstaub-Atopikern existiert, zu klären.

Es stellt sich die Frage, ob dieser unterschiedliche Leukotriengehalt auf Grund einer atopischen Erkrankung und/oder einer jahreszeitabhängigen Stimulierbarkeit von Enzymen (Phospholipase A<sub>2</sub>; 5-Lipoxygenase) verursacht wird, die bei der Synthese der Leukotriene beteiligt sind. Solch eine jahreszeitliche Abhängigkeit wurde bereits von Aurnhammer im Bezug auf die Phosphodiesterase-Aktivität (Isoenzym PDE IV), die den cAMP-Gehalt beeinflusst, festgestellt. Bereits Korchak und Abramson konnten einen Zusammenhang zwischen cAMP-Gehalt und Leukotrienbildung zeigen. Danach wird durch einen erhöhten cAMP-Gehalt die Ca<sup>2+</sup>-abhängige Stimulation der Leukotrien-Bildung unterdrückt (Korchak und Abramson 1985).

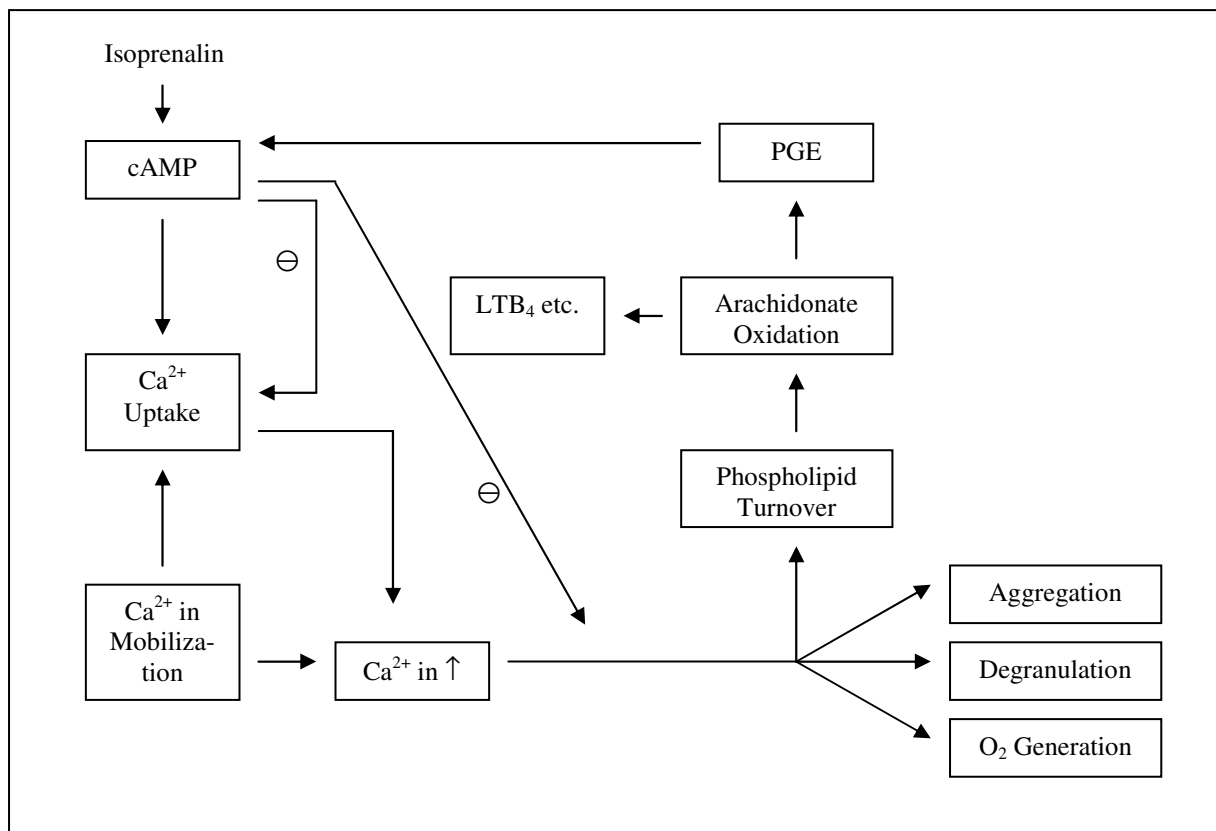


Abb.56: Einfluss von cAMP auf die Leukotrienbildung; Negativer Feedback (Korchak und Abramson 1985)

Die von Aurnhammer nachgewiesene erhöhte Phosphodiesterase-Aktivität hat zu Folge, dass im symptomatischen Zeitraum ein verminderter cAMP-Gehalt vorliegt (Aurnhammer 1996). Geht man davon aus das cAMP die Leukotrienproduktion hemmt (Korchak und Abramson 1985), bedeutet dies, dass es auf Grund der erhöhten Phosphodiesterase-Aktivität bei den Atopikern während der symptomatischen Zeit zu einem verminderten cAMP-Gehalt kommt und damit zu einem erhöhten Leukotriengehalt. Weiter kann man daraus folgern, dass wenn auf Grund der Applikation eines  $\beta$ -Sympathomimetikums der cAMP-Gehalt steigt (Räderer 1996) es damit zu einer verminderten Produktion der stark bronchokonstriktorisches Cysteinyl-Leukotriene kommt. Das hieße, dass ein  $\beta$ -Sympathomimetikum eine entzündungshemmende Wirkung auf Grund der verminderten Produktion von Leukotrienen (vor allem  $LTB_4$ ) aufweist. Bereits die Arbeitsgruppe Yang und Ho stellte solch eine Hemmung der Bronchokonstriktion und der  $LTD_4$ -Synthese nach Gabe des  $\beta_2$ -Agonisten Salbutamol am Meerschwein fest (Yang et al 1999). Zu beachten ist, dass bei Probanden mit einer allergischen Rhinokonjunktivitis im Vergleich zu den gesunden Kontrollpersonen ein erniedrigter basaler cAMP-Gehalt der peripheren Leukozyten und eine verringerte Sensitivität der intrazellulären cAMP-Bildung durch Isoprenalin vorliegt (Goller 1998). Diese Veränderung im  $\beta_2$ -Adrenozeptor/cAMP-System durch die atopische Erkrankung müsste sich in einer verminderten Hemmbarkeit der Leukotrienproduktion durch  $\beta$ -Sympathomimetika und in einer allgemein erhöhten Leukotrienproduktion widerspiegeln. Das würde bedeuten, dass es bei nicht atopischen Asthmatikern bei Anwendung eines  $\beta$ -Sympathomimetikums zu einer größeren Hemmung der Leukotrienproduktion und damit zu einer geringeren Menge an Leukotrienen kommt. Um diese Theorie zu unterstützen müssten Untersuchungen im direkten Zusammenhang zwischen der cAMP-Stimulierung durch Isoprenalin und der Bildung von Leukotrienen gemacht werden.

Die Frage inwieweit eine veränderte Enzymaktivität für diese Ergebnisse (jahreszeitliche Abhängigkeit; Einfluss auf die atopische Erkrankung) verantwortlich sind wird im folgenden Kapitel untersucht. Lans und Melnik dokumentierten bereits eine Störung der Arachidonsäurefreisetzung unabhängig von der Jahreszeit. Sie zeigten, dass sich bei atopischen Zellen weniger Zyklooxygenaseprodukte, als bei nichtatopischen Zellen bildeten (Lans und Rocklin 1989; Melnik und Plewig 1991).

---

## **D.2.2 Stimulierter Leukotriengehalt: Unterschiede Atopiker und Kontrollen**

### **D.2.2.1 Phospholipase A<sub>2</sub>-Stimulierbarkeit**

Auf Grund der gemessenen Daten kann festgehalten werden, dass die Phospholipase A<sub>2</sub>-Stimulierbarkeit bei den Atopiker keiner Beeinflussung einer jahreszeitlich abhängigen Stimulierbarkeit unterliegt, die Kontrollgruppe hingegen schon. Während des symptomatischen Zeitraumes zeigt sich die Beeinflussung durch die atopische Erkrankung.

Beim Vergleich der beiden Hauptgruppen (Kontrolle und Atopiker) zeigten sich Unterschiede im stimulierten Leukotriengehalt (Stimulation mit A23187) während des symptomreichen Zeitraumes. Das bedeutet, dass die Phospholipase A<sub>2</sub> durch die atopische Erkrankung beeinflusst wird. Diese Beeinflussung zeigt sich nur im symptomatischen Zeitraum. Zu diesem Ergebnis kommt man, wenn die Atopikergruppe als eine homogene Einheit angesehen wird, wie bisher in den vorangegangenen Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe. In der vorliegenden Arbeit zeigte sich, dass eine Unterteilung in Pollen- und Hausstaub-Atopiker im Bezug auf die Phospholipase A<sub>2</sub>-Stimulierbarkeit sinnvoll sein kann, da sich bei der Aufspaltung eine tendenzielle Abhängigkeit des Enzyms in Bezug auf die Atopie (Pollenatopiker) bei einem größeren Probandenkollektiv zeigen könnte. Diese Erkenntnis kann zum Beispiel bei der Therapie mit Glucocorticoiden von Interesse sein, wenn man berücksichtigt, dass diese über das Lipocortin die Phospholipase A<sub>2</sub> hemmen.

So kommt es bei den Pollen-Atopikern zu einer scheinbaren Erniedrigung der Leukotrien-Werte. Dieser Trend zeigte sich sowohl bei der Messung mit einer Stimulationszeit von fünf als auch von 20 Minuten. Um diesen Verlauf näher zu untersuchen, sollten weitere Messungen mit einem größeren Probandenkollektiv als bei den vorliegenden Messungen durchgeführt werden. Danach könnte die Behauptung, die Phospholipase A<sub>2</sub> sei abhängig von der atopischen Erkrankung, an Aussagekraft gewinnen. Bestätigt sich allerdings der Trend, sollten auch die Untersuchungen der vorherigen Arbeiten unserer Arbeitsgruppe nochmals durchgeführt werden, um auch dort eine selektivere Aussage in Bezug auf die Atopie treffen zu können.

In dem vorliegenden kleinen Untersuchungskollektiv kommt es zu einer breiten Streuung der einzelnen Werte innerhalb einer Gruppe. Wir führen dies auf mögliche weitere Einflussfakto-

ren zurück, welche auf die allgemeine allergische Reaktion zusätzlich einwirken und in den einzelnen Versuchen nicht weiter berücksichtigt wurden. So könnte zum Beispiel die Ernährung oder der Faktor Rauchen bei den einzelnen Testpersonen eine Rolle spielen, diese Faktoren sollten bei weiteren Untersuchungen mitberücksichtigt werden. Weiterhin muss als Möglichkeit in Betracht gezogen werden, dass zum Beispiel andere Enzyme, wie das Interleukin 3 (IL-3), die Phospholipase A<sub>2</sub> beeinflussen (Miura et al. 1997). Durch Zugabe von Interleukin 3 könnte man dessen Auswirkung auf die Phospholipase A<sub>2</sub> ohne großen instrumentellen Aufwand untersuchen.

### **D.2.2.2 Lipoxigenase-Stimulierbarkeit**

Im Allgemeinen kann bei Stimulationsversuchen durch Zugabe von Arachidonsäure auf die LIP-Stimulierbarkeit geschlossen werden (Werz et al. 2002; Zhang et al. 2002). So wurde auch bei Chabannes nur dann ein Effekt auf die Leukotrienbildung bei den Allergikern erzielt, wenn Arachidonsäure zugegeben wurde (Chabannes et al. 1991). Wie bei dem Enzym Phospholipase A<sub>2</sub> kann bei dem Enzym 5-Lipoxygenase eine eindeutige Stimulierbarkeitsbeeinflussung durch die atopische Erkrankung im symptomatischen Zeitraum gezeigt werden. In diesem Zeitraum zeigt sich sowohl bei der Betrachtung der beiden Gruppen Kontrolle/Atopiker als auch bei der detaillierten Betrachtung der Atopiker (Pollen/Hausstaub) eine Abhängigkeit von der Atopie. So kommt es zu einer signifikanten Veränderung des Leukotrien-Gehaltes bei den Atopikergruppen im Bezug auf die Kontrollgruppe in der symptomreichen Zeit. Damit kann man die Enzymstimulierbarkeit der 5-Lipoxygenase auch als Parameter in der symptomatischen Zeit für die Atopie heranziehen. Um dieses Enzym als einen sensiblen Parameter heranzuziehen müsste noch untersucht werden, ob es sich um einen reversiblen Vorgang handelt, also in dem symptomatischen Zeitraum jeweils ein Anstieg der Stimulierbarkeit nachzuweisen ist und während des symptomarmen Zeitraumes die Stimulierbarkeit auf einen basalen Wert zurückfällt. Dies gilt für das Enzym 5-LIP, das eine jahreszeitliche Stimulierbarkeit, sowohl bei der Kontroll- als auch bei der Atopiker-Gruppe aufweist. Die jahreszeitliche Veränderung des Leukotrien-Gehaltes sollte bei der Gabe des 5-LIP-Hemmstoffs Zileuton im symptomatischen Zeitraum berücksichtigt werden. Zileuton ist zur Zeit nur in den USA für die Prophylaxe bzw. Therapie von chronischem Asthma bronchiale unter dem Arzneimittelnamen Zylor<sup>®</sup> zugelassen. Für zukünftige Arbeiten

wäre interessant, welche Auswirkung die Gabe von Zylot<sup>®</sup> auf die jahreszeitlich unterschiedliche Leukotrienbildung besitzt.

Es ist anzunehmen, dass die erhöhte Lipoxigenase-Stimulierbarkeit nur einer von mehreren Einflussfaktoren in der komplexen, veränderten pharmakologischen Reaktivität bzw. Immunitätslage bei atopischen Patienten ist. Die Bedeutung dieses Einflusses könnte jedoch größer sein als bislang vermutet.

Es kommt zu einer Verschiebung des Cox/LIP-Gleichgewichtes bei den Atopikern und damit kann es zum Beispiel durch die Gabe von nichtsteroidalen Antirheumatika bei diesen Personen zu einer weiteren Verschiebung des Gleichgewichtes in Richtung des LIP-Weges kommen. Damit wird die Bedeutung eines dualen Inhibitors bzw. die von selektiven Inhibitoren der Leukotriene verstärkt. Erste Ansätze wurden bereits mit dem selektiven LT-Antagonisten Montelukast (Singulair<sup>®</sup>) durchgeführt. Er ist bisher bei der Indikation des leichten bis mittelgradigen chronischen Asthma bronchiale zugelassen und wird als begleitende Therapie eingesetzt, wenn mit inhalativen Glucocorticoiden kein ausreichender Effekt erzielt wird. Unter Berücksichtigung dieser Überlegungen könnte der Einsatz von Leukotrienantagonisten bei Atopikern sinnvoller sein als bei nicht allergisch bedingtem Asthma bronchiale.

Es sind einige Untersuchungen in der Literatur aufgeführt, die sich mit dem Zusammenhang Leukotriene und Asthma beschäftigen. Immer wieder kommt es dabei zu gegensätzlichen Aussagen, bei genauer Betrachtung einiger Studien kann festgestellt werden, dass sie bei unterschiedlichen Rahmenbedingungen durchgeführt wurden. Damit kamen wir zu dem Schluss, dass die Bedingungen der einzelnen Studien genauestens betrachtet werden müssen, bevor ein Vergleich bzw. eine Schlussfolgerung daraus gezogen werden sollte. Es sollte immer mitberücksichtigt werden, ob es sich um ein allergisches oder nicht allergisches Asthma bronchiale handelt. So kann ein widersprüchliches Ergebnis der Studie wie bei den Arbeitsgruppen Kohi und Hodges zustande gekommen sein (Hodges et al. 1988; Kohi et al. 1990). Leider wird auch auf eine medikamentöse Behandlung während der Studien meistens nicht eingegangen. So liegt die Vermutung nahe, dass Probanden während eines akuten Asthmaanfalles medikamentös behandelt werden, dieses aber leider in den Studien keine Berücksichtigung findet.

Auf Grund unserer Versuchsergebnisse muss auch die Jahreszeit bei Leukotrienuntersuchungen als wichtige Determinante in Bezug auf die Rahmenbedingungen angesehen werden.



## E Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Bildung der Cysteinyl-Leukotriene bei Patienten mit saisonaler allergischer Rhinokonjunktivitis. Untersucht wurden der basale Leukotriengehalt und die stimulierbare Leukotrienkonzentration. Die Untersuchungen wurden sowohl im symptomfreien Intervall (Winter), als auch im akuten Stadium der Erkrankung (Sommer) durchgeführt, um eventuelle jahreszeitliche Unterschiede erfassen zu können. In unserem Arbeitskreis wurde bereits das Vorliegen jahreszeitlicher Schwankungen im  $\beta_2$ -Adrenozeptor/cAMP-System (Bleise 1993) und der PDE-Gesamtaktivität bei Atopikern bewiesen (Aurnhammer 1998). Zudem übt das Stadium der Erkrankung einen gewissen Einfluss auf das Ausmaß der spontanen Histaminfreisetzung aus (Räderer 1996).

Im ersten Teil der Arbeit wurde die Methodik zur Leukotrienmessung etabliert und an die vor Ort befindlichen analytischen Möglichkeiten angepasst.

1. Zur Bestimmung der Cysteinyl-Leukotriene wurde wie beschrieben die RP-HPLC als Messmethode gewählt. Der pH-Wert des Fließmittels ist hierbei entscheidend für die reproduzierbare Auftrennung der einzelnen Leukotriene. Die in unserem Labor etablierte und nachfolgend validierte Methode lässt sich folgendermaßen beschreiben: Gradientenmethode unter Verwendung von Fließmittel I (EDTA 0,05 %, Eisessig 2,5 % und aqua tridest. 97,45 %) und Methanol.

Verlauf der Fließmittelzusammensetzung im Zuge der Gradientenbestimmung:

$t_{0-20 \text{ min}} = 60 \% \text{ MeOH}/40 \% \text{ FM I}$  ;  $t_{20,1-30 \text{ min}} = 70 \% \text{ MeOH}/30 \% \text{ FM I}$  ;  $t_{30,1-50 \text{ min}} = 85 \% \text{ MeOH}/15 \% \text{ FM I}$

Die Detektion erfolgte unter Verwendung eines UV-Spektrophotometers bei 285 nm, als analytische Trennsäule kam eine ODS-Hypersil C<sub>18</sub> (Thermo Fisher Scientific) mit 250 x 4,6 mm Innendurchmesser und 3  $\mu\text{m}$  Partikelgröße zum Einsatz.

Elutionsreihenfolge der Cysteinyl-Leukotriene:

LTC<sub>4</sub>  $34,8 \pm 1,32 \text{ min}$ ; LTD<sub>4</sub>  $37,3 \pm 1,8 \text{ min}$ ; LTE<sub>4</sub>  $39,5 \pm 2,06 \text{ min}$

Vor der Messung mittels HPLC war es erforderlich eine Aufreinigung der aus PBL gewonnen Proben mit C<sub>18</sub>-Sep-Pak<sup>®</sup>-Einmalkartuschen (Waters) durchzuführen.

2. Die Messung der Cysteinyl-Leukotriene kann mit einer Vielzahl von Messmethoden durchgeführt werden. GC-MS, EIA, ELISA und HPLC finden in der Praxis am häufigsten Anwendung. Wichtige Entscheidungskriterien für die Auswahl der geeigneten Methode im Hinblick auf die nachfolgende klinische Studie waren die Verfügbarkeit einer HPLC-

Anlage, die Nachweisgrenze, die Art der Bestimmung der Leukotriene (Einzelbestimmung oder Gesamtwert) und der erforderliche Materialaufwand.

Betrachtet man die mit der angewandten Methodik erzielbare Nachweisgrenze so liegt der EIA-Kit mit 0,013 ng/ml vor dem ELISA-Kit mit 0,04 ng/ml, gefolgt von der HPLC mit 20 ng/ml. Der Vorteil der Bestimmung mittels HPLC liegt in der separaten Erfassbarkeit der einzelnen Leukotriene (LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub> und LTE<sub>4</sub>) und der zusätzlichen Möglichkeit einer Reinheitsprüfung der bestimmten Substanzen unter Zuhilfenahme des während der Messung erstellten UV-Spektrums. Bei Verwendung kommerzieller EIA- oder ELISA-Kits kann nur der Summenwert der genannten Substanzen angegeben werden. Verwendung für die klinischen Untersuchungen fand schließlich der EIA-Kit der Firma Cayman, da er die beste Nachweisgrenze lieferte. Zur separaten Bestimmung der einzelnen Cys-Leukotriene wurde eine HPLC-Methode entwickelt und validiert.

3. Die Bildung und Freisetzung der Cys-Leukotriene lässt sich sowohl durch immunologische (Anti-IgE, Melittin) als auch nicht-immunologische Reagenzien (Calcium-Ionophor A23187, Arachidonsäure) stimulieren. Werden Calcium-Ionophor und Arachidonsäure kombiniert, bzw. wird Calcium-Ionophor isoliert zur Stimulation verwendet wird im Ansatz zwanzigmal so viel Cys-Leukotriene gebildet.
4. Im Rahmen der Versuche konnte eine zeitliche und konzentrationsbedingte Abhängigkeit der Leukotrienbildung vom jeweils verwendeten Reagens gezeigt werden. Eine Steigerung der Leukotrienproduktion im Versuch ist eng verknüpft mit einer Verlängerung der Stimulationszeit, bzw. einer Erhöhung der Konzentration des zugesetzten Stimulationsreagenzes. Das gleiche Resultat wird über eine in der Ausgangssuspension erhöhte Zellzahl erzielt. Die besten Stimulationsergebnisse wurden mit einer Calciumkonzentration von 244,1 mg/l im verwendeten Puffer erhalten.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden im Rahmen zweier aufeinander folgender Versuchsreihen klinische Untersuchungen mit identischem Probandenkollektiv durchgeführt. Die Versuche erfolgten zunächst im symptomfreien und anschließend während des akuten Stadiums der allergischen Rhinokonjunktivitis. Das Probandenkollektiv wurde in zwei Hauptgruppen unterteilt. Die erste Gruppe (Kontrollgruppe) zeigte in Bezug auf die angewandte Allergiediagnostik keine Hinweise auf eine Atopie. Die zweite Gruppe (Atopiker) konnte in zwei Untergruppen unterteilt werden. Eine Teilgruppe bestand lediglich aus Pollenallergikern, in der anderen fanden sich auf Hausstaub, bzw. Katzenhaare sensibilisierte Patienten. Die klinische Studie führte zu folgenden Ergebnissen:

1. Der basale Leukotriengehalt unterliegt nur bei den atopischen Patienten einer jahreszeitlichen Abhängigkeit. Während des symptomatischen Zeitraums ist er erhöht, betrachtet man den symptomfreien Zeitraum besteht kein Unterschied zur Kontrollgruppe. Bei der Kontrollgruppe wurde keine signifikante Differenz zwischen den beiden Zeiträumen festgestellt.

Während der Allergiesaison kommt es bei Atopikern im Gegensatz zur Kontrollgruppe zu einer gesteigerten Bildung von Cys-Leukotrienen. Dieser Effekt wird ausschließlich durch die Subpopulation der Pollenallergiker verursacht.

2. Die Stimulierbarkeit der Phospholipase A<sub>2</sub> unterliegt, wie die Untersuchung der Kontrollgruppe zeigt einer jahreszeitlichen Beeinflussung. Während des symptomatischen Zeitraumes ist sie in dieser Population im Vergleich zum basalen Leukotriengehalt erhöht. Dieser Befund lässt sich in der Gruppe der Atopiker nicht bestätigen, es zeigt sich nur eine Abhängigkeit der Atopie während der Allergiesaison.

Die Stimulierbarkeit der 5-Lipoxygenase ist in beiden Gruppen während des symptomatischen Zeitraumes erhöht. Beide Gruppen zeigten grundsätzlich eine erhöhte Stimulierbarkeit der 5-Lipoxygenase, lediglich in der Subgruppe der Pollenallergiker war diese reduziert.

## F Tabellenanhang

| Proband | männl/<br>weibl. | Alter<br>[J] | Pricktest |                    |                           | Rast (sx1)<br>[kU/l] |
|---------|------------------|--------------|-----------|--------------------|---------------------------|----------------------|
|         |                  |              | Pollen    | Schimmel-<br>pilze | Inhaltations-<br>antigene |                      |
| A 1     | w                | 30           | ∅         | ∅                  | H++                       | 1,87                 |
| A 2     | w                | 24           | B++       | ∅                  | Katz+                     | 33,40                |
| A 3     | w                | 36           | BG++      | ∅                  | ∅                         | 46,90                |
| A 4     | m                | 41           | -         | -                  | -                         | 2,83                 |
| A 5     | m                | 24           | BG+++     | +                  | H+                        | 18,50                |
| A 6     | m                | 30           | GBK+++    | ∅                  | Katz+ H+                  | 23,50                |
| A 7     | w                | 28           | GBK+      | ∅                  | H(+)                      | 6,71                 |
| A 8     | m                | 33           | GB++      | ∅                  | ∅                         | 7,83                 |
| A 9     | m                | 24           | G ++      | ∅                  | ∅                         | 38,40                |
| A 10    | w                | 33           | GKB++     | ∅                  | ∅                         | 30,7                 |
| A 11    | m                | 28           | BK +      | (+)                | H+                        | 0,59                 |

Tabb.17: Klinische Charakteristika der Patienten (Atopiker)

K: Kräuter; Katz: Katzenhaare (-schuppen); A: Atopiker; B: Bäume; G: Gräser; H: Hausstaubmilben

| Proband | männl-<br>/weibl. | Alter<br>[J] | Pricktest |                    |                           | RAST (sx1)<br>[kU/l] |
|---------|-------------------|--------------|-----------|--------------------|---------------------------|----------------------|
|         |                   |              | Pollen    | Schimmel-<br>pilze | Inhaltations-<br>antigene |                      |
| Ko 1    | w                 | 23           | ∅         | ∅                  | ∅                         | 0,79                 |
| Ko 2    | m                 | 39           | ∅         | ∅                  | ∅                         | 0,54                 |
| Ko 3    | w                 | 30           | ∅         | ∅                  | ∅                         | 0,49                 |
| Ko 4    | w                 | 30           | ∅         | ∅                  | ∅                         | 0,53                 |
| Ko 5    | w                 | 30           | ∅         | ∅                  | ∅                         | 0,47                 |
| Ko 6    | w                 | 24           | ∅         | ∅                  | ∅                         | 0,60                 |
| Ko 7    | w                 | 25           | ∅         | ∅                  | ∅                         | 0,46                 |
| Ko 8    | w                 | 32           | ∅         | ∅                  | ∅                         | 0,46                 |
| Ko 9    | m                 | 36           | ∅         | ∅                  | ∅                         | 0,49                 |

Tabb.18: Klinische Charakteristika der Kontrollpersonen (gesunde Probanden)

K: Kräuter; Katz: Katzenhaare (-schuppen); Ko: Kontrolle; B: Bäume; G: Gräser; H: Hausstaubmilben

---

## G Literaturverzeichnis

Abe M, Kawazoe Y, Shigematsu N (1985): Influences of salts on high-performance liquid chromatography of leukotrienes. *Anal Biochem* 144: 417-422

Aurnhammer P (1999): Saisonale Veränderungen der Phosphodiesterase-Aktivität bei Heuschnupfen; das Isoenzymmuster in peripheren Blutleukozyten. Roderer-Verlag, Regensburg

Austen KF (1978): Homeostasis of effector systems which can also be recruited for immunologic reactions. *J Immunol* 121: 793-85

Beil D, Kinder H, Paschke A, Steinhart H, Vieluf D, Behrendt H, Ring J (1998): Determination of histamine and leukotrienes from basophils in cell supernatants by high-performance liquid chromatography. *J Chrom Sci* 36: 284-286

Berridge MJ, Irvine RF (1984): Inositol triphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction. *Nature* 312: 315-321

Bergström S, Danielsson H, Samuelsson B (1964): The enzymatic formation of prostaglandin E<sub>2</sub> from arachidonic acid. *Biochim Biophys Acta* 90: 207-210

Bleise U (1993):  $\beta_2$ -Adrenozeptoren auf peripheren Blutleukozyten: Untersuchungen zum Einfluß der Versuchsbedingungen, UVA-Bestrahlung und atopischer Veranlagung. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München

Bonney RI, Narnus P, Davies P, Humes JL (1979): Antigen-antibody complexes stimulate the synthesis and release of prostaglandins by mouse peritoneal macrophages. *Prostaglandins* 18: 605-616

Boraman BJ, Huang CK, Mackin WM, Becker EL (1984): Receptor-mediated activation of a phospholipase A<sub>2</sub> in rabbit neutrophil plasma membrane. *Proc Natl Acad Sci USA* 81: 767-770

Borgeat P, Hamberg M, Samuelsson B (1976): Transformation of arachidonic acid and homo- $\gamma$ -linolenic acid by rabbit polymorphonuclear leukocytes. *J Biol Chem* 251: 7816-7820

Borgeat P, Samuelsson B (1979 a): Arachidonic acid metabolism in polymorphonuclear leukocytes: Unstable intermediate in formation of dihydroxy acid. *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 3213-3217

Borgeat P, Samuelsson B (1979 b): Transformations of arachidonic acid by rabbit polymorphonuclear leukocytes. *J Biol Chem* 254: 2643-2646

Borgeat P, Samuelsson B (1979 c): Metabolism of arachidonic acid in polymorphonuclear leukocytes. Structural analysis of novel hydroxylated compounds. *J Biol Chem* 254: 7865-7869

Borgeat P, Samuelsson B (1979 d): Arachidonic acid metabolism in polymorphonuclear leukocytes: Effects of ionophore A23187. *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 2148-2152

Borgeat S, Picard S (1988): 19-hydroxyprostaglandin B<sub>2</sub> as an internal standard for one-line extraction-high-performance liquid chromatography analysis of lipoxygenase products. *Anal Biochem* 171: 283-289

Bosch H (1980): Intracellular phospholipase A. *Biochim Biophys Acta* 604: 191-246

Braquet M, Ducouso R, Chapelat MY, Borgeat P, Braquet P (1985): Transmembrane signal in the secretory process of A23187-stimulated human leukocytes. *Proc Leu Lipoxin Plenum Press New York London*: 125-132

Brocklehurst WE (1953): Occurrence of an unidentified substance during anaphylactic shock in cavy lung. *J Physiol* 120: 16

Brocklehurst WE (1960): The release of histamine and formation of a slow-reacting substance (SRS-A) during anaphylactic shock. *J Physiol* 151: 416-435

Brocklehurst WE (1962): Slow reacting substance and related compounds. *Prog Allergy* 6: 539-558

Bull HA, Courtney PF, Bunker CB, Rustin MH, Pearce FL, Dowd PM (1993): Basophil mediator release in atopic dermatitis. *J Invest Dermatol* 100: 305-309

Burgio GR (1982) : «Atopie»-Geburtsjahr 1923. *Med Welt* 33: 863-865

Burke JA, Levi R, Guo ZG, Corey EJ (1982): Leukotrienes C<sub>4</sub>, D<sub>4</sub> and E<sub>4</sub> : Effects on human and guinea pig cardiac preparations in vitro. *J Pharm Exper Therap* 221: 235-241

Butler JM, Chan SC, Stevens S, Hanifin JM (1983): Increased leukocyte histamine release with elevated cyclic AMP-phosphodiesterase activity in atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 71: 490-497

Caymann Chemical (2001): Arbeitsanleitung ; Cysteinyl-Leukotriene EIA-Kit. Cayman Chemical Company

Chabannes B, Hosni R, Moliere P, Croset M, Pacheco Y, Perrin-Fayolle M, Lagarde M (1991): Leukotriene B<sub>4</sub> level in neutrophils from allergic and healthy subjects stimulated by low concentration of calcium acid and possible endogenous source. *Biochim Biophys Acta* 1093: 47-54

Chavis C, Vyve T, Chanez P, Farce M, Bousquet J, Michel FB, Godard P (1997): Leukotriene E<sub>4</sub> plasma levels in adult asthmatic patients with variable disease severity. *Allergy* 52: 589-592

Clancy RM, Hugli TE (1993): The extraction of leukotrienes (LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub> and LTE<sub>4</sub>) from tissue fluids: The metabolism of these mediators during IgE-dependent hypersensitivity reactions in lung. *Anal Biochem* 33: 30-39

Clegg RG, Church MK, Holgate ST (1985): Histamine secretion from human skin slices induced by anti-IgE and artificial secretagogues and the effects of sodium cromoglycate and salbutamol. *Clin Allergy* 15: 321-328



Conroy MC, Orange RP, Lichtstein LM (1976): Release of slow reacting substance of anaphylaxis (SRS-A) from human leukocytes by calcium ionophore A23187. *J Immunol* 116: 1677-1681

Corey EJ, Clark DA, Goto D, Marfat A, Mioskowski C, Samuelsson B, Hammarström S (1980): Stereospecific total synthesis of "slow reacting substance" of anaphylaxis, leukotriene C-1. *J Am chem Soc* 102: 1436-1439

Dahlén SE, Hedqvist P, Hammarström S, Samuelsson B (1980): Leukotrienes are potent constrictors of human bronchi. *Nature* 288: 484-486

Dawson M, McGee CM (1990): Comparison between ethanol and methanol for the reversed phase high-performance liquid chromatographic analysis of Leukotrien B<sub>4</sub> and its metabolites in cell incubation supernatants. *J Chrom* 322: 379-386

Deber CM, Pfeiffer DR (1976): Ionophore A23187. Solution conformation of the calcium complex and free acid deduced from proton and carbon-13 nuclear magnetic resonance studies. *Biochem* 15: 132-141

Dedkova EN, Sigova AA, Zinchenko VP (2000): Mechanism of action of calcium ionophores on intact cells: Ionophore-resistant cells. *Membr Cell Biol* 13: 357-368

Dennis EA (1997): The growing phospholipase A<sub>2</sub> superfamily of signal transduction enzymes. *Trends Biochem Sci* 22: 1-2

Dolye MJ, Eichhold TH, Hynd BA, Weisman SM (1990): Determination of leukotriene B<sub>4</sub> in human plasma by gas chromatography using a mass selective detector and a stable isotope labelled internal standard. Effect of NE-11740 on arachidonic acid metabolism. *J Pharm Biomed Anal* 8: 137-142

Drazen JM, Austen KF (1974): Effects of intravenous administration of slow-reacting substance of anaphylaxis, histamin, bradykinin and prostaglandin F<sub>2</sub> on pulmonary mechanics in the guinea pig. *J Clin Invest* 53: 1679-1685

Fauler J, Neumann C, Tsikas D, Fröhlich JC (1992): Enhanced synthesis of cysteinyl leukotrienes in psoriasis. *J Invest Dermatol* 99: 8-11

Fauler J, Neumann C, Tsikas D, Fröhlich JC (1993): Enhanced synthesis of cysteinyl leukotrienes in atopic dermatitis. *Br J Dermatol* 128: 627-630

Feldberg W, Kellaway CH (1938): Liberation of histamine and formation of lysocithin-like substances by cobra venom. *J Physiol* 94: 187-226

Fonteh AN, Chilton FH (1993): Mobilization of different arachidonate pools and their roles in the generation of leukotrienes and free arachidonic acid during immunologic activation of mast cells. *J Immunol* 150: 563-570

Ford-Hutchinson AW, Bray MA, Doig MV, Shipley ME, Smith MJH (1980): Leukotriene B<sub>4</sub>, a potent chemokinetic and aggregating substance released from polymorphonuclear leukocytes. *Nature* 286: 264-265

Ford-Hutchinson AW (1985): Leukotrienes: Biological properties, evidence for specific receptor sites and evidence for the involvement of leukotrienes in pathological situations. *Biochem Arach Meta* 125: 269-285

Ford-Hutchinson AW (1990): Leukotriene B<sub>4</sub> in inflammation. *Crit Rev Immunol* 10: 1-12

Foreman JC, Garland LG (1974): Desensitization in the process of histamine secretion induced by antigen and dextran. *J Physiol* 239: 381-391

Fort W, Hentschler D, Rummel W, Starke K (1993): Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. BI-Wiss. Verlag 6. Auflage: 816-817

Funk CD (2001): Prostaglandins and leukotrienes: Advances in eicosanoid biology. *Science* 294: 1871-1878

Goetzl EJ (1982): The conversion of leukotriene C<sub>4</sub> to isomers of leukotriene B<sub>4</sub> by human eosinophil peroxidase. *Biochem Biophys Res Commun* 106: 270-275

Goetzl EJ, Payan DG, Goldman W (1984): Immunopathogenetic roles of leukotrienes in human diseases. *J Clin Immun* 4: 79-84

Goldstein IM, Horn JK, Kaplan HB, Weissmann G (1974): Calcium-induced lysozyme secretion from human polymorphonuclear leukocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 60: 804-812

Goller C (1999): Allergische Rhinokonjunktivitis: Das  $\beta_2$ -adrenozeptor/cAMP-System und die Histaminfreisetzung, Roderer-Verlag, Regensburg

Goodwin JS (1985): Prostaglandins and Immunity. Martinius Nighoff Publishing, Boston: 179-202

Haen E, Bleise U, Przybilla B (1992): Impairment of the  $\beta$ -adrenergic system of peripheral blood leukocytes in atopic patients with seasonal allergic rhinoconjunctivitis. *Int Arch Allergy Immunol* 99: 435-438

Haen E, Bleise U, Przybilla B (1997): Some alterations of the leucocyte  $\beta_2$ -adrenoceptor/cAMP-system in patients with seasonal allergic rhinoconjunctivitis are related to disease activity. *Clin Exp Allergy* 27: 787-795

Haen E, Hauck R, Emslander HP, Langenmayer I, Liebl B, Schopohl J, Remien J, Furchmann G (1991): Nocturnal asthma,  $\beta_2$ -adrenoceptors on peripheral mononuclear leukocytes, cAMP- and cortisol-plasma concentrations. *Chest* 100: 1239-1245

Hagmann W, Denzlinger C, Keppler D (1985): Production of peptide leukotrienes in endotoxin shock. *FEBS Lett* 180: 309-399

Han HJ, Lee JH, Park SH, Choi HJ, Yang IS, Mar WC, Kang SK, Lee HJ (2000): Effect of bee venom and its melittin on apical transporters of renal proximal tubule cells. *Kid Blood Press* 23: 393-399

---

Hansson G, Lingren JA, Dahlén SE, Hedqvist P, Samuelsson B (1981): Identification and biological activity of novel  $\omega$ -oxidatized metabolites of leukotriene B<sub>4</sub> from human leukocytes. *FEBS Lett* 130: 107-112

Hansson G, Malmsten C, Radmark O (1983): The leukotrienes and other lipoxygenase products. In: *New Comprehensive Biochemistry Vol 5, Prostaglandins and Related Substances*, Eds Pace Asciak C, Granström E, Elsevier Science Publishers: 127-164

Hatzelmann A, Fruchtmann R, Mohrs KH, Raddatz S, Müller-Pedinghaus R (1994): Ca<sup>2+</sup> ionophore A23187-stimulated secretion of azurophil granules in human polymorphonuclear leukocytes is largely mediated by endogenously formed leukotriene B<sub>4</sub>. *Biochem Pharm* 48: 31-39

Hermann T, Steinhilber D, Roth H (1987): Determination of leukotriene B<sub>4</sub> by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *J Chrom* 416: 170-175

Hock CE, Loprest L, Lefer AM (1984): Inhibitors of lipoxygenase products improve survival in traumatic shock. *Prostaglandins* 28: 557-571

Hodges MK, Weller PF, Drazen JM (1988): Heterogeneity of leukotriene C<sub>4</sub> production by eosinophils from normal subjects. *Am Rev Respir Dis* 138: 799-804

Ibe BO, Campbell WB (1987): Synthesis and metabolism of leukotrienes by human endothelial cells: Influence on prostacyclin release. *Biochim Biophys Acta* 960: 309-321

Ishizaka K, Ishizaka T, Lee EM (1966): Physicochemical properties of reaginic antibody. *J Allergy* 37: 336

Ishizaka T, Ishizaka K, Conrad DN, Froese A (1978): A new concept triggering mechanisms of IgE-mediated histamine release. *J Allergy Clin Immunol* 61: 320-330

Jakschik BA, Harper T, Murphy RC (1982): Leukotrienes C<sub>4</sub> and D<sub>4</sub> formation by particulate enzymes. *J Biol Chem* 257: 5346-5349

---

Jakschik BA, Kuo CG, Wei YF (1985): Enzymatic formation of leukotrienes. *Biochem Arach Meta* 125: 51-75

Jaschik BA, Sun FF, Lee L, Steinhoff MM (1980): Calcium stimulation of novel lipoxigenase. *Biochem Biophys Res Commun* 95: 103-110

Johnson MM, Vaughn B, Triggiani M, Swan DD, Fonteh AN, Chilton FH (1999): Role of arachidonyl triglycerides within lipid bodies in eicosanoid formation by human polymorphonuclear cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 21: 253-258

Kajita T, Yiu Y, Mita H, Taniguchi N, Saito H, Mishima T, Shida T (1985): Release of Leukotriene C<sub>4</sub> from human eosinophils and its relation to the cell density. *Int Arch Allergy Appl Immun* 74: 406-410

Kamohara M, Takasaki J, Matsumoto M, Matsumoto, Saito T, Soga T (2001): Functional characterization of cysteinyl leukotriene CysLT<sub>2</sub> receptor on human coronary artery smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Com* 287: 1088-1092

Kaplan HB, Edelson HS, Friedman R, Weissmann G (1982): The roles of degranulation and superoxide anion generation in neutrophil aggregation. *Biochem Biophys Acta* 721: 55-63

Kellaway CH, Trethewie ER (1940): The liberation of slow-reacting smooth muscle-stimulating substance in anaphylaxis. *Quaterty J Exp Physiol* 30: 121-145

Knol EF, Mul FPJ, Hooibrink B, Verhoeven AJ, Roos D (1991): Characterisation of the role of Ca<sup>2+</sup> in the stimulation of human basophilic granulocytes. *J Allergy Clin Immunol* 87: 242

Knol EF, Verhoeven AJ, Roos D (1993): Stimulus secretion coupling in human basophilic granulocytes. *Clin Exp Allergy* 23: 471-480

Köller M, Schönfeld W, Knöller J, Bremm KD, König W, Spur B, Crea A, Peters W (1985): The metabolism of leukotrienes in blood plasma studied by high-performance liquid chromatography. *Biochem Biophys Acta* 833: 128-134

Kohi F, Miyagawa H, Agrawal D, Bewtra A, Townley R (1990): Generation of Leukotrien B<sub>4</sub> and C<sub>4</sub> from granulocytes of normal controls, allergic rhinitis, and asthmatic subjects. *Ann Allergy* 65: 228-232

Korchak HM, Abramson SB (1985) : The role of arachidonic acid metabolites in the regulation of neutrophil function. *Prostaglandins and Immunity*: 179-204

Kourie JJ, Shorthouse AA (2000): Properties of cytotoxic peptid formed ion channels. *AJP Cell Physiol* 278: 1063-1087

Kragballe K, Voorhees JJ (1983): Arachidonic acid and leukotrienes in dermatology. *J Invest Dermatol* 81: 293-296

Kromidas S (1999): Validierung in der Analytik. Wiley-VCH-Verlag, Weinheim, New York, Chichester, Toronto

Kumlin M (1997): Measurements of leukotrienes in the urine: Strategies and applications. *Allergy* 52: 142-135

Kumlin M, Stensvad F, Larsson L, Dahlen B, Dahlen SE (1995): Validation and application of a new simple strategy for measurements of urinary leukotriene E<sub>4</sub> in humans. *Clin Exp Allergy* 25: 467-479

Laclos BF, Braquet P, Borgeat P (1984): Characteristics of leukotriene and hydroxy eicosatetraenoic acid synthesis in human leukocytes in vitro: Effect of arachidonic acid concentration. *Prost Leuk Med* 13: 47-52

Lans DM, Rocklin RE (1989): Dysregulation of arachidonic acid release and metabolism by atopic mononuclear cells. *Clin Exp Allergy* 19: 37-44

Lee CW, Lewis RA, Corey EJ, Barton A, Oh H, Tauber AJ, Austen KF (1982): Oxidative inactivation of leukotriene C<sub>4</sub> by stimulated human polymorphonuclear leukocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 79: 4116-4170

Lee YS, Park HS, Lee SJ, Choi MU (2001): Melittin exerts multiple effects on the release of free fatty acids from L1210 cells: Lack of selective activation of phospholipase A<sub>2</sub> by melittin. *Arch Biochem Biophys* 389: 57-67

Leff AR (2001): Discovery of leukotrienes and development of antileukotriene agents. *Ann All Ast Immunol* 86: 4-8

Letts LG, Piper PJ (1982): The actions of leukotrienes C<sub>4</sub> and D<sub>4</sub> on guinea-pig isolated hearts. *Br J Pharmacol* 76: 169-177

Lewis RA, Drazen JM, Austen KF (1981): Contractile activities of structural analogs of leukotrienes C and D: Role of the polar substituents. *Proc Natl Acad Sci USA* 78: 4579-4583

Levine L, Morgan RA, Lewis RA, Austen KF, Clark DA, Marfat A, Corey EJ (1981): Radioimmunoassay of the leukotrienes of slow reacting substance of anaphylaxis. *Proc Natl Acad Sci USA* 78: 7692-7696

Lichtenstein LM, Olser AG (1964): Studies on the mechanisms of hypersensitivity phenomena. IX. Histamine release from human leukocytes by ragweed pollen antigen. *J Exp Med* 120: 507-530

Lindberg A, Tornhamre S, Mugnai S, Lingren AJ (1998): Ionophore A23187- induced leukotriene biosynthesis in equine granulocytes-neutrophils, but not eosinophils requires exogenous arachidonic acid. *Biochim Biophys Acta* 1391: 247-255

Liu P, Davis P, Lui H, Krishnan TR (1999): Evaluation of cytotoxicity and absorption enhancing effects of melittin – a novel absorption enhancer. *Eur J Pharm Biopharm* 48: 85-87

Lord A, Charlson S, Letts LG (1985): Leukotriene F<sub>4</sub> and the release of arachidonic acid metabolites from guinea lung in vitro. *Prostaglandins* 29: 651-660

MacGlasham D, Mogowski M, Lichtenstein LM (1983): Studies of antigen binding on human basophils. II. Continued expression of antigen-specific IgE during antigen-induced desensitization. *J Immunol* 130: 2337-2342

Mansour M, Agha A (1999): Inhibition of calcium ionophore-stimulated leukotriene generation from intact human neutrophils by captopril. *Res Comm Mol Path Phram* 104: 345-361

Marone G, Giugliano R, Lembo G, Ayala F (1986): Human basophil releasability. II. Changes in basophil releasability in patients with atopic dermatitis. *J Invest Dermatol* 87: 19-23

Mathews WR, Bundy GL, Wynalda MA, Guido DM, Schneider WP, Fitzpatrick FA (1988): Development and comparative evaluation of radioimmunoassay and gas chromatographic/mass spectrometric procedures for determination of Leukotriene B<sub>4</sub>. *Anal Chem* 60: 349-353

Melnik B, Plewig G (1991): Immunregulatorische Bedeutung der E-Prostaglandine bei Ato-  
pie. *Hautarzt*: 211-214

Mencia-Huerta JM, Razin E, Ringel EW, Corey EJ, Hoover D, Austen KF, Lewis RA (1983): Immunologic and ionophore-induced generation of leukotriene B<sub>4</sub> from mouse bone marrow-derived mast cells. *J Immunol* 130: 1885-1890

Metz SA, Hall ME, Harper TW, Murphy RC (1982): Rapid extraction of leukotrienes from biologic fluids and quantitation by high-performance liquid chromatography. *J Chrom* 233: 193-201

Miadonna A, Milazzo N, Lorini M, Marchesi E, Tedeschi A (1995): Antiallergic activity of loratadine: Inhibition of leukotriene C<sub>4</sub> release from human leucocytes. *Clin Exp Allergy* 25: 364-370

Michelassi F, Landa L, Hill ED, Lowenstein E, Watkins WD, Petkau AJ, Zapol WM (1982): Leukotriene D<sub>4</sub>: A potent coronary artery vasoconstrictor associated with impaired ventricular contraction. *Science* 217: 841-843

Miller DK, Gillhard JW, Vickers PJ (1990): Identification and isolation of a membrane protein necessary for leukotriene production. *Nature* 343: 278-281



Miura K, Hubbard W, MacGlashan W (1998): Phosphorylation of cytosolic phospholipase A<sub>2</sub> by IL-3 is associated with increased free arachidonic acid generation and leukotriene C<sub>4</sub> release in human basophils. *J Allergy Clin Immunol* 102: 512-520

Morlion BJ, Torwesten E, Kuhn KS, Puchstein C, Fürst P (2000): Cysteinyl-leukotriene generation as a biomarker for survival in the critically ill. *Crit Care Med* 28: 3655-3658

Morris HR, Taylor GW, Piper PJ, Sirois P, Tippins JR (1978): Slow-reacting substance of anaphylaxis. Purification and characterisation. *FEBS Lett* 87: 203-20

Murphy RC, Hammerström S, Samuelsson B (1979): Leukotriene C: A slow-reacting substance from murine mastocytoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 4275-4279

Neogen (2001): Arbeitsanleitung; Leukotrien C<sub>4</sub>/D<sub>4</sub>/E<sub>4</sub>. Neogen Corporation

Nicoll-Griffith D, Zamboni R, Rasmussen JB, Ethier D, Charlson S, Tagari P (1990): BIO-fully automated sample treatment high-performance liquid chromatography and radioimmunoassay for leukotriene E<sub>4</sub> in human urine from asthmatics. *J Chrom* 526: 341-354

Nielsen OH, Ahnfelt-Ronne I, Thomsen MK, Kissmeyer AM, Langholz E (1991): Effect of Leukotrienes LTD<sub>4</sub>/LTE<sub>4</sub> antagonist, SR 2640, in ulcerative colitis: An open clinical study. *Prost Leuk Ess Fatty Acid* 42: 181-184

Nishizuka Y (1984): The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumor promotion. *Nature* 308: 693-698

Örning L, Hammerström S, Samuelsson B (1980): Leukotriene D: A slow-reacting substance from rat basophilic leukemia cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 77: 2014-2017

Oosaki R, Mizushima Y, Mita H, Shida T, Akiyama K, Kobayashi M (1997): Urinary leukotriene E<sub>4</sub> and 11-dehydrothromboxane B<sub>2</sub> in patients with aspirin-sensitive asthma. *Allergy* 52: 470-473

Orange RP, Austen KF (1969): Slow reacting substance of anaphylaxis. *Adv Immunol* 10: 105-144

Orange RP, Austen KF (1975): Bronchial asthma: The possible role of the chemical mediators of immediate hypersensitivity in the pathogenesis of subcutaneous chronic disease. *Am Rev Res Dis* 112: 43-436

Pace-Asciak CR, Klein J, Lombard S, Torchia J, Rokach J (1985): Catabolism of leukotriene A<sub>4</sub> into B<sub>4</sub>, C<sub>4</sub> and D<sub>4</sub> by rat liver subcellular fractions. *Biochim Biophys Acta* 836: 153-156

Palmantier R, Rocheleau H, Laviolette M, Mancini J, Borgeat P (1998): Characteristics of leukotriene biosynthesis by human granulocytes in presence of plasma. *Biochim Biophys Acta* 1389: 187-196

Palmer RMI, Salmon JA (1983): Release of leukotriene B<sub>4</sub> from human neutrophils and its relationship to degranulation induced by n-formyl-leucyl-phenylalanine, serum-treated zymosan and the ionophore A23187. *Immunol* 50: 65-73

Pantella V, Marino I, Lampärter B, Arbustini E, Adt M, Marone G (1995): Human heart mast cells ; Isolation, purification ultrastructure and immunologic characterization. *J Immunol* 154: 2855-2865

Parker CW, Aykent S (1982): Calcium stimulation of the 5-Lipoxygenase from RBL-1 cells. *Biochim Biophys Res Commun* 109: 1011-1016

Peters SP, Schulmann ES, Liu MC, Hayes EC, Lichtenstein LM (1983): Separation of major prostaglandins, leukotrienes, and monoHETEs by high performance liquid chromatography. *J Immunol Methods* 64: 335-343

Peters-Golden M (1998): Molecular mechanisms of leukotriene synthesis: The changing paradigm. *Clin Exp Allergy* 29: 1059-1065

Peters-Golden M, Shelly C (1988): Inhibitory effect of exogenous arachidonic acid on alveolar macrophage 5-Lipoxygenase metabolism. *J Immunol* 140: 1958-1966

Petrich K, Ludwig P, Kühn H, Schewe T (1995): The suppression of 5-lipoxygenation of arachidonic acid in human polymorphonuclear leukocytes by the 15-lipoxygenase product (15S)-hydroxy-(5Z,8Z,11Z,13E)-eicosatetraenoic acid: Structure-activity relationship and mechanism of action. *Biochem J* 314: 911-916

Pfeiffer DR, Lardy HA (1976): Ionophore A23187: The effect of H<sup>+</sup> concentration on complex formation with divalent and monovalent cations and the demonstration of K<sup>+</sup> transport in mitochondria mediated by A23187. *Biochem* 15: 935-943

Pierzchalska M, Mastlalerz L, Sanak M, Zazula M, Szczeklik A (2000): A moderate and un-specific release of cysteinyl leukotrienes by aspirin from peripheral blood leucocytes precludes its value for aspirin sensitivity testing in asthma. *Clin Exp Allergy* 30: 1785-1791

Powell WS (1984): Properties of leukotriene B<sub>4</sub> 20-Hydroxylase from polymorphonuclear leukocytes. *J Biol Chem* 259: 3082-3089

Powell WS (1985 a): Reversed-phase high-pressure liquid chromatography of arachidonic acid metabolites formed by cyclooxygenase and lipoxygenases. *Anal Biochem* 148: 59-69

Powell WS (1985 b): High pressure liquid chromatography of eicosanoids. *Biochem Ara Acid Metab* (Lands W.E.M, ed.), Kluwer-Nijhoff Publishing, Boston: 375-403

Qui DW, Hui KP, Lee CW, Lim TK, Tan WC (1996): Simplified method for measuring urinary leukotriene E<sub>4</sub>. *J Chrom B* 677: 152-155

Räderer I (1996): Saisonale Veränderungen bei Heuschnupfen: Histaminfreisetzung und deren Hemmung durch Antiallergika. Roderer-Verlag, Regensburg

Raulf M, Stüning M, König W (1986): Effect of cations on leukotriene release: Requirements for the metabolism of peptido-leukotrienes (leukotrienes C<sub>4</sub>, D<sub>4</sub>) by human polymorphonuclear granulocytes. *Immunol* 58: 479-487

Razin E, Mencia-Huerta JM, Lewis RA, Corey EJ, Austen KF (1982): Generation of leukotriene C<sub>4</sub> from a subclass of mast cells differentiated in vitro from mouse bone marrow. Proc. Natl. Acad. Sci USA 79: 4665-4667

Ring J (1995): Angewandte Allergologie: MMV Medizin Verlag München, 2. Auflage

Ring J, Ahlborn R (1987): Allergische Erkrankungen. Deutscher Apotheker Verlag 2. Aufl. 46-47

Ring J, Dorsch W (1985): Altered Releasability of vasoactive mediator secreting cells in atopic eczema. Acta Derm Venereol Suppl 114: 9-23

Riva G, Straub PW, Vorbürger C, Uehlinger A (1979): Das Atopie-Syndrom. Schweiz Med Wochr 109 : 1205-1212

Rodger I, Botting J, Dahlen SE (1997): Leukotrienes: New concepts and targets for therapy. Kluwer Acad Publisher. 43-54

Romeo D, Zabucchi G, Miani N, Rossi F (1975): Ion movement across leukocyte plasma membrane and excitation of their metabolism. Nature 253: 542-544

Roth DM, Lefer AM (1983): Studies on the mechanism of leukotriene induced coronary artery constriction. Prostaglandins 26: 573-587

Rouzer CA, Samuelsson B (1985): On the nature of 5-Lipoxygenase reaction in human leukocytes: Enzyme purification and requirement for multiple stimulatory factors. Proc Natl Acad Sci USA 82: 6040-6044

Sachs L (1984): Angewandte Statistik, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo

Salari H (1986): Immunological and non-immunological release of leukotrienes and histamine by guinea-pig heart. Immunol 58: 473-478

Salari H (1987): A comparative study on the release of leukotrienes and histamine by guinea pig lung and trachea after challenge with antigen or stimulation with ionophore A23187 or melittin. *Clin Exp Immunol* 67: 211-219

Salari H, Borgeat P, Fournier M, Hebert J, Pelletier G (1985): Studies on the release of leukotrienes and histamine by human lung parenchymal and bronchial fragments upon immunologic and nonimmunologic stimulation. *J Exp Med* 162: 1904-1915

Samhoun MN, Conroy DM, Piper PJ (1989): Pharmacological profile of Leukotrienes E<sub>4</sub>, N-acetyl E<sub>4</sub> and four of their novel omega- and betaoxidative metabolites in airways of guinea pig and man in vitro. *Br J Pharmacol* 98: 1406-1412

Sampson AP, Thomas RU, Costello JF, Piper PJ (1992): Enhanced leukotriene synthesis in leukocytes of atopic and asthmatic subjects. *Br J Pharmac* 33: 423-430

Samuelsson B (1982): Prostaglandins, thromboxanes and leukotrienes. *Biochemical pathways, prostaglandins and cancer: First Interational Conference* 1-19

Samuelsson B (1983 a): Leukotrienes: Mediators of immediate hypersensitivity reaction and inflammation. *Science* 220: 568-575

Samuelsson B (1983 b): Leukotrienes: A new class of mediators of immediate hypersensitivity reaction and inflammation. *Adv Prost Throm Leu Res* 11: 1-13

Samuelsson B (1985): Leukotrienes and related compounds. *Adv Prosta Throm Leukot Res* 135: 104-112

Samuelsson B (2000): The discovery of the leukotrienes. *Resp Crit Med* 161: 2-6

Samuelsson B, Borgeat P (1979): Arachidonic acid metabolism in polymorphonuclear leukocytes: Effects of ionophore A23187. *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 2148-2152

Samuelsson B, Borgeat P, Hammerström S, Murphy RC (1979): Introduction of a nomenclature: Leukotrienes. *Prostaglandins* 17: 785-793

Samuelsson B, Goldyne M, Granström E, Hamberg M, Hammerström S, Malmsten C (1978): Prostaglandins and thromboxanes. *Ann Rev Biochem* 47: 997-1029

Samuelsson B, Hammerström S (1980): Nomenclature for leukotrienes. *Prostaglandins* 19: 645-648

Sandborg RR, Smolen JE (1988): Biology of disease. Early biochemical events in leukocyte activation. *Lab Invest* 59: 300-320

Sato T, Bewtra AK, Hopp RJ, Nair N, Townley RG (1990): Alpha- and beta-adrenergic-receptor systems in bronchial asthma and in subjects without asthma: reduced mononuclear cell beta-receptors in bronchial asthma. *J Allergy Clin Immunol* 86.6: 839-850

Schell-Frederick E (1974): Stimulation of oxydative metabolism of polymorphonuclear leukocytes by calcium ionophore A23187. *FEBS Lett* 48: 37-40

Severien C, Artlich A, Jonas S, Becher G (2000): Urinary excretion of leukotriene E<sub>4</sub> and eosinophil protein X in children with atopic asthma. *Eur Respir J* 16: 588-595

Sheikh S, Null D, Gentile D, Bimle C, Skoner D, McGoy K, Guthrie R (2001): Urinary Leukotriene E<sub>4</sub> excretion during the first month of life and subsequent bronchopulmonary dysplasia in premature infants. *Am Coll Chest Phys* 119: 1749-1754

Shimizu T, Radmark O, Samuelsson B (1984): Enzyme with dual lipoxygenase activities catalyzes leukotriene A<sub>4</sub> synthesis from arachidonic acid. *Proc Natl Sci USA* 82: 689-693

Sinzinger H, Kaliman J, Joskovics G (1986): Vasodilatierender Effekt von Leukotrien C<sub>4</sub> und D<sub>4</sub> durch Stimulation der Prostacyklinsynthese. *Wien klin Wochenschr* 98: 107-110

Steffenrud S, Salari H (1989): Analysis of leukotrienes by liquid chromatography/electrochemistry after conversion to dinitrobenzoate derivatives. *Biochem Chrom* 3: 5-9

Stenson WF, Parker CW (1979): Metabolism of arachidonic acid in ionophore-stimulated neutrophils. *J Clin Invest* 64: 1457-1564

Strandberg K, Uvnäs B (1971): Purification and properties of slow reacting substance formed in the cat perfused with compound. *Acta Physiol Scand* 82: 358-374

Surette ME, Odeimat A, Palmantier R, Marleau S, Poubelle PE, Borgeat P (1994): Reverse-phase high-performance liquid chromatography analysis of arachidonic acid metabolites in plasma after stimulation of whole blood *ex vivo*. *Anal Biochem* 216: 392-400

Suzuki K, Tohda K, Tanda Y, Otizaeo H, Nishimama S, Ioue H, Shirai T (1989): Fiber-optic magnesium and calcium ion sensor based on a natural carboxylic polyether antibiotic. *Anal Chem* 61: 382-384

Szeffler SJ, Ando R, Cicutto LC, Surs W, Hill MR, Martin RJ (1991): Plasma histamine, epinephrine, cortisol and leukocyte  $\beta$ -adrenergic receptors in nocturnal asthma. *Clin Pharmacol Ther (St.Louis Mo)* 49.1: 59-68

Szentivanyi A (1968): The beta adrenergic theory of the atopic abnormality in bronchial asthma. *J Allergy (St. Louis)* 42: 203-232

Tagari P, Ethier D, Carry M, Korley V, Chalreson S, Girard Y, Zamboni R (1989): Measurement of urinary leukotrienes by reversed-phase liquid chromatography and radioimmunoassay. *Clin Chem* 35: 388-391

Takamoto M, Yano T, Shintani T, Hiraku S (1995): A highly sensitive and selective method for the determination of Leukotriene B<sub>4</sub> in human plasma by negative ion chemical ionization/gas chromatography/ tandem mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal* 13: 1465-1472

Thien FCK, Hallsworth MP, Soh C, Lee TH (1993): Effects of exogenous eicosapentaenoic acid on generation of leukotriene C<sub>4</sub> and leukotriene C<sub>5</sub> by calcium ionophore-activated human eosinophils *in vitro*. *J Immunol* 150: 3546-3552

Tsikak D, Fauler J, Frölich JC (1995): Chemical synthesis of dioxygen-18 labelled  $\omega$ -/ $\beta$ -oxidized cysteinyl leukotrienes: Analysis by gas chromatography-mass spectrometry and gas chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chrom B* 667: 209-221

Tsikak D (1998): Application of gas chromatography-mass spectrometry and gas chromatography-tandem mass spectrometry to assess in vivo synthesis of prostaglandins, thromboxane, leukotrienes, isoprostanes and related compounds in human. *J Chrom B* 717: 201-245

Verhagen J, Wassink GA, Kijne GM, Bruynzeel PLB (1986): Rapid, simple and efficient extraction of arachidonic acid metabolites, including the sulphidopeptide leukotrienes LTC<sub>4</sub> and LTD<sub>4</sub>, using octadecyl reversed-phase extraction columns. *J Chrom* 378: 208-214

Wainwright S, Falck JR, Yadagiri P, Powell WS (1989): Stereochemistry of Leukotrien B<sub>4</sub> metabolites formed by the reductase pathway in porcine polymorphonuclear leukocytes: Inversion of stereochemistry of the 12-hydroxyl group. *Biochem* 29: 1180-1185

Wallace JL, Ma L (2001): Inflammatory mediators in gastrointestinal defense and injury. *Exp Biol Med* 226: 1003-1015

Wedi B, Kapp A (2001): Pathophysiological role of leukotrienes in dermatological diseases. *Bio Drugs* 15: 729-743

Werz O, Bürckert E, Samuelsson B, Radmark O, Steinhilber D (2002): Activation of 5-Lipoxygenase by cell stress is calcium independent in human polymorphonuclear leukocytes. *Am Soc Hema* 99: 1044-1052

Wheelan P, Murphy RC (1996): Quantitation of 5-lipoxygenase products by electrospray mass spectrometry: Effect of ethanol on zymosan-stimulated production of 5-lipoxygenase products by human neutrophils. *Ana Biochem* 244: 110-115

Wurm J, Constantinidis J, Bogeschdorfer F (2001): Untersuchungen zum Eicosanoidstoffwechsel in peripheren Blutzellen bei Patienten mit zystischer Fibrose. *HNO* 49: 922-926



Yaman M, Abadir AR, Gitautas J (1999): Modulation of phospholipid metabolism, leukotrienes and prostaglandin synthesis by local anesthetic agents. *Proc West Pharmacol Soc* 42: 95-96

Yang X, Ho G, Xu L, Powell W (1999): The beta(2)-agonist salbutamol inhibits bronchoconstriction and leukotrien D (4) synthesis after dry gas hyperpnea in the guinea-pig. *Pulm Pharmacol Ther* 12(5): 325-329

Yoshimoto T, Suzuki H, Yamamoto S, Takai T (1990): Cloning and sequence analysis of the cDNA for arachidonate 12-lipoxygenase of porcine leukocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 2142-2146

Yu W, Powell WS (1995): Analysis of leukotrienes, lipoxins, and monooxygenated metabolites of arachidonic acid by reversed-phase high-pressure-liquid chromatography. *Anal Biochem* 226: 241-251

Zabucchi G, Soranzo MR, Rossi F, Romeo D (1975): Exocytosis in human polymorphonuclear leukocytes induced by A23187 and calcium. *FEBS lett* 54: 44-48

Zakrzewski JT, Sampson AP, Evans JM, Barnes NC, Piper PJ, Costello JF (1989): The biotransformation in vitro of cysteinyl leukotrienes in blood of normal and asthmatic subjects. *Prostaglandins* 37: 425-444

Zhang YY, Walker JL, Huang A, Keaney JF, Clish CB, Serhan CN, Loscalzo J (2002): Expression of 5-lipoxygenase in pulmonary artery endothelial cells. *Biochem J* 361: 267-276

## Lebenslauf

|   |  |
|---|--|
| <b>Name:</b>                                | Mühlhans   |
| <b>Vorname:</b>                             | <u>Ulrike</u> , Antonie  |
| <b>Geburtsdatum/-ort:</b>                   | 03. Juli 1971 / Trier  |
| <b>Familienstand:</b>                       | verheiratet, 2 Kinder  |
| <br>  |  |
| <b><u>Schulbildung:</u></b>                 |  |
| 1978 - 1980                                 | Grundschule Wildpoldsried  |
| 1980 - 1982                                 | Grundschule Weilheim i. OBB  |
| 1982 - 1991                                 | Gymnasium Weilheim i. OBB  |
| <br>  |  |
| <b><u>Studium:</u></b>                      |  |
| 1991 – 1992                                 | Ludwig-Maximilians-Universität München<br>Chemie Diplom  |
| <br>1992 - 1997                             | <br>Universität Würzburg<br>Pharmazie<br>2. Staatsexamen Mai 1997  |
| <br>Sept. 1996                              | <br>Studentische Hilfskraft<br>Universität Würzburg<br>(Mitarbeit an Hagers Handbuch)  |
| <br>  |  |
| <b><u>Praktikum:</u></b>                    |  |
| Mai 1997 - April 1998                       | Kurfürsten Apotheke München<br>3. Staatsexamen 3. Juli 1998  |
| <br>  |  |
| <b><u>berufliche Tätigkeit:</u></b>         |  |
| Aug. 1998 - Febr. 2001                      | Apothekerin in der Kurfürsten Apotheke München   |
| März 2001 – Febr. 2002                      | Wissenschaftliche Tätigkeit am Klinikum Regensburg   |
| März 2002 - Nov. 2004<br>seit Dezember 2004 | Apothekerin in der Salvator Apotheke München<br>Elternzeit   |
| <br>  |  |
| <b><u>Wissenschaftliche Tätigkeit:</u></b>  |  |
| seit Juli 1998                              | Promotion am Walther-Straub-Institut für Pharmakologie und Toxikologie der LMU München bei Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Dipl. Biochem. Ekkehard Haen |