

# Untersuchungen zur Entstehung, Lokalisation und Wirkung von fragmentiertem Phosphatidylcholin (FPC) im Menschen

## Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

im Fach Pharmazie eingereicht an der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

der Humboldt-Universität zu Berlin

Bettina Frey

geb. am 27. Mai 1973 in Reutlingen

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr. Jürgen Mlynek

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

Prof. Dr. Bernhard Ronacher

Gutachter: 1. Prof. Dr. rer. nat. M. Melzig

2. PD Dr. med. M. Schlame

3. Prof. Dr. sc. nat. B. Rüstow

eingereicht: 11. September 2000

Datum der Promotion: 14. Dezember 2000

## Inhalt

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>6</b>
1.1	Plättchen-aktivierender Faktor (PAF)	6
1.2	PAF und weitere bioaktive Lipide	10
1.2.1	Entdeckung von PAF-verwandten Lipiden	10
1.2.2	PAF-ähnliche Lipide	10
1.2.3	Lipidperoxidation	11
1.2.4	Struktur-Wirkungs-Beziehung PAF-ähnlicher Lipide	13
1.2.5	Existieren PAF-ähnliche Lipide in vivo?	15
1.3	Fragestellung	17
<b>2</b>	<b>METHODEN</b>	<b>18</b>
2.1	Materialien	18
2.1.1	Lösungen	18
2.2	Messung von FPC	19
2.2.1	Modifizierte Lipidextraktion	19
2.2.2	Derivatisierung mit Fluoreszenzmarker	20
2.2.3	Festphasenextraktion der Derivate	20
2.2.4	Isolierung von FPC mittels Silica-HPLC	21
2.2.5	Quantifizierung von FPC mittels RP-HPLC	22
2.2.6	Synthese des internen Standards 1-Palmitoyl-2-suberoyl-PC	24
2.2.7	Konzentrationsbestimmung des internen Standards mittels GC	26
2.3	Messung der biologischen Aktivität	27
2.3.1	Lipidextraktion	27
2.3.2	Festphasenextraktion	28
2.3.3	Isolation [ <sup>3</sup> H] Serotonin-markierter Kaninchenthrombozyten	28
2.3.4	Bioassay	29
2.4	Chromatographische Charakterisierung der biologischen Aktivität	30
2.5	Messung der Phospholipase A <sub>2</sub>	31
2.6	Messung der PAF-Acetylhydrolase Aktivität	32
2.7	Messung von LOOHs	33
2.8	Messung des Phosphatgehalts von Phospholipiden	33
2.9	Fraktionierung von Plasma	34
2.9.1	Plasmagewinnung	34
2.9.2	Thrombozyten	34
2.9.3	Lipoproteine	35
2.9.4	Messung von Albumin	37
2.9.5	Messung von Cholesteroll	37
2.9.6	Messung von Apo A1 und B	38
2.10	Fraktionierung von Lebergewebe	38
2.10.1	Leberhomogenat	38
2.10.2	Subzelluläre Fraktionen	39
2.11	Gewinnung von alveolärer Lavage und von Typ II Zellen	39
2.11.1	Präparation von alveolärer Lavage	39
2.11.2	Präparation von Typ II Zellen	40
2.12	Proteinbestimmung nach Bradford	41
2.13	Oxidation von Typ II Zellen mit H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	41
2.14	Vitamin E-Depletionsversuche	41
2.15	Tierexperimente	42
2.16	Untersuchungen am Menschen	43
2.16.1	Genehmigung der Ethik-Kommission	43
2.16.2	Raucher	43
2.16.3	Herzchirurgische Operation	44
2.16.4	Intensivpatienten	45
2.16.5	APACHE II (Knaus et al., 1985)	47
2.17	Statistik	48

<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>50</b>
3.1	Lokalisation von FPC	50
3.1.1	Thrombozyten	50
3.1.2	Plasma	50
3.1.3	Parenchymatöses Gewebe	52
3.2	Biologische Aktivität von FPC	55
3.3	FPC bei oxidativem Stress in biologischen Systemen	56
3.3.1	Einfluss von Tabakrauch	56
3.3.2	Einfluss von H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	58
3.3.3	Vitamin E-Mangel	59
3.4	FPC unter klinischen Bedingungen	61
3.4.1	Herzchirurgische Operation	61
3.4.2	Intensivpatienten	64
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>74</b>
4.1	Mögliche Lokalisationsorte von FPC im Plasma	74
4.2	FPC und biologische Aktivität	75
4.3	FPC und oxidativer Stress	79
4.4	FPC und systemische Inflammation	82
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>86</b>
<b>6</b>	<b>ANHANG</b>	<b>94</b>

## Abkürzungsverzeichnis

A	Absorption
ACD	Adenosin Citrat Dextrose
APACHE II Score	Acute Physiology and Chronic Health Evaluation Score II
Apo A1	HDL Marker
Apo B	LDL Marker
APS	Acute Physiology Score
BSA	Bovines Serumalbumin
DC	Dünnschichtchromatographie
DMEM	Dulbecco 's modified Eagle 's medium
dpm	disintegrations per minute
EDTA	Ethylendiamin-N,N, N',N'- tetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
FPC	fragmentiertes Phosphatidylcholin
GC	Gaschromatographie
HDL	High Density Lipoprotein
HEPES	N-(2-hydroxyethyl)piperazin-N'-(2-ethansulfonsäure)
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
Ig G	Immunglobulin G
LDL	Low Density Lipoprotein
LOOH	Lipidhydroperoxide
MDA	Malondialdehyd
MeOH	Methanol
MOV	Multiorganversagen
n. s.	nicht signifikant
PAF	1-O-Alkyl-2-acetyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
PAF-AH	PAF-Acetylhydrolase
PBS	Phosphate buffered saline
PC	Phosphatidylcholin

PCOOH	Phosphatidylcholinhydroperoxid
PL	Phospholipide
PLA <sub>2</sub>	Phospholipase A <sub>2</sub>
PMN	Polymorphonukleäre Leukozyten
SIRS	Systemisches Inflammatorisches Reaktionssyndrom
TP	Thrombozytopenie
Tris	Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan
UV	Ultraviolett
Vit. E	Vitamin E
Vit. E <sub>chinon</sub>	Vitamin E Chinon
vs.	versus

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Plättchen-aktivierender Faktor (PAF)

Henson (1971) entdeckte eine thrombozytenaktivierende fettlösliche Substanz, den „fluid phase mediator“, die aus Leukozyten freigesetzt wurde. Die Gruppe von Benveniste (1972) untersuchte ebenfalls eine fettlösliche Substanz aus Kaninchenbasophilen, die Thrombozyten aktivierte. Da nicht bekannt war, ob es sich dabei um eine oder mehrere Verbindungen handelt, sprach man damals von einem Faktor. Benveniste et al. (1972) bezeichneten diesen Faktor aufgrund der pharmakologischen Wirkung als Plättchen-aktivierenden Faktor (PAF). Fünf Jahre später konnte diese Gruppe zeigen, dass es sich dabei um ein Phospholipid handelte (Benveniste et al., 1977). Die Struktur dieses Faktors wurde von Benveniste et al. (1979) und Demopoulos et al. (1979) unabhängig voneinander als 1-O-Alkyl-2-acetyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin identifiziert (Abbildung 1). Blank et al. (1979) gelang die Totalsynthese von PAF durch reduzierende Hydrolyse von Ether-Phosphatidylcholinen mit anschließender Acetylierung. Damit bestätigten sie die bereits aufgeklärte Struktur.

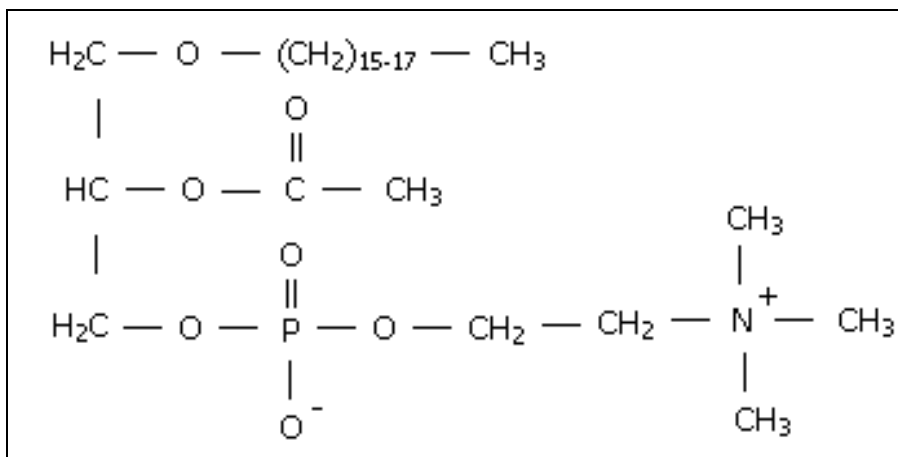


Abbildung 1: PAF (1-O-Alkyl-2-acetyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin)

Muirhead et al. (1960) untersuchten einen Faktor, der blutdrucksenkende Eigenschaften besaß. Der „Vasodepressor“ befand sich in einer neutralen Lipidfraktion, die aus dem Nierenmark eines Kaninchens gewonnen wurde (Muirhead et al., 1960). Prewitt et al. (1979) klärten die Struktur dieses Faktors auf und zeigten, dass es sich um 1-O-Alkyl-2-acetyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin, den Plättchen-aktivierenden Faktor, handelte. Damit wurde erstmals gezeigt, dass diese molekulare PC-Spezies verschiedene pharmakologische Wirkungen haben kann.

Heute ist bekannt, dass PAF ein Auslöser für Bronchokonstriktion, Blutdruckabfall, erhöhte Gefäßpermeabilität, Thrombozytopenie und Leukopenie ist sowie die Glykogenolyse in der Leber und die Kontraktion der Gebärmutter stimuliert (Braquet et al., 1987; Snyder, 1989; Hanahan, 1986; Saito et al., 1989; McManus et al., 1989; Zimmermann et al., 1992). Obgleich seit der Entdeckung von PAF nachgewiesen wurde, dass diese Substanz nicht nur die Thrombozyten aktiviert, sondern unter anderem auch Monozyten, Basophile und Neutrophile, behielt 1-O-Alkyl-2-acetyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin in der Literatur seinen Trivialnamen Plättchen-aktivierender Faktor (PAF).

PAF wird in polymorphonukleäre Leukozyten (PMNs), Monozyten, Makrophagen, Eosinophilen, Basophilen und vaskulären Endothelzellen produziert (McManus et al., 1993). In biologischen Systemen sind zwei enzymatisch kontrollierte Synthesewege für PAF bekannt. Es handelt sich dabei um die „de novo“ und die „remodeling“ Synthese. Bei der „de novo“ Synthese werden 1-O-Alkyl-2-lyso-*sn*-glycerol-3-phosphate durch eine Acetyltransferase acetyliert. Nach der Dephosphorylierung entstehen 1-O-Alkyl-2-acetyl-*sn*-glycerole, die durch Cholinphosphotransferase zu PAF umgeformt werden. Die „de novo“ Synthese dient zur Aufrechterhaltung der physiologischen PAF-Konzentration und findet besonders im ZNS statt (Braquet et al., 1987). Bei der „remodeling“ Synthese werden Membranlipide zu PAF umgebaut. Langkettige Reste in *sn*-2 Position von 1-O-

Alkyl-Phosphatidylcholinen werden durch die Phospholipase A<sub>2</sub> abgespalten (Abbildung 2). Die entstandenen Lyso-Phosphatidylcholine werden durch eine Acetyltransferase acetyliert, wodurch PAF entsteht. Die „remodeling“ Synthese ist vor allem bei Entzündungen und Allergien von großer Bedeutung. Durch Aktivierung der PMNs, Endothelzellen, Makrophagen, Basophilen oder Monozyten kann über den „remodeling“ Syntheseweg schnell PAF produziert und freigesetzt werden, so dass das „remodeling“ der primäre Syntheseweg in Zellen ist (O´Flaherty und Wykle, 1983; Snyder, 1990; Hanahan, 1986; Prescott et al., 1990).

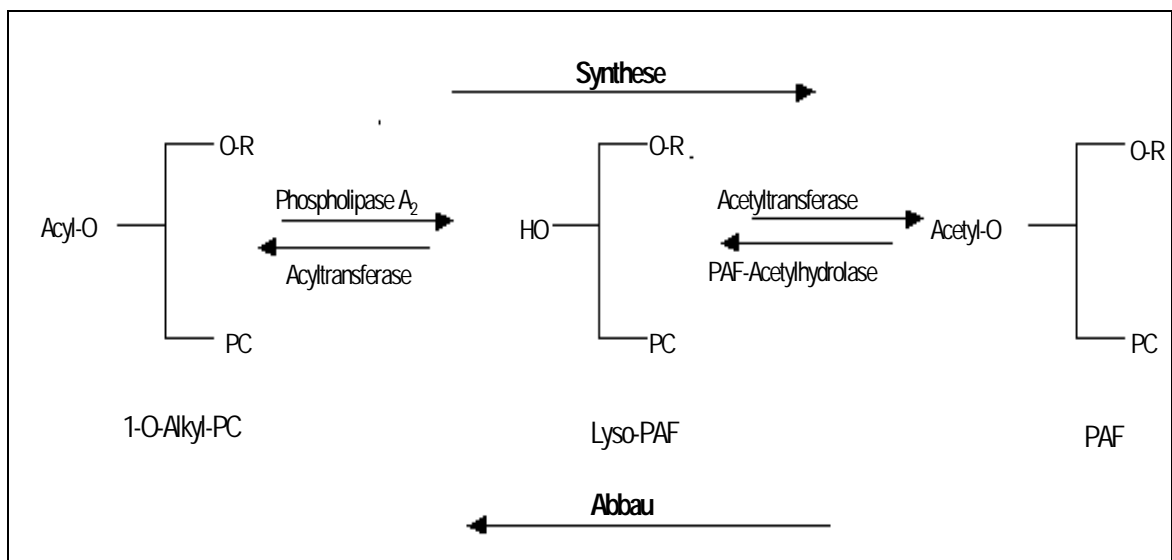


Abbildung 2: Synthese und Abbau von PAF

In der Abbildung wird die „remodeling“ Synthese, sowie der Abbau von PAF gezeigt. 1-O-Alkyl-PC wird durch die Phospholipase A<sub>2</sub> zu Lyso-PC gespalten. Durch Acetylierung entsteht PAF. Die PAF-Acetylhydrolase ist eine PAF-spezifische Phospholipase A<sub>2</sub>. Das entstandene Lyso-PAF wird durch Acyltransferase katalysierte Veresterung mit einer Fettsäure wieder zu 1-O-Alkyl-PC.

PAF besitzt einen eigenen Rezeptor, der auf der Zelloberfläche verschiedener Gewebs- und Blutzellen gefunden wurde (Braquet et al., 1987). Der PAF Rezeptor konnte zum ersten Mal aus einer Meerschweinchenlunge (Honda et al., 1991) und später aus menschlichem Gewebe kloniert werden (Kunz et al., 1992; Nakamura et al., 1991). Es handelt sich dabei um einen G-Protein gekoppelten Rezeptor, der über G<sub>q/11</sub> an die Phospholipase A<sub>2</sub> gekoppelt ist und

zur Konzentrationserhöhung von IP<sub>3</sub> und DAG in der Zelle beiträgt. Nachdem der Rezeptor identifiziert wurde, konnten einige Antagonisten synthetisiert und die Wirkung von PAF spezifisch blockiert werden. Die Konzentration der Antagonisten musste jedoch 30 bis 1000 Mal größer sein als die von PAF. Dies zeigt die hohe Affinität von PAF zu seinem Rezeptor (Hwang et al., 1988 ; Wang et al., 1990).

PAF liegt in biologischem Material in sehr geringen Konzentrationen ( $10^{-10}$ – $10^{-12}$  M) vor, so dass ein hoher lipidanalytischer Aufwand nötig ist, um seine Konzentration zu bestimmen (Clay, 1990; Nishida et al., 1996; Woodard et al., 1995). Zuerst müssen die Lipide aus biologischem Material extrahiert und dann durch DC getrennt werden, um anschließend quantifiziert werden zu können. Wesentlich einfacher zu handhaben und gleichzeitig kostengünstiger ist dagegen die Verwendung eines Bioassays. In vielen Laboratorien wurde die biologische Aktivität von PAF durch die Serotoninfreisetzung aus Thrombozyten bestimmt (Benveniste et al., 1972; Yue et al., 1990). Dabei werden Kaninchenthrombozyten mit [<sup>3</sup>H] Serotonin beladen, anschließend mit PAF inkubiert und die Freisetzung von [<sup>3</sup>H] Serotonin aus Thrombozyten bestimmt. Kern et al. (1998) bestimmten die biologische Aktivität von PAF durch Stimulation der Monozyten. Die Bestimmung der biologischen Aktivität erfolgte bei Lehr et al. (1997) durch die Adhäsion aktivierter PMNs an Endothelzellen, sowie der Aggregation von Thrombozyten und Monozyten. Ein Nachteil aller Methoden ist die fehlende Spezifität, da eine Vielzahl von Verbindungen [<sup>3</sup>H] Serotoninfreisetzung oder Stimulation der Monozyten bewirken können. Die Spezifität der Methode kann durch den Einsatz von PAF-Antagonisten erhöht werden. Diese binden mit hoher Spezifität an den PAF-Rezeptor und blockieren die biologische Wirkung.

PAF besitzt starke biologische Aktivität. Deshalb unterliegt seine Konzentration einer strengen Kontrolle durch die PAF-Acetylhydrolase (Braquet et al., 1987; O'Flaherty und Wykle, 1983; Snyder, 1990). Dieses Enzym katalysiert den Ab-

bau von PAF im Blut und Gewebe (Blank et al., 1981 und Nijssen et al., 1986).

## 1.2 PAF und weitere bioaktive Lipide

### 1.2.1 Entdeckung von PAF-verwandten Lipiden

Tsukatani et al. (1976) extrahierten aus Rinderhirn ein Lipidgemisch, das blutdrucksenkend wirkte. Das Lipidgemisch wurde Depressor I genannt. Bei der chromatographischen Untersuchung der bioaktiven Lipide konnte festgestellt werden, dass ihr Elutionsverhalten dem des Lyso-Phosphatidylcholins sehr ähnlich war. Später wurde nachgewiesen, dass der Depressor I unter anderem aus PAF und Acyl-PAF bestand (Tokumura et al., 1987 und 1989). Acyl-PAF, 1-Acyl-2-acetyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin, ist ein Lipid, das PAF-verwandte Struktur und Wirkung hat. McManus et al. (1988) entdeckten ein weiteres PAF-verwandtes Lipid, das 1-O-Alk-1'-enyl-2-acetyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin. Es wird als Alkenyl-PAF bezeichnet. Die Existenz von Acyl-PAF und Alkenyl-PAF in den Lipiden verschiedener biologischer Ausgangsmaterialien wurde mehrfach bestätigt (Weintraub et al., 1985; 1990; Satouchi et al., 1985; 1987; Müller et al., 1984; Marathe et al., 1999). Bei diesen Untersuchungen wurden neben PAF weitere PAF-verwandte Lipide gefunden, die sich strukturell in der *sn*-1 Position von PAF unterscheiden.

### 1.2.2 PAF-ähnliche Lipide

Die Untersuchung des Depressors I führte zur Identifizierung weiterer PAF-ähnlicher Lipide. Es handelte sich dabei um fragmentierte Phosphatidylcholine, die PAF-ähnliche Struktur mit verschiedenen kurzkettigen Acylresten in *sn*-2 Position haben (Tokumura et al., 1987; 1988; 1989 und 1991). Unter den Acylresten befanden sich Monocarboxylate (C<sub>3</sub>-C<sub>7</sub>), Dicarboxylatreste wie Succinat, Glutarat (Tokumura et al., 1988) oder ω-Hydroxymonocarbonsäuren

(C<sub>3</sub>-C<sub>9</sub>) (Tokumura et al., 1991) (Abbildung 3).

Es stellte sich die Frage, wie PAF-ähnliche Lipide gebildet werden. Verschiedene Gruppen versuchten PAF-ähnliche Lipide mittels Oxidation herzustellen. Die Oxidation von isolierten Lipoproteinen (Tokumura et al., 1995; Heery et al., 1995; Frostegard et al., 1997), Endothelzellkulturen (Patel et al., 1992) und Phosphatidylcholin (Itabe et al., 1988; Smiley et al., 1991) führte in vitro zur Entstehung von PAF-ähnlichen Lipiden, die eine PAF-ähnliche Wirkung zeigten. Tanaka et al. (1993) extrahierten die Lipide des Rinderhirns und oxidierten sie mit Hilfe einer Mischung aus Eisen/ EDTA und Ascorbat. Unter den Oxidationsprodukten befanden sich einige der bereits im Rinderhirnextrakt gefundenen PAF-ähnlichen Lipiden. Tokumura et al. (2000) oxidierten PCs mit dem Enzym Lipoxygenase und erhielten dabei ein PAF-ähnliches Lipid mit terminaler Aldehydfunktion in *sn*-2 Position, das biologische Aktivität zeigte. Diese in vitro Versuche zeigten, dass PAF-ähnliche Lipide durch Lipidperoxidation entstehen können. Man vermutete deshalb, dass auch in vivo PAF-ähnliche Lipide durch Lipidperoxidation gebildet werden (Tokumura et al., 1995; Lehr et al., 1997).

### 1.2.3 Lipidperoxidation

Lipide mit ungesättigten Fettsäuren sind reich an Doppelbindungen und stellen somit ein Substrat des oxidativen Abbaus dar. Oxidativer Stress bedeutet nach Sies (1985) ein Ungleichgewicht zwischen Oxidantien und Antioxidantien. Die Lipidperoxidation wird durch die Reaktion von Radikalen mit ungesättigten Fettsäureresten gestartet. Die Radikale müssen dabei in der Lage sein, Wasserstoffatome aus Kohlenwasserstoffbindungen abzuspalten. Diese Kohlenwasserstoffbindungen sind bei Anwesenheit von benachbarten Doppelbindungen geschwächt und können daher leichter angegriffen werden. Nach Abspaltung des Wasserstoffs verbleibt ein Lipidradikal. Dieses Lipidradikal stabilisiert sich durch

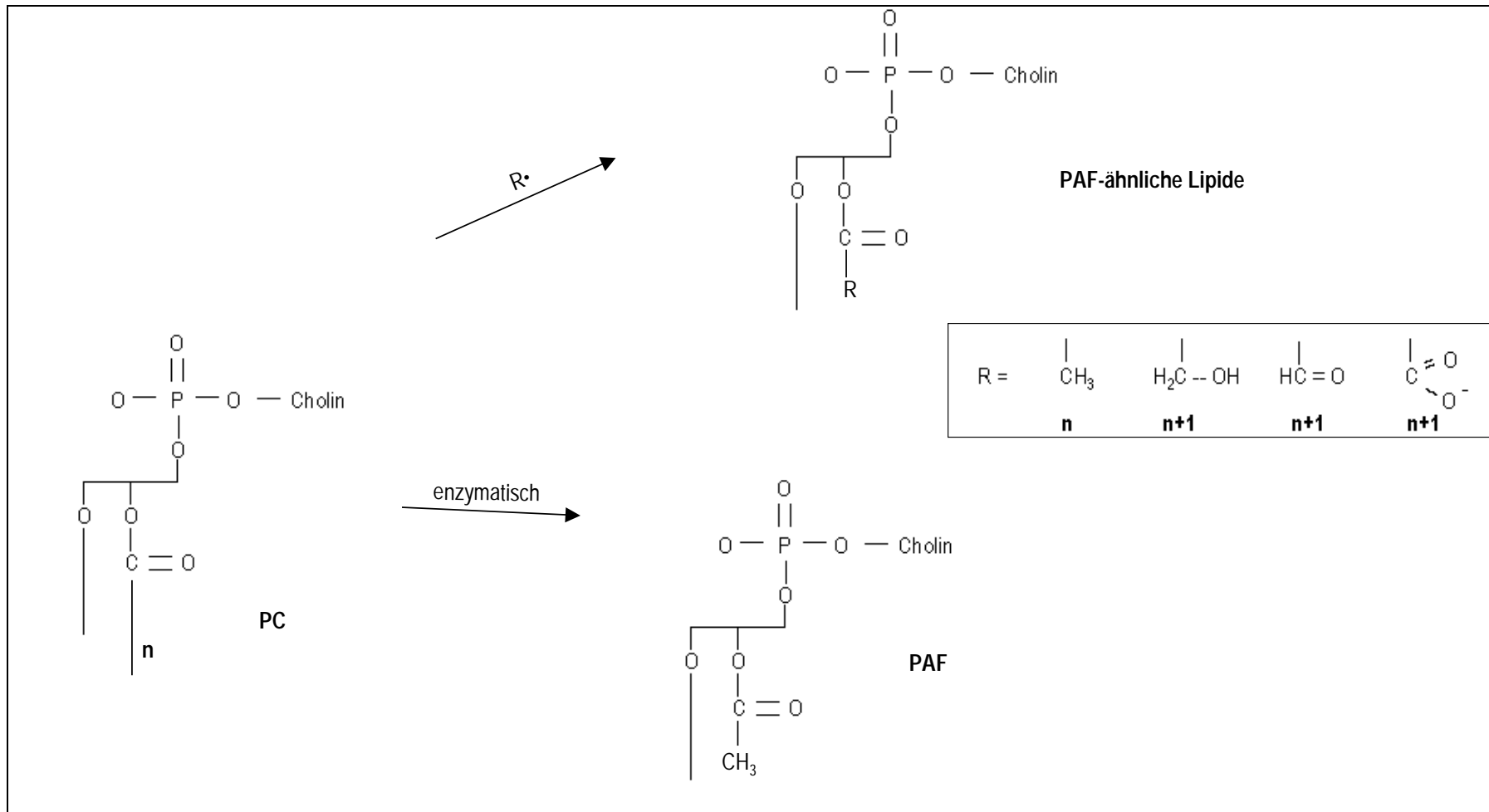


Abbildung 3: Der enzymatische Syntheseweg von PAF im Vergleich zur oxidativen Fragmentation PAF-ähnlicher Lipide

Bildung konjugierter Doppelbindungen. Es stehen eine Vielzahl von Stabilisationsmöglichkeiten zur Verfügung. Dies führt zur Bildung vieler verschiedener Lipidradikale, die unter Sauerstoffaufnahme zu reaktiven Lipidperoxidradikalen (Halliwell and Gutteridge, 1989) reagieren und weitere ungesättigte Fettsäurereste angreifen. Die Folge ist eine Kettenreaktion, in der ständig neue Lipidhydroperoxide gebildet werden.

Im Organismus sind vor allem Membranphospholipide oxidativen Veränderungen ausgesetzt. Durch Aktivierung von PMNs, Makrophagen oder vaskulären Endothelzellen wird  $O_2^-$  freigesetzt, das in der Haber-Weiss Reaktion zum reaktiven Hydroxylradikal umgeformt wird (Minotti und Aust, 1987). Die Hydroxylradikale können Phospholipide in der *sn*-2 Position angreifen und lösen dadurch eine Lipidperoxidation aus (Abbildung 4). Mit der Abspaltung eines Wasserstoffs (Girotti, 1998) beginnt die Kettenreaktion. Im Laufe der Kettenreaktion entsteht eine Vielzahl von Oxidationsprodukten, wie unter anderem Phosphatidylcholinhydroperoxide (Porter et al., 1989), Phosphatidylcholinepoxide und Phosphatidylcholinhydroxide (Hall und Murphy, 1998). Die gebildeten Phosphatidylcholinhydroperoxide sind Vorstufen von PAF-ähnlichen Lipiden (McIntyre et al., 1999). Am meisten vertreten sind PAF-ähnliche Lipide, die in *sn*-2 Position 3 bis 9 Kohlenstoffatome tragen und als funktionelle Gruppe eine  $\omega$ - Aldehyd-,  $\omega$ - Hydroxyl- oder  $\omega$ - Carboxylfunktion besitzen (Tanaka et al., 1993; Itabe et al., 1988). Endprodukte der Kettenreaktion sind flüchtige Aldehyde, wie 4-Hydroxynonenal, Malondialdehyd und andere stabile Verbindungen.

#### 1.2.4 Struktur-Wirkungs-Beziehung PAF-ähnlicher Lipide

PAF-ähnliche Lipide zeigen biologische Aktivität. So wirken sie in Ratten blutdrucksenkend (Yoshida et al., 1986), aktivieren PMNs (Smiley et al., 1991) und lösen die Aggregation von Kaninchenthrombozyten aus (Tanaka et al., 1994; Benveniste et al., 1972; Yue et al., 1990). Diese Untersuchungen

erfolgten

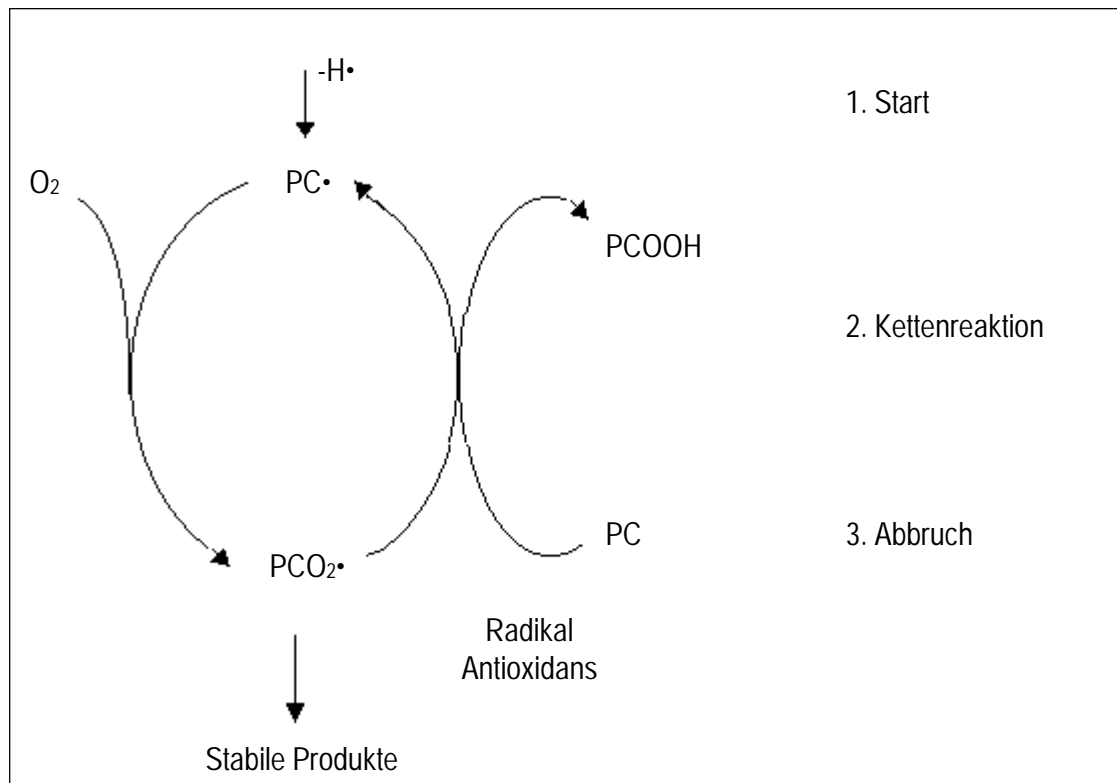


Abbildung 4: Lipidperoxidation von Phosphatidylcholin

Die Abbildung zeigt die radikalische Lipidperoxidation. Im ersten Schritt werden aus PC durch Abspaltung eines Wasserstoffatoms Radikale ( $PC\cdot$ ) gebildet. Durch Aufnahme von Sauerstoff entstehen noch reaktivere PC-Peroxyradikale, die durch Angriff auf weiteres PC eine Kettenreaktion in Gang halten. Der Kettenabbruch erfolgt durch Zugabe eines Antioxidans oder durch Zusammenschluss zweier Radikale.

meistens mit Gemischen künstlich oxidierter Phospholipide. Da jedoch die getesteten PAF-ähnlichen Lipide in Gemischen vorlagen, konnte nicht bestimmt werden, welches Molekül biologisch aktiv ist. Deshalb versuchten Tanka et al. (1994) und Kern et al. (1998) verschiedene PAF-ähnliche Lipide zu synthetisieren, die bei der Oxidation ungesättigten Phosphatidylcholins entstehen können, und testeten ihre biologische Aktivität. Die getesteten PAF-ähnlichen Lipide besaßen in *sn*-1 Position einen Palmitoyl- oder Hexadecylrest, und in *sn*-2 Position einen Propionyl- ( $C_3$ ), Succinyl- ( $C_4$ ), Valeroyl- ( $C_5$ ), Glutaroyl- ( $C_5$ ) oder Suberoylrest ( $C_8$ ). Die PAF-ähnlichen Lipide stimulierten durch Wechselwirkung mit dem PAF Rezeptor Thrombozyten und Monozyten.

Die Ergebnisse zeigten dabei, dass unter den PAF-ähnlichen Lipiden die 1-Hexadecyl-PCs biologisch aktiver sind als 1-Palmitoyl-PCs. Andere Untersuchungen bestätigten, dass eine Estergruppe in *sn*-1 Position 100-1000 Mal weniger biologisch aktiv ist als eine Ethergruppe (Tanaka et al., 1994; Demopoulos et al., 1979; Blank et al., 1982; Valone et al., 1982; O´Flaherty et al., 1994; Marathe et al., 1999). Eine Verkürzung der Kettenlänge in *sn*-1 Position bewirkte keine Veränderung der biologischen Aktivität (Marathe et al., 1999). Eine Kettenverkürzung in *sn*-2 Position von C<sub>8</sub> auf C<sub>3</sub> bedeutet hingegen eine Erhöhung der biologischen Aktivität der PAF-ähnlichen Lipide (Tanaka et al., 1994; Demopoulos et al., 1979; Blank et al., 1982; Stremmler et al., 1991).

#### 1.2.5 Existieren PAF-ähnliche Lipide in vivo?

Da in vitro gezeigt werden konnte, dass PAF-ähnliche Lipide durch Lipidperoxidation entstehen können, vermutete man, dass auch in vivo PAF-ähnliche Lipide existieren. Lehr et al. (1997) entdeckte PAF-ähnliche Lipide im Plasma von Hamstern, die Zigarettenrauch ausgesetzt waren. Durch Zigarettenrauch ist der Organismus einer Vielzahl von Radikalen exponiert, die die Bildung weiterer Radikale und reaktiver Sauerstoff-Spezies auslösen (Church und Pryor, 1985). Vor der Rauchexposition wurden keine PAF-ähnlichen Lipide im Plasma der Hamster gemessen. Nach Belastung der Tiere mit Tabakrauch stieg die Konzentration der PAF-ähnlichen Lipide im Plasma signifikant an. Die Rauch-induzierten Lipide scheinen eine kurze Halbwertszeit zu haben, da bereits 60 Minuten nach dem Rauchen keine biologische Aktivität mehr gemessen wurde. Durch Gabe von Vitamin C konnte die Bildung dieser PAF-ähnlichen Lipide verhindert werden. Diese Indizien unterstützen die Hypothese, dass PAF-ähnliche Lipide in vivo existieren und durch Lipidperoxidation gebildet werden können. Die Struktur dieser PAF-ähnlichen Lipide wurde allerdings nicht aufgeklärt.

Schlame et al. (1996) entwickelten eine analytische Methode, mit der zum

ersten Mal eine molekulare Spezies der PAF-ähnlichen Lipide aus menschlichem Plasma isoliert und quantifiziert werden konnte. Seit neustem gibt es auch Daten zur Struktur des im Plasma identifizierten PAF-ähnlichen Lipid (Frey et al., 2000). Die Strukturaufklärung mittels HPLC und Massenspektrometrie zeigte, dass es sich um ein fragmentiertes Phosphatidylcholin (FPC) mit einem Palmitoylrest in *sn*-1 Position und einer oxidierten kurzen C<sub>3</sub> oder C<sub>4</sub> Kette in *sn*-2 Position handelt. Watson et al. (1997) gelang es, die Struktur weiterer, in vivo existierender PAF-ähnlicher Lipide, aufzuklären. Es handelte sich dabei um PAF-ähnliche Lipide mit einem Glutaroyl- oder 5-Oxovaleroyl-Rest in *sn*-2 Position, die sich in oxidiertem LDL an der Aortenwand befanden.

### 1.3 Fragestellung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit dem im menschlichen Plasma gefundenen FPC und versucht folgende Fragen zu beantworten:

- In welcher Fraktion des Plasmas befindet sich FPC?
- Ist das im menschlichen Plasma gefundene FPC biologisch aktiv?
- Durch welche physiologisch relevanten Reaktionen wird FPC in vivo gebildet?
- Löst oxidativer Stress die Bildung von FPC in vivo aus?
- Besteht ein Zusammenhang zwischen der FPC-Konzentration und dem Schweregrad von Entzündungsreaktionen bei Intensivpatienten?

## 2 METHODEN

### 2.1 Materialien

Die verwendeten Lösungsmittel hatten einen Reinheitsgrad von 99,9 % und wurden von der Firma Merck in Darmstadt bezogen. Die flüssigen und festen Chemikalien stammen von der Firma Sigma-Aldrich aus Steinheim. Sämtliche radioaktiven Substanzen wurden von DuPont NEN aus Boston geliefert.

#### 2.1.1 Lösungen

*ACD* : Die Lösung enthält 2,45 g Dextrose, 2,2 g Natriumcitrat und 0,8 g Zitronensäure in 100 ml destilliertem Wasser.

*BSA-haltiger Gaitner Puffer* : Der Puffer enthält 103 mM NaCl, 40 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 4,7 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 4,5 mM Glucose, 12,9 mM Natriumcitrat und 2,5 g/l BSA (fettsäurefrei). Es wurde ein pH-Wert von 7,4 eingestellt bei 37 °C.

*Dole Reagenz* : Die Mischung besteht aus 48,75 ml Isopropanol, 50 ml n-Heptan und 1,25 ml 0,5 M Schwefelsäure (Dole und Meimertz, 1960).

*Gaitner Puffer* : Der Puffer enthält 103 mM NaCl, 40 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 4,7 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 4,5 mM Glucose und 12,9 mM Natriumcitrat. Es wurde ein pH-Wert von 6,4 eingestellt bei 37 °C.

*Homogenisationspuffer* : Der Puffer enthält 0,25 M Saccharose, 10 mM Tris, 1 mM EDTA. Es wurde ein pH-Wert von 7,3 eingestellt bei 37 °C.

*Inkubationspuffer* : Der Puffer enthält 75 mM Tris-Base und 5 mM Calciumchlorid. Es wurde ein pH-Wert von 8,5 eingestellt bei 37 °C.

*Inkubationspuffer II* : Der Puffer bestand aus 100 mM HEPES und 1 mM EGTA. Es wurde ein pH-Wert von 8,5 eingestellt.

*PBS Puffer* : Der Puffer enthält 32 g NaCl, 0,8 g KCl, 0,8 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,8 g NaN<sub>3</sub> und 4,6 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> in 4 Liter destilliertem Wasser. Es wurde ein pH-Wert von 7,4 eingestellt. Die Lagerung erfolgte im Kühlschrank.

*Phosphatspray* : Es wurden 16 g Ammoniummolybdat in 120 ml H<sub>2</sub>O gelöst (Lösung I). Vierzig Milliliter einer konzentrierten Salzsäure wurden mit 10 ml Quecksilber und 80 ml Lösung I für 30 min geschüttelt. Anschließend wurde die Lösung filtriert (Lösung II). Vierzig Milliliter der Lösung I wurde vorsichtig mit 200 ml konzentrierter Schwefelsäure und Lösung II versetzt. Die abgekühlte Lösung wurde mit H<sub>2</sub>O auf 1 l aufgefüllt (Vaskovsky und Kostetsky, 1968).

## 2.2 Messung von FPC

### 2.2.1 Modifizierte Lipidextraktion

Die Lipidextraktion erfolgte modifiziert nach Bligh und Dyer (1959). Es wurden 0,5 ml Plasma nacheinander mit 2 ml Methanol, 1 ml Dichlormethan, 0,5 ml H<sub>2</sub>O, 1 ml Dichlormethan und 1 ml H<sub>2</sub>O unter kräftigem Mischen versetzt. Nach der ersten Dichlormethanzugabe wurde 0,5 nmol 1-Palmitoyl-2-suberoyl-phosphatidylcholin als interner Standard zugegeben. Die untere organische Phase wurde isoliert und der wässrige Überstand noch einmal mit 2 ml Dichlormethan extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden unter

einem Stickstoffstrom eingengt. Das Dichlormethan enthielt 0,01 % Butylhydroxytoluol als Antioxidans.

### 2.2.2 Derivatisierung mit Fluoreszenzmarker

Der N<sub>2</sub>-getrocknete Lipidextrakt wurde mit 300 µl 0,1 M 9-(Chloromethyl)-anthracen in Benzen/ Triethylamin (4:1) versetzt. Die Derivatisierung erfolgte 12 Stunden bei 40 °C. Anschließend wurde die Temperatur für 2 Stunden auf 70 °C erhöht.

### 2.2.3 Festphasenextraktion der Derivate

Nach Konditionierung der Extract-Clean-Silica-Kartusche (200 mg/ 3,0 ml Alltech, Unterhaching) mit 4 ml Chloroform/ Triethylamin (9:1) wurde das Reaktionsgemisch (2.2.2 Derivatisierung) aufgetragen und mit 4 ml Chloroform/ Triethylamin (9:1) gewaschen. Anschließend wurden mit 4 ml Methanol/ Ammoniak (32 %) (95+5) die fluoreszenzmarkierten Phospholipide von der Säule eluiert. Das Eluat wurde unter Stickstoff eingengt und zur weiteren Bearbeitung in 100 µl Methanol aufgenommen (gegebenenfalls Lagerung für mehrere Stunden bei -20 °C).

## 2.2.4 Isolierung von FPC mittels Silica-HPLC

Die HPLC war wie folgt aufgebaut:

Detektoren	Fluoreszenzdetektor RF 551	Shimadzu, Tokio
	UV-Vis Detektor L-4250	Merck Hitachi, Tokio
Autosampler	AS-2000	Merck, Hitachi, Tokio
Pumpe	L-6200 A	Merck, Hitachi, Tokio
Interface	D-6000	Merck, Hitachi, Tokio
Ofen	Thermostat L-5025	Merck, Hitachi, Tokio
Software	D 6000 HPLC-Manager	Merck, Hitachi, Tokio
Degasser	Degasys DG-1310	Uniflow

Es wurden 100 % des Festphasenextraktes eingesetzt. Die isokratische Trennung erfolgte an einer Silica-Phase (Lichrosorb Silica Säule 100; 5  $\mu\text{m}$ , 60x8 mm). Das Laufmittel bestand aus Acetonitril/ H<sub>2</sub>O (88:12). Die Trennung erfolgte bei einem Fluss von 2,5 ml/ min und einer Temperatur von 50 °C. Die fluoreszenzmarkierte Fraktion, die hauptsächlich aus kurzkettigen Phospholipiden bestand, wurde mittels eines Fluoreszenzdetektors erkannt. Im Fluoreszenzbereich wurde bei einer Anregungswellenlänge von  $\lambda=360$  nm, einer Emissionswellenlänge von  $\lambda=460$  nm und einer "response time" von 0,5 Sekunden gemessen. Im UV-Bereich wurde bei einer Wellenlänge von  $\lambda=205$  nm nicht derivatisiertes PC detektiert.

Identifiziert wurde die FPC-Fraktion durch den Vergleich der relativen Retentionszeit mit einem externen Standard. Weiterer Anhaltspunkt für die Identifizierung der fluoreszenzmarkierten FPC-Fraktion war der im UV-Bereich detektierte nicht derivatisierte PC-Peak (Abbildung 5). Am Ende dieses PC-Peaks eluierte kurzkettiges, polares, fluoreszenzmarkiertes FPC. Es wurde manuell gesammelt, sobald die FPC-Fraktion auf dem Fluoreszenzkanal sichtbar wurde. Die FPC-Fraktion wurde unter einem Stickstoffstrom getrocknet und in 100  $\mu\text{l}$  Methanol aufgenommen. Die Quantifizierung von FPC erfolgte im zweiten

Schritt auf einer RP-Säule.

## 2.2.5 Quantifizierung von FPC mittels RP-HPLC

Die HPLC war wie folgt aufgebaut:

Detektor	Fluoreszenzdetektor RF 551	Shimadzu, Tokio
Autosampler	AS-2000	Merck, Hitachi, Tokio
Pumpe	L-6200 A	Merck, Hitachi, Tokio
Interface	D-6000	Merck, Hitachi, Tokio
Ofen	Thermostat L-5025	Merck, Hitachi, Tokio
Software	D 6000 HPLC-Manager	Merck, Hitachi, Tokio
Degasser	Degasys DG-1310	Uniflow

Die Quantifizierung wurde an einer RP C<sub>18</sub> Säule Nucleosil 100 (10 µm, 250x4 mm) mit einer Laufmittelmischung aus Methanol/H<sub>2</sub>O (9:1) [Laufmittel A] und Methanol/Acetonitril (9:1) [Laufmittel B] durchgeführt. Zur Erhöhung der Trennschärfe von cholinhaltigen Lipiden enthielten die Laufmittel jeweils 20 mM Cholinchlorid. Die mobile Phase bestand von Anfang der Trennung bis zur 29. Minute aus 100 % Laufmittel A. Von der 29. Minute bis zur 31. Minute wurde der Anteil des Laufmittel B auf 100 % erhöht. Die Säule wurde für 29 Minuten mit Laufmittel B gewaschen. Ab der 70. Minute wurde die Säule wieder mit 100 % Laufmittel A equilibriert und für die nächste Probe vorbereitet.

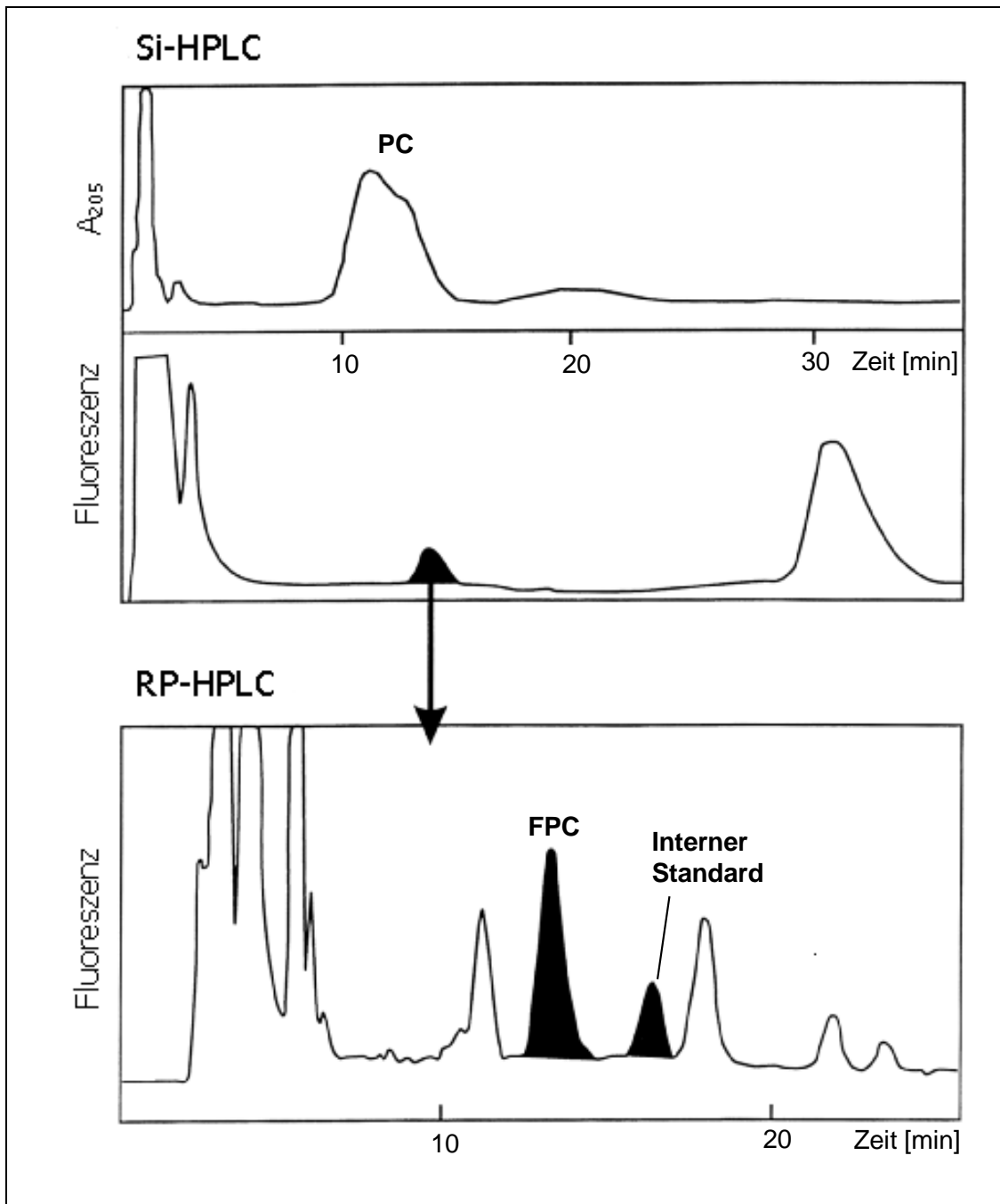


Abbildung 5: Bestimmung von FPC mittels HPLC

Die Abbildung zeigt die Si-HPLC, die zur Isolierung von FPC führt und die RP-HPLC mit der die Quantifizierung von FPC durchgeführt wird. Bei der Isolierung von FPC erscheint im UV Kanal ein nicht derivatisierter PC-Peak, der als Orientierungshilfe für FPC verwendet wird, denn am Ende dieser PC-Fraktion wird im Fluoreszenzbereich die FPC-Fraktion sichtbar. Diese Fraktion wird manuell gesammelt und danach auf der RP-HPLC Säule chromatographiert. Die Quantifizierung erfolgte durch den Vergleich der Peakfläche von FPC mit dem des internen Standards.

Die Trennung erfolgte bei 50 °C und einem Fluss von 1 ml/min. Die Detektion erfolgte im Fluoreszenzbereich bei einer Anregungswellenlänge von  $\lambda = 360$  nm, einer Emissionswellenlänge von  $\lambda = 460$  nm und einer „response time“ von 0,5 Sekunden. FPC wurde durch seine relative Retentionszeit zum internen Standard bei 0.80 identifiziert. Die Quantifizierung erfolgte durch den Vergleich der Peakfläche von FPC mit der des internen Standards.

#### 2.2.6 Synthese des internen Standards 1-Palmitoyl-2-suberoyl-PC

Es wurden 10 mg Lyso-Phosphatidylcholin in 1 ml Pyridin gelöst und unter einem Stickstoffstrom bei 60 °C getrocknet. Gleichzeitig wurden 50 mg Suberinsäure in 2,5 ml Benzen/ Methanol (5+1) gelöst. Die Lösung wurde mit einer Spatelspitze des basischen Katalysators 1,1'-Carbonyldiimidazol versetzt und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Das getrocknete Lyso-PC wurde anschließend mit dem aktivierten Reaktionsgemisch, bestehend aus der Suberinsäure und dem Katalysator versetzt, und für 1 Stunde bei 37 °C inkubiert. Auf diese Weise erfolgte die Veresterung der *sn*-2 Position des Lyso-PCs mit der Dicarbonsäure. Der Reaktionsansatz wurde unter Stickstoff bei 60 °C getrocknet und in 2 ml einer Mischung Chloroform/ Methanol (1:1) aufgenommen. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch nach Bligh und Dyer (1959) extrahiert. Es wurde unter Stickstoff getrocknet und in 100  $\mu$ l MeOH aufgenommen. Danach folgten zwei weitere Reinigungsschritte durch HPLC und DC.

Zunächst wurde das Reaktionsgemisch an einer RP C<sub>18</sub> Nucleosil 100 Säule (10  $\mu$ m, 250x4 mm) mit einem Laufmittel aus Methanol/ Wasser/ Acetonitril (905: 70: 25) gereinigt. Das Laufmittel enthielt 25 mM NH<sub>4</sub>OOCH. Die Trennung erfolgte bei einem Fluss von 1 ml/min und einer Temperatur von 50 °C. Es wurden von Anfang bis zur 15. Minute 1 ml-Fractionen gesammelt.

Danach wurden die Fraktionen auf Anwesenheit von Syntheseprodukt mit Hilfe der DC getestet. Dafür wurden 10 % der Fraktionen auf eine Silica Gel Dünnschichtplatte (Merck) aufgetragen. Das Fließmittel bestand aus einer Mischung aus Chloroform/ Methanol/ Essigsäure/ Wasser (78: 40: 14: 6). Nach 1-dimensionaler Trennung des Reaktionsgemisches wurden die Reaktionsprodukte mittels Phosphatspray detektiert. Die Zuordnung des Syntheseproduktes erfolgte anhand der mitchromatographierten Vergleichssubstanzen PC und Lyso-PC. Das Syntheseprodukt befand sich zwischen Lyso-PC und PC (Abbildung 6). Die Fraktionen, in denen sich das angereicherte Syntheseprodukt befand, wurden vereinigt und vollständig unter den bereits beschriebenen Bedingungen auf die Dünnschichtplatte aufgetragen. Im Anschluss daran wurden die Fleckenränder selektiv angefärbt. Die Kieselgelzonen, die das Syntheseprodukt enthielten, wurden abgetragen und mit Chloroform/ Methanol (2:1) extrahiert. Das Kieselgel wurde durch Zentrifugation abgetrennt und die organische Phase abgehoben. Das Lösungsmittelgemisch wurde mit Stickstoff bei 60°C verblasen. Anschließend wurde das gereinigte Syntheseprodukt in ein definiertes Volumen Ethanol aufgenommen und die Konzentration mittels GC bestimmt (2.2.7 Konzentrationsbestimmung).

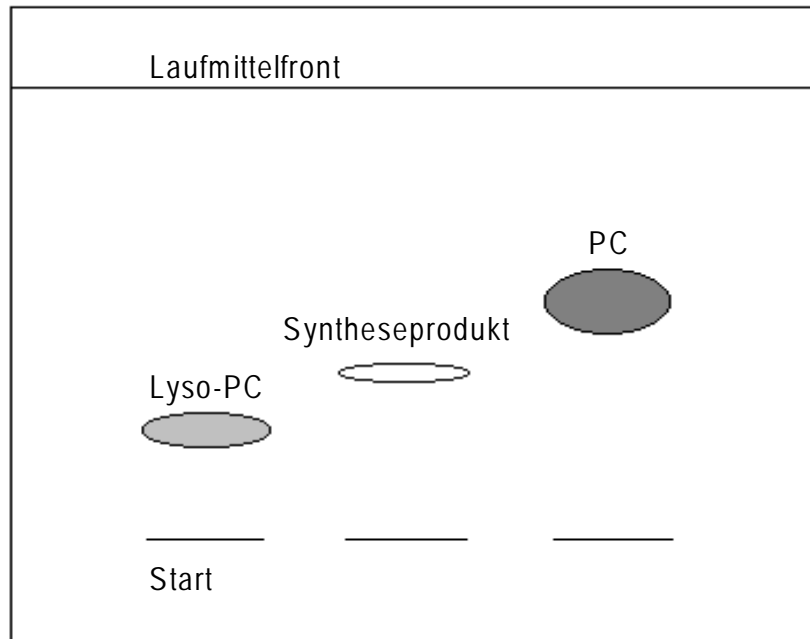


Abbildung 6: Dünnschichtchromatographisches Verhalten des Syntheseprodukts 1-Palmitoyl-2-suberoyl-phosphatidylcholin

Die Proben wurden auf eine Silica Gel Dünnschichtplatte (Merck) aufgetragen. Das Syntheseprodukt befand sich zwischen Lyso-PC und PC. Das Fließmittel bestand aus Chloroform/ Methanol/ Essigsäure/ Wasser (78:40:14:6). Die Detektion erfolgte mittels Phosphatspray.

### 2.2.7 Konzentrationsbestimmung des internen Standards mittels GC

Ein Aliquot des Syntheseprodukts 1-Palmitoyl-2-suberoyl-phosphatidylcholin wurde mit 10 µl des internen Fettsäurestandards Heptadecansäure (20 g/l) versetzt und danach mit 2 ml Methanol, 1 ml Chloroform und 0,5 ml H<sub>2</sub>O gemischt. Nach zweiminütiger Zentrifugation bei 1.000 g wurde die untere Phase abgehoben und die obere Phase nochmals mit einer Mischung aus 1 ml Chloroform und 0,5 ml H<sub>2</sub>O extrahiert. Nach weiterer Zentrifugation unter beschriebenen Bedingungen wurde die untere Phase gewonnen und in verschließbare Reagenzgläser überführt. Es erfolgte die Trocknung unter einem Stickstoffstrom und anschließend die Transmethylierung der Acylreste durch Zugabe von 150 µl Toluol und 2 ml HCl/ Methanol (0,5 M HCl in wasserfreiem Methanol). Die Reagenzgläser wurden verschlossen und bei 90 °C über Nacht inkubiert. Nach Abkühlung der Proben auf Raumtemperatur wurden sie mit 3,5 ml 10 % NaHCO<sub>3</sub>-

Lösung versetzt und kräftig gemischt. Die Mischung wurde in neue Reagenzgläser überführt und mit 1,5 ml Hexan versetzt. Nach erfolgter Phasentrennung wurde die obere Phase in einem weiteren Reagenzglas über wasserfreiem  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet. Die Reaktionsmischung wurde noch einmal mit 1 ml Hexan extrahiert und die obere Phase ebenfalls über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet. Die vereinte Hexanphase wurde unter Stickstoff getrocknet und in 0,1 ml Toluol aufgenommen.

Die gaschromatographische Quantifizierung des Palmitinsäurerests erfolgte an einer DB-Wax 225 Säule (30 m, 0,25 mm, Belegung 0,25  $\mu\text{m}$ ). Bei dem Gaschromatographen handelte es sich um das Gerät Varian 1400 der Firma Shimadzu (Japan). Ein Mikroliter der Probe wurden bei einer Injektortemperatur von 245 °C injiziert. Der Ofen wurde von 140 °C auf 240 °C in 38 Minuten erwärmt. Die Detektion wurde mit einem Flammenionisationsdetektor bei 300 °C durchgeführt. Die Identifizierung der Palmitinsäure erfolgte durch den Vergleich zu der relativen Retentionszeit des internen Standards. Quantifiziert wurde durch den Vergleich des Palmitinsäurerestes mit dem internen Standard.

### **2.3 Messung der biologischen Aktivität**

Die biologische Aktivität wurde durch die Freisetzung von [ $^3\text{H}$ ] Serotonin aus Kaninchenthrombozyten gemessen (Benveniste et al., 1972; Yue et al., 1990).

#### **2.3.1 Lipidextraktion**

Zunächst wurden 2 ml Plasma gemäß der Methode von Bligh und Dyer (1959) extrahiert, indem 4 ml Methanol und 2 ml Chloroform unter kräftigem Mischen hinzugegeben wurden. Anschließend folgte eine Inkubation bei 37 °C für 30 Minuten. Danach wurde die Probe mit 1 ml 10 mM HCl versetzt und durchmischt. Nach Einsetzen der Phasentrennung wurden weitere 2 ml Chloroform

und 2 ml 10 mM HCl schrittweise hinzugegeben und kräftig gemischt. Nach 5-minütiger Zentrifugation bei 2.250 g wurde die Unterphase gewonnen und die wässrige Phase nochmals mit 4 ml Chloroform extrahiert. Die Chloroformphasen wurden vereint und unter Stickstoff bei 40 °C auf dem Heizblock getrocknet. Der getrocknete Lipidextrakt wurde in einer Mischung aus 2 ml Chloroform und 0,4 ml Ethanol aufgenommen.

### 2.3.2 Festphasenextraktion

Der Lipidextrakt wurde auf eine 500 mg Silica-Kartusche (Supelclean LC-SI SPE, 3 ml, 500 mg) gegeben, die vorher mit 3 ml Ethanol konditioniert wurde. Nach dem Waschen mit 3 ml Ethanol wurde mit 4 ml einer Mischung aus Methanol/ H<sub>2</sub>O (3:1) eluiert. Das Eluat wurde in einem zweiten Schritt auf eine RP C<sub>18</sub> Kartusche (Supelclean LC-18 SPE, 1 ml, 100 mg) gegeben, die vorher mit 1 ml Methanol gereinigt und mit 4 ml Methanol/ H<sub>2</sub>O (3:1) konditioniert wurde. Es erfolgte die Elution der polaren Phospholipide mit 3 ml einer Mischung aus Methanol/ H<sub>2</sub>O (9:1). Das Eluat wurde unter Stickstoff bei 40 °C verblasen und in 1 ml Ethanol aufgenommen.

### 2.3.3 Isolation [<sup>3</sup>H] Serotonin-markierter Kaninchenthrombozyten

Ein Volumenteil Kaninchenblut wurde mit 9 Volumenteilen ACD (B. Braun, Melsungen) versetzt. Durch 15-minütige Zentrifugation des Blutes bei 550 g erhielt man plättchenreiches Plasma. Dieses Plasma wurde mit 1 µ Ci [<sup>3</sup>H] Serotonin versetzt. Danach wurde das Plasma bei 37°C in einem Rotationsinkubator für 60 Minuten inkubiert. Im Anschluss daran wurde das Plasma zentrifugiert. Nach 10-minütiger Zentrifugation bei 1.400 g wurde der Überstand verworfen. Die sedimentierten Thrombozyten wurden in 6 ml Gaitner Puffer (2.1.1 Lösungen) resuspendiert. Nach weiterer 10-minütiger Zentrifugation bei 2.500 g wurde das Sediment aus Thrombozyten in 2 ml BSA-haltigem Gaitner Puffer (2.1.1 Lösungen) aufgenommen und in der

Neubauerkammer gezählt. Die Thrombozytensuspension wurde auf eine Zellkonzentration von  $3 \times 10^9$  Zellen/ ml eingestellt.

#### 2.3.4 Bioassay

Eppendorfgefäße wurden mit 0,3 ml BSA-haltigem Gaitner Puffer und 5  $\mu$ l einer 25 mM  $\text{CaCl}_2$  Lösung gefüllt. Jeweils 100  $\mu$ l der radioaktiv-markierten Thrombozytensuspension (2.3.3 Isolation [ $^3\text{H}$ ] Serotonin-markierter Kaninchenthrombozyten) wurden in die Eppendorfgefäß unter vorsichtigem Mischen überführt. Die ethanolischen Festphasenextrakte (2.3.2 Festphasenextraktion) wurden unter Stickstoff getrocknet und in 100  $\mu$ l BSA-haltigem Gaitner Puffer (2.1.1 Lösungen) aufgenommen. Der Start der Reaktion erfolgte durch die Zugabe der Serotonin-markierten Kaninchenthrombozyten zu den Festphasenextrakten.

Nach 2-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Reaktion durch Zugabe von 20  $\mu$ l 9 % Formaldehyd und sofortiger Eiskühlung abgestoppt. Die Proben wurden bei 13.800 g für 3 Minuten in einer table-top Eppendorf Zentrifuge 5415 C zentrifugiert. Die Zentrifuge hatte eine Arbeitstemperatur von 4 °C. Jeweils 100  $\mu$ l des Überstandes wurden mit 4 ml Szintillationsflüssigkeit (Optiphase „Hisafe 3“, Wallac Scintillation Products) versetzt und für 5 Minuten im Szintillationscounter (Wallac 1410 Pharmacia, Uppsala, Schweden) gemessen.

Zur Kalibrierung des Bioassays wurden Lösungen unterschiedlicher PAF Konzentrationen hergestellt. PAF wurde dabei in BSA-haltigem Gaitner Puffer (2.1.1 Lösungen) aufgenommen. Die Konzentrationen der Lösungen lagen im Bereich von  $10^{-6}$  M bis  $10^{-8}$  M. Die biologische Aktivität wurde in pmol [ $^3\text{H}$ ] Serotonin/ (2 min  $\times$   $10^8$  Thrombozyten) angegeben. Die Konzentrationen der PAF-Lösungen wurden in logarithmischem Maßstab auf die Abszisse und die Messwerte der biologischen Aktivität linear auf die Ordinate aufgetragen, so dass eine S-

förmige Kurve erhalten wurde. Die gemessene biologische Aktivität der Proben wurde dann durch die Kalibrierkurve in PAF-Äquivalente umgewandelt. Unter einem PAF-Äquivalent versteht man diejenige Konzentration an PAF, die notwendig ist, um die biologische Aktivität der gemessenen Proben, auszulösen.

## 2.4 Chromatographische Charakterisierung der biologischen Aktivität

Das Festphasenextrakt (2.3.2) wurde wie bereits bei Lehr et al. (1997) beschrieben auf einer Reversed-Phase-Säule (C<sub>18</sub>-Nucleosil 100, 10 µm, 250×4 mm) getrennt. Das Laufmittel bestand aus einer Mischung Methanol/ Acetonitril/ Wasser (84:15:1) und enthielt 1 mM Ammoniumacetat. Die Trennung erfolgte bei einem Fluss von 1 ml/min. Dabei wurden von Beginn der Chromatographie bis zur 12. Minute 1 ml-Fractionen gesammelt. Die 1 ml-Fractionen wurden mit Stickstoff getrocknet und jeweils in 100 µl BSA-haltigem Gaitner Puffer (2.1.1 Lösungen) aufgenommen. In diesen Fractionen wurde dann die FPC-Konzentration (2.2 Messung von FPC) und die PAF Aktivität (2.3 Messung der biologischen Aktivität) bestimmt. Die Wiederfindungsrate der chromatographischen Methode wurde durch die Messung der FPC-Konzentration im Plasma überprüft. Sie betrug 80 %.

Der Bioassay kann jedoch nicht zwischen PAF und PAF-ähnlichen Lipiden unterscheiden. Deshalb wurde in einem separaten Versuch Plasma mit [H<sup>3</sup>] PAF versetzt und das chromatographische Elutionsverhalten von [H<sup>3</sup>] PAF bestimmt. Dazu wurde [H<sup>3</sup>] PAF in Ethanol gelöst und unter den selben Trennbedingungen wie oben beschrieben in 12 Fractionen getrennt. Jede Fraction wurde unter Stickstoff getrocknet und mit 4 ml Szintillationsflüssigkeit (Optiphase „Hisafe 3“, Wallac Scintillation Products) versetzt. Es erfolgte die Bestimmung der Radioaktivität im Szintillationscounter (Wallac 1410 Pharmacia, Uppsala, Schweden). Die Wiederfindungsrate von [H<sup>3</sup>] PAF lag bei 70 %.

## 2.5 Messung der Phospholipase A<sub>2</sub>

Die Messung der Phospholipase A<sub>2</sub> Aktivität wurde nach der Methode von Kim und Bonventre (1993) mit Modifikationen von Nakamura et al. (1995) durchgeführt. Die Phospholipase A<sub>2</sub> ist ein Enzym, das langkettige Fettsäuren von der *sn*-2 Position des Glycerols der Phospholipide abspaltet. Bei der Methode wurde ein Phospholipid mit radioaktiv markiertem Acylrest in *sn*-2 Position verwendet, das durch die Phospholipase A<sub>2</sub> in die Lyso-Verbindung und eine radioaktiv markierte Fettsäure gespalten wurde. Die Bestimmung der Aktivität erfolgte dabei durch die Menge freigesetzter Fettsäure pro Zeiteinheit.

Die Phospholipase A<sub>2</sub> wurde im Plasma, im Leberhomogenat, in Typ II Zellen und in der alveolären Lavage bestimmt. Die Proben wurden mit einem calciumhaltigen Inkubationspuffer (2.1.1 Lösungen) verdünnt. Plasma wurde 1:5 und Leberhomogenat 1:1 verdünnt. Zwei Millionen Typ II Zellen wurden in 98 µl des Inkubationspuffers aufgenommen und weiterverarbeitet. Die alveoläre Lavage wurde ohne Zusatz von Inkubationspuffer weiterverarbeitet.

Das Substrat enthielt 2,5 µ Ci 2-[1-<sup>14</sup>C]-Arachidonyl-Phosphatidylethanolamin gelöst in 100 µl Dimethylsulfoxid. Den vorbereiteten Proben wurden 98 µl entnommen und mit 0,9 nmol (2 µl) des radioaktiv markierten Substrates versetzt. Nach einer einstündigen Inkubation bei 37°C im Wasserbad wurde die Reaktion durch Zugabe von 0,56 ml Dole Reagenz (Dole et al., 1960) (2.1.1 Lösungen) gestoppt. Nach Zugabe von 110 µl H<sub>2</sub>O und kräftigem Mischen wurde für 3 Minuten bei 1.900 g zentrifugiert. Anschließend wurden 0,15 ml der oberen organischen Phase abgehoben und in ein neues Reagenzglas überführt. Dieses Reagenzglas wurde vorher mit 25 mg Kieselgel 60 und 0,85 ml n-Heptan gefüllt. Es erfolgte eine 5-minütige Inkubation und eine 5-minütige Zentrifugation bei 1.900 g. Anschließend wurden 0,8 ml des organischen Überstandes mit 4 ml Szintillationsflüssigkeit (Optiphase „Hisafe 3“, Wallac Scintillation Products) versetzt und im Szintillationscounter (Wallac 1410

Pharmacia, Uppsala, Schweden) für 10 Minuten gemessen. Die gemessene Radioaktivität wurde mit Hilfe der spezifischen Radioaktivität in die Enzymaktivität umgerechnet und in pmol/ h/ mg Protein oder pmol/ h/ ml Plasma angegeben.

## 2.6 Messung der PAF-Acetylhydrolase Aktivität

Die Messung der PAF-Acetylhydrolase erfolgte durch die Methode von Stafforini et al. (1987) mit Modifikationen nach Schlame et al. (1998). Die PAF-Acetylhydrolase spaltet kurzkettige Reste an der *sn*-2 Position von Phospholipiden ab. Wir verwendeten PAF mit radioaktiv markiertem [<sup>3</sup>H] Acetatrest. Die Aktivität der PAF-Acetylhydrolase wurde durch die Quantifizierung der freigesetzten, radioaktiv markierten Essigsäure bestimmt.

Das Probenmaterial (Plasma, Leberhomogenat, Typ II Zellen, alveoläre Lavage) wurde mit einem Inkubationspuffer (2.1.1 Lösungen; Inkubationspuffer II) verdünnt. Plasma wurde mit diesem Puffer 1:100 verdünnt. Leberhomogenat und alveoläre Lavage wurden 1:5 verdünnt. Eine Million Typ II Zellen wurden in 10 µl des Puffers aufgenommen und weiterverarbeitet.

Zur Herstellung der Substratlösung wurden 1µCi [<sup>3</sup>H] PAF (1-Hexadecyl-2-[<sup>3</sup>H]acetyl-*sn*-glycero-3-phosphorylcholin) mit 40 µl 10 mM ethanolischer PAF-Lösung versetzt, unter einem Stickstoffstrom getrocknet und in 1 ml 0,02 % Tween 20 aufgenommen. Der Emulgator sollte dem Enzym ausreichend lipophile Oberfläche anbieten, um den Einfluss von Lipoproteinen zu unterbinden.

Die Reaktion wurde gestartet, indem 20 µl der vorbereiteten Proben mit 10 µl Inkubationspuffer, 10 µl Substratlösung und 10 µl H<sub>2</sub>O versetzt wurden. Das Reaktionsgemisch wurde für 30 Minuten bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Das

Abstoppen der Reaktion erfolgte durch Zugabe von 2,5 ml einer Mischung aus Chloroform/ Methanol (4:1). Um eine Phasentrennung zu erhalten, wurden 0,45 ml 0,01 M Tris-Puffer (pH 7,4) hinzugegeben und für 30 Sekunden gemischt. Nach erfolgter Phasentrennung wurden 0,5 ml des wäßrigen Überstandes abgenommen und mit 4 ml Szintillationsflüssigkeit (Optiphase „Hisafe 3“, Wallac Scintillation Products) versetzt. Die Messung der Proben erfolgte im Szintillationscounter für 5 Minuten (Wallac 1410 Pharmacia, Uppsala, Schweden).

## 2.7 Messung von LOOHs

Mit Hilfe des käuflichen Kits LPO-CC der Firma Kamiya Biomedical Co. (Thousand Oaks, CA) wurden die Lipidhydroperoxide im Plasma nach der Methode von Ohishi et al. (1985) und Tateishi et al. (1987) photometrisch gemessen. Dazu wurden 10 µl Plasma mit 1 ml Reagenz 1 versetzt und für 5 Minuten im Wasserbad bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurden 2 ml des Reagenz 2 hinzugefügt und 10 Minuten unter den genannten Bedingungen inkubiert. Es entstand das farbige Methylenblau in stöchiometrischen Anteilen. Die Messung wurde photometrisch bei  $\lambda = 675$  nm durchgeführt. Die Auswertung erfolgte anhand einer Kalibrierkurve.

## 2.8 Messung des Phosphatgehalts von Phospholipiden

Die Messung des Phosphats in Phospholipiden erfolgte durch die Methode von Bartlett (1959). Phospholipide wurden aus Plasma oder anderen lipidhaltigen Untersuchungsmaterialien extrahiert (2.2.1 Modifizierte Lipidextraktion). Der Lipidextrakt wurde unter Stickstoff bei 60 °C eingedunstet. Nach Zugabe von 1 ml Perchlorsäure (70 %) wurde die Probe bei 180 °C für 5 Stunden verascht. Die abgekühlten Proben wurden zuerst mit 5 ml einer 0,3 mM Ammoniummolybdatlösung und anschließend mit 0,1 ml einer 0,3 M Ascorbinsäurelösung versetzt. Nach jeder Zugabe wurde kräftig gemischt. Danach erfolgte eine einstündige Inkubation im Wasserbad bei 60°C. Der gebildete Farbkomplex wurde

photometrisch bei  $\lambda = 705$  nm gemessen. Die Auswertung erfolgte anhand einer Kalibrierkurve.

## 2.9 Fraktionierung von Plasma

### 2.9.1 Plasmagewinnung

Blut wurde in EDTA Monovetten (2,7 ml S-Monovette<sup>®</sup> KE Sarstedt, Nümbrecht) aufgezogen und für 5 Minuten bei 2.250 g zentrifugiert. Das Plasma wurde separiert und ein Aliquot zur modifizierten Lipidextraktion (2.2.1) eingesetzt.

### 2.9.2 Thrombozyten

Plättchenreiches Plasma wurde gewonnen, indem EDTA-Blut für 5 Minuten bei Raumtemperatur bei 1.000 g zentrifugiert wurde. Ein Milliliter des Überstandes wurde bei 2.250 g für 10 Minuten zentrifugiert. Damit erreichte man die Trennung der Thrombozyten vom Plasma. Mittels Zellzählung konnte gezeigt werden, dass 98,5 % der Thrombozyten sedimentierten. Das Thrombozytensediment wurde mit 1 ml NaCl 0.9% (m/V) gewaschen und wiederholt bei 2.250g für 10 Minuten zentrifugiert. Anschließend wurden die Thrombozyten in 1 ml NaCl 0.9 % (m/V) resuspendiert.

## 2.9.3 Lipoproteine

### *2.9.3.1 Differentialfällung*

Nach der Methode von Burstein et al. (1973) erfolgte die Fällung der Lipoproteine und der wasserlöslichen Proteine mit einer Mischung aus Phosphorwolframsäure und  $MgCl_2$  (Abbildung 7).

Zunächst wurden 10 Volumenteile Plasma mit einem Volumenteil 4 %-ige Phosphorwolframsäure (pH 7,6) und 1/4 Volumenteil 2 M  $MgCl_2$  versetzt. Die Lösung wurde kräftig gemischt und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Das gefällte LDL wurde nach 10-minütiger Zentrifugation bei 2.250 g vom Überstand abgetrennt und in 1 ml 10 %-iger Natriumcitratlösung resuspendiert. Im weiteren Fällungsschritt wurden durch die Zugabe von einem Volumenteil Phosphorwolframsäure zu einem Volumenteil Überstand die wasserlöslichen Proteine gefällt. Nach Zentrifugation unter den bereits beschriebenen Bedingungen wurden die wasserlöslichen Proteine im Präzipitat erhalten. Die wasserlöslichen Proteine wurden ebenfalls in 1 ml 10 %-iger Natriumcitratlösung resuspendiert. Ein Volumenteil des Überstandes aus dem zweiten Fällungsschritt wurde mit 1/10 Volumenteil einer 2 M  $MgCl_2$  Lösung gemischt. Es folgte eine Inkubation für 10 Minuten bei Raumtemperatur und ein Zentrifugationsschritt unter den bereits beschriebenen Bedingungen. Dieses dritte Präzipitat bestand aus HDL und wurde in 1 ml 10 %-iger Natriumcitratlösung resuspendiert. In allen resuspendierten Fraktionen (LDL, wasserlösliche Proteine und HDL), sowie im letzten Überstand wurde FPC, Apo A1 (Apoprotein von HDL), Apo B (Apoprotein von LDL), Albumin und PC bestimmt.

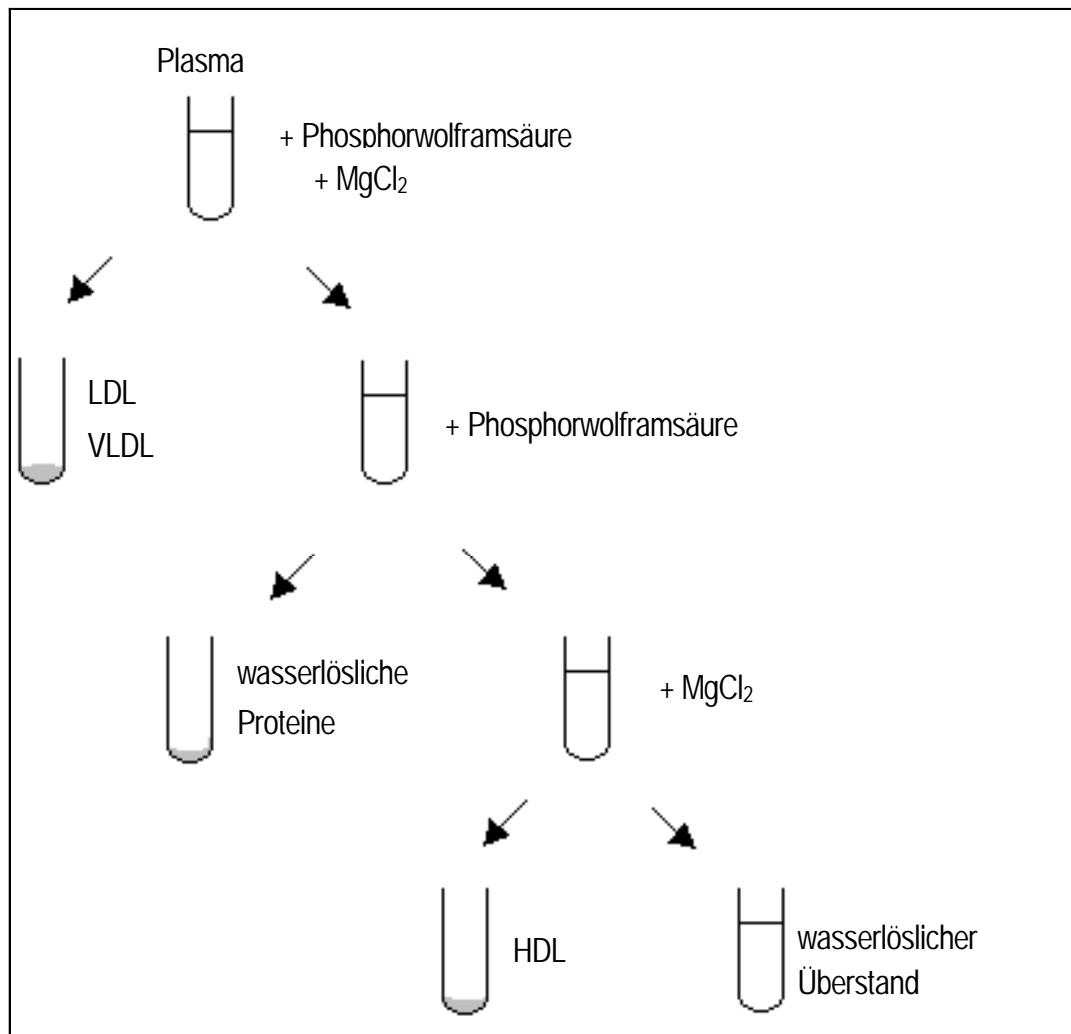


Abbildung 7: Differentialfällung nach Burstein et al. (1973)

Plasma wurde fraktioniert gefällt mit einer Mischung aus Phosphorwolframsäure und  $MgCl_2$ . Dabei wurden nacheinander LDL/VLDL, wasserlösliche Proteine und HDL gefällt.

### 2.9.3.2 Ultrazentrifugation

Als Alternative zur Differentialfällung wurde die Ultrazentrifugation eingesetzt. Lipoproteine und Albumin wurden mit Hilfe der Methode von Sattler et al. (1994) in einer Beckman TL-100 tabletop Ultrazentrifuge (Palo Alto, CA) getrennt. Es wurden 1,94 ml PBS Puffer (2.1.1 Lösungen) in ein dickwandiges Polycarbonatzentrifugen-Reagenzglas (Beckman) gegeben und mit KBr-haltigem Plasma (381,6 mg/ml) unterlegt. Es erfolgte eine 2-stündige Ultrazentrifugation bei 541.000 g und 15 °C. Anschließend wurden 6 Fraktionen à 450 µl mit Hilfe

einer Pipette von unten nach oben entnommen. In einem Aliquot aus jeder Fraktion wurde Apo A1 (HDL Marker), Apo B (LDL Marker), Albumin, PC sowie Ig G (Immunglobulin G) bestimmt. Der Hauptanteil an Albumin befand sich in der ersten Fraktion. In Fraktion zwei und drei verteilte sich die Hauptmenge an Apo A1, so dass die Konzentrationen dieser beiden Fraktionen zu einer HDL-Fraktion zusammengefasst wurden. Fraktion vier und fünf bildeten die LDL-Fraktion. In der sechsten Fraktion befanden sich VLDL und Chylomikronen. In 400 µl jeder Fraktion wurde die Konzentration von FPC, wie unter 2.2.1 beschrieben, bestimmt.

#### 2.9.4 Messung von Albumin

Die Messungen wurden im Institut für Laboratoriumsmedizin und Pathobiochemie der Charité durchgeführt.

Die Konzentrationsbestimmung von Albumin erfolgte nach der Methode von Doumas (1971). Albumin bildete mit Bromcresolgrün bei pH 4,2 unter Farbveränderung einen Komplex, der durch photometrische Messung der Absorption bei  $\lambda=623$  nm bestimmt wurde. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte anhand einer Kalibrierkurve.

#### 2.9.5 Messung von Cholesterol

Die Messungen wurden im Institut für Laboratoriumsmedizin und Pathobiochemie der Charité durchgeführt.

Die Messung des Cholesterols erfolgte mit Hilfe eines enzymatischen Farbttests. Nach enzymatischer Hydrolyse der in der Probe enthaltenen Cholesterolester mit einer spezifischen Esterase, wurde das gewonnene Cholesterol durch die

Cholesterol-Oxidase zu  $\Delta^4$  Cholestenon oxidiert. Das dabei entstandene  $H_2O_2$  reagierte mit Phenol und 4-Aminophenazon unter katalytischer Wirkung von Peroxidase und bildete einen roten Farbstoff, dessen Intensität direkt proportional zu der vorhandenen Cholesterolmenge war. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte anhand einer Eichkurve. Die Extinktion wurde bei  $\lambda=470$  nm gemessen.

### 2.9.6 Messung von Apo A1 und B

Die Messungen wurden im Institut für Laboratoriumsmedizin und Pathobiochemie der Charité durchgeführt.

Die quantitative Bestimmung von Apoprotein A1 und B erfolgte durch einen immunologischen Trübungstest. Die im menschlichen Serum enthaltenen Apolipoproteine bildeten in einer immunchemischen Reaktion Komplexe mit spezifischen Antikörpern. An diesen Komplexen wurde eingestrahktes Licht gestreut. Die Intensität des Streulichtes war bei konstanter Antikörpermenge abhängig von der Apolipoproteinkonzentration in der Probe und wurde anhand einer Eichkurve bestimmt.

## 2.10 Fraktionierung von Lebergewebe

### 2.10.1 Leberhomogenat

Wistar-Ratten wurden mittels Pentobarbital narkotisiert und durch Öffnen der Halsschlagader entblutet. Die Leber wurde sofort entnommen und in einem eisgekühlten Homogenisationspuffer (2.1.1 Lösungen) gewaschen und zerkleinert. Das Gewebe wurde mit Homogenisationspuffer im Verhältnis 1:5 (m/V) versetzt und mit Hilfe eines Dounce-Homogenisator eisgekühlt homogenisiert. Sodann wurden 0,5 ml Leberhomogenat, wie 2.1.2 beschrieben, weiterverarbeitet und

die FPC-Konzentration bestimmt. In einem Aliquot wurde die Proteinkonzentration bestimmt.

### 2.10.2 Subzelluläre Fraktionen

Das Homogenat wurde anschließend durch Differentialzentrifugation in die nukleäre Fraktion, Mitochondrien, Mikrosomen und das Cytosol getrennt. Durch Zentrifugation für 10 Minuten bei 300 g sedimentierte die nukleäre Fraktion. Durch die anschließende Zentrifugation des entstandenen Überstands bei 20.000 g für 20 Minuten wurden die Mitochondrien abgetrennt, während das Cytosol und die Mikrosomen im Überstand bleiben. Dieser Überstand konnte durch Zentrifugation für 90 Minuten bei 105.000 g in Mikrosomen und Überstand getrennt werden. Im Überstand befand sich das Cytosol. Alle Zentrifugationsschritte wurden bei 4 °C durchgeführt. Alle Niederschläge wurden mit Homogenisationspuffer gewaschen und in 1 ml resuspendiert. In Aliquoten der nukleären Fraktion, Mitochondrien, Mikrosomen und des Cytosols wurde die Proteinkonzentration bestimmt. In den einzelnen Fraktionen wurde die FPC-Konzentration bestimmt.

## 2.11 Gewinnung von alveolärer Lavage und von Typ II Zellen

### 2.11.1 Präparation von alveolärer Lavage

Wistar-Ratten (120 g) wurden mit 40 mg Pentobarbital narkotisiert, entblutet und über die Trachea intubiert. Die Lunge wurde über einen Katheter im rechten Vorhof des Herzen mit physiologischer Kochsalzlösung gespült und beatmet. Die blutfreie Lunge wurde fünf Mal mit 8 ml physiologischer Kochsalzlösung lavagiert. Die Lavage wurde anschließend bei 150 g für 10 Minuten zentrifugiert, um zelluläre Bestandteile zu entfernen. Im Überstand wurde die Aktivität der PAF-Acetylhydrolase, die Aktivität der Phospholipase A<sub>2</sub> und die

Proteinkonzentration bestimmt.

Zur Bestimmung von FPC musste die Lavage konzentriert werden. Es wurden 12 ml Lavage bei 4 °C für 1 Stunde bei 100.000 g zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Das Pellet wurde in 0,5 ml physiologischer Kochsalzlösung resuspendiert. Die Probe wurde wie unter 2.1.2 beschrieben weiterverarbeitet und FPC bestimmt. In einem Aliquot erfolgte die Bestimmung der Phospholipidkonzentration (2.8 Messung des Phosphatgehalts von Phospholipiden). Die Konzentration von FPC wurde auf die in der Lavage enthaltenen Phospholipide bezogen.

#### 2.11.2 Präparation von Typ II Zellen

Die Isolation der Typ-II-Pneumozyten aus Ratten erfolgte durch Elastaseverdauung (Roche Biochemicals) und anschließender Reinigung der Zellen auf IgG-Platten nach Dobbs et al. (1986). Ratten wurden narkotisiert und über die Trachea wurde die Lunge mit Lösung I instilliert (Lösung 2.1.1). Anschließend wurde das lavagierte und entblutete Lungengewebe mit 6 mg Elastase für 32 Minuten bei 37°C verdaut. Die kleingeschnittene Lunge wurde mit 2 mg DNase und 4 ml Fetalem Kälberserum kräftig gemischt, filtriert und die Zellen bei 160 g bei 4 °C für 10 min abzentrifugiert. Die Reinigung der Zellen erfolgte auf IgG-beschichteten Plastikschalen (Rat IgG) für 40 Minuten bei 37 °C unter 5 % Kohlendioxid. Eine Million Zellen wurden in 0,5 ml DMEM aufgenommen. Die Zellen wurden bei 37 °C unter 5% Kohlendioxid präpariert. Bei der Präparation einer Lunge wurden 15-20 Millionen Zellen gewonnen, die Vitalitätsfärbung mit 0,2 % Trypanblau ergab >95 % vitale Zellen, im Flow Cytometer wurde eine Reinheit von 75-85 % gemessen.

## 2.12 Proteinbestimmung nach Bradford

Zur Proteinbestimmung nach Bradford (1976) wurde der '*Protein Assay*' der Firma Bio-Rad verwendet. Es wurden 2-10 µl Proteinextrakt eingesetzt, und mit 790-798 µl Wasser und 200 µl Farbreagenz gemischt. Nach 5-minütiger Inkubation wurde die Extinktion bei  $\lambda=595$  nm gemessen. Als Standard wurde 1 mg/ml BSA-Lösung eingesetzt. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte durch den Vergleich mit einer Kalibrierkurve.

## 2.13 Oxidation von Typ II Zellen mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Zehn Millionen Typ II Zellen wurden mit 100 µl 300 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in DMEM (ohne Phenolrot) für 10 Minuten inkubiert. Anschließend wurden die Zellen bei 200 g für 3 Minuten abzentrifugiert, erneut 100 µl der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung hinzugefügt und für 10 Minuten inkubiert. Dieser Arbeitsschritt erfolgte insgesamt drei Mal.

Die Zellen wurden bei 200 g für 3 Minuten bei Raumtemperatur abzentrifugiert, mit PBS Puffer (2.1.1 Lösungen) gewaschen und resuspendiert. Im Anschluss daran wurden die Zellen bei 160 g und 4°C für 10 Minuten durch Zentrifugation abgetrennt. Zur FPC-Bestimmung wurden die Zellen in 0,5 ml PBS Puffer aufgenommen und wie unter 2.1.2 beschrieben weiterverarbeitet. Als Kontrolle diente ein Aliquot von Typ II Zellen die 30 Minuten in DMEM ohne H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inkubiert wurde.

## 2.14 Vitamin E-Depletionsversuche

Männliche Wistar-Ratten (80-90g) erhielten für 5 Wochen Vitamin E-armes Futter. Sie bildeten die Vitamin E-arme Gruppe. Nach 24-stündigem Fasten wurde ein Teil der Tiere mit Vitamin E-reichem Futter (400 mg  $\alpha$ -Tocopherol/kg) ad libitum für 48 Stunden gefüttert. Diese Tiere wurden als „Vitamin

E refed“ Gruppe, bzw. Vitamin E-reiche Gruppe bezeichnet. Die Tiere der Kontrollgruppe erhielten für 5 Wochen normales Futter mit einer moderaten Vitamin E-Konzentration. Plasma, alveoläre Lavage, Leberhomogenat und Typ II Zellen wurden gewonnen. In jedem Material erfolgte die Bestimmung des Vitamin E-Gehaltes, der FPC-Konzentration, der Phospholipase A<sub>2</sub> und PAF-Acetylhydrolase Aktivität.

Der Vitamin E-Gehalt wurde nach der Methode von Catignani und Bieri (1983) bestimmt. Es wurde in 0,2 ml Plasma oder anderem lipidhaltigen Material der Vitamin E-Gehalt bestimmt. Dazu wurden die Proben mit 450 µl Isopropanol und 50 µl des internen Vitamin E-Acetat Standards (4,5 µg/ Probe) versetzt und kräftig gemischt. Das gefällte Protein wurde durch Zentrifugation bei 4.000 g für 15 Minuten abgetrennt. Es wurden 50 µl des klaren Überstandes abgenommen. Die Quantifizierung erfolgte durch HPLC auf einer RP-Säule (C<sub>18</sub>-Nucleosil 100, 10 µm, 250×4 mm) bei einem isokratischen Fluß von 1,3 ml/min bei 50 °C. Als Laufmittel diente eine Mischung aus Methanol/ H<sub>2</sub>O (19:1). Detektiert wurde im UV-Bereich bei  $\lambda=295$  nm. Quantifiziert wurde durch den Vergleich von Vitamin E mit dem internen Standard.

## 2.15 Tierexperimente

Die Durchführung der Rattenversuche war von der zuständigen Behörde des Landes Berlin genehmigt. Die Bedingungen der Tierhaltung genügten den Anforderungen des Deutschen Tierschutzgesetzes.

## 2.16 Untersuchungen am Menschen

### 2.16.1 Genehmigung der Ethik-Kommission

Die Untersuchungen am Menschen wurden von der örtlichen Ethik-Kommission als unbedenklich eingeschätzt. Die Probanden wurden mündlich und schriftlich über die Versuchsziele und möglichen Belastungen ausführlich aufgeklärt. Die Einwilligung der Probanden erfolgte ebenfalls mündlich und schriftlich. Eine Kopie der Einwilligungserklärung wurde den Patienten ausgehändigt. Da es sich um eine genehmigte nicht interventionelle Studie handelte, konnte bei bewusstlosen Patienten auch ohne Einverständnis Blut abgenommen werden. Dies wurde anschließend in der Patientenakte vermerkt.

### 2.16.2 Raucher

Fünf Rauchern wurde venöses Blut vor und nach dem Rauchen einer Zigarette abgenommen und die FPC-Konzentration bestimmt. Jeder Raucher musste innerhalb von fünf Minuten eine Zigarette rauchen. Alle Zigaretten enthielten zwischen 0,9–1,0 mg Nikotin und 12 mg Kondensat. Die Zigarettenmarke konnte frei gewählt werden. Vor dem Rauchen wurde ein Ausgangswert abgenommen. Dann folgten weitere Abnahmen direkt nach Beendigung der Zigarette, sowie nach weiteren 10, 25 und 55 Minuten. Das Alter der Probanden lag zwischen 24 und 57 Jahren bei einem mittleren Alter von  $38 \pm 12$  Jahren. Drei Raucher waren männlich, zwei waren weiblich. Alle Probanden hatten acht Stunden vor dem Experiment weder gegessen noch geraucht. Die Probanden hatten keine akuten gesundheitlichen Probleme oder chronische Leiden.

### 2.16.3 Herzchirurgische Operation

Vier Patienten wurde im Verlauf einer Herzoperation zu verschiedenen Zeitpunkten Blut abgenommen. Damit sollte untersucht werden, wie sich die FPC-Konzentration im Verlauf der Operation verhält. Die Operation wurde mit Hilfe einer Herz-Lungen-Maschine durchgeführt. Sie ermöglicht durch die Errichtung eines extrakorporalen Kreislaufes einen chirurgischen Eingriff am offenen blutleeren Herzen. Die Blutgerinnung wird durch Gabe von hohen Dosen Heparin verhindert. Durch künstliche Pumpfunktion, Sauerstoffanreicherung, Kohlendioxidelimination und Thermoregulation kann die natürliche Herz- und Lungentätigkeit für mehrere Stunden ersetzt werden. In dieser Zeit sind Herz und Lunge vom Blutkreislauf getrennt. Nach dem Trennen des Patientens von der Herz-Lungen-Maschine kommt es zu einer Reperfusion des Herzens und der Lunge.

Die Blutabnahme erfolgte vor und nach der Narkoseeinleitung, 5 Minuten nach Verabreichung des Antikoagulanz Heparin (500 U/kg Körpergewicht), 25 Minuten nach Anschluss an die Herz-Lungen-Maschine, 10 Minuten nach Beendigung der extrakorporalen Zirkulation und 3 Stunden nach der Operation. Das Altersspektrum der Patienten lag zwischen 61 und 67 Jahren. Alle Patienten waren männlich.

In den Plasmaproben erfolgte die Bestimmung der FPC-Konzentration, der Phospholipase A<sub>2</sub> Aktivität, der Leukozyten- und Thrombozytenzahl, der Phosphatidylcholin-Konzentration sowie des Hämatokrits. Durch den gemessenen Hämatokrit konnte die Plasmaverdünnung abgeschätzt werden. FPC wurde auf Phosphatidylcholin bezogen.

In einem weiteren Experiment sollte der Einfluss der Phospholipase A<sub>2</sub> auf FPC untersucht werden. Die Heparinisierung von kardiochirurgischen Patienten diente uns als klinisches Modell, da sie mit einer Induktion der Plasma-Phos-

pholipase A<sub>2</sub> verbunden ist. Elf kardiochirurgischen Patienten wurde Heparin intravenös in hoher Dosierung (500 U/kg Körpergewicht) appliziert, bevor sie an die Herz-Lungen-Maschine angeschlossen wurden. Blut wurde kurz vor Heparinisierung und 20 Minuten nach Heparinisierung abgenommen. Zehn Patienten waren männlich, ein Patient war weiblich. Das Alter der Patienten lag zwischen 45 und 73 Jahren mit einem Durchschnittsalter von  $65 \pm 9$  Jahren. In den abgenommenen Plasmaproben erfolgte die Bestimmung der FPC-Konzentration, sowie die Bestimmung der Aktivität der Phospholipase A<sub>2</sub> und der PAF-Acetylhydrolase.

#### 2.16.4 Intensivpatienten

Es wurde eine klinische Studie an Intensivpatienten durchgeführt, mit der Fragestellung, ob ein Zusammenhang zwischen der Konzentration von Lipidperoxidationsprodukten und dem Schweregrad inflammatorischer Erkrankungen besteht. Die Durchführung der klinischen Studie erfolgte in Zusammenarbeit mit Ärzten der Intensivstation III der Klinik für Anästhesiologie und operative Intensivmedizin der Charité (Campus Mitte).

Vierundfünfzig herzchirurgische Patienten wurden untersucht, deren Operation am offenen Herzen mindestens drei Tage zurücklag. Die Patienten wurden in drei Untersuchungsgruppen und eine Kontrollgruppe eingeteilt. In den Untersuchungsgruppen hatten die Patienten Thrombozytopenie, SIRS oder gleichzeitig Thrombozytopenie und SIRS. In die Kontrollgruppe wurden Patienten eingeschlossen, die nach kurzer Beobachtungsphase auf der Intensivstation ohne Komplikationen auf eine Normalstation verlegt werden konnten.

In den Untersuchungsgruppen befanden sich 36 Patienten, 8 davon waren weiblich (22%). Die Patienten der Untersuchungsgruppe hatten ein Durchschnittsalter von  $71 \pm 8$  Jahren, wobei das Alter zwischen 51 und 81 Jahren lag.

In der Kontrollgruppe befanden sich 19 Patienten, 4 davon waren weiblich (21%). Die Patienten der Kontrollgruppe hatten ein Durchschnittsalter von  $65 \pm 5$  Jahren. Das Alter lag zwischen 44 und 77 Jahren.

SIRS wurde definiert nach den Richtlinien einer Consensus Conference (American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine, 1992). Thrombozytopenie wurde definiert als eine Verminderung der Thrombozytenzahl unter  $150 \times 10^9/l$ . Der Normalbereich liegt zwischen  $150 \times 10^9/l$  und  $400 \times 10^9/l$ . Ein Multiorganversagen lag dann vor, wenn drei oder mehr Organsysteme ausfielen. Der Zustand der Organsysteme wurde durch das Punktesystem nach Marshall et al. (1995) festgelegt. Ein Organversagen lag dann vor, wenn 2 oder mehr Punkten nach diesem Punktesystem vergeben wurden. Der Gesundheitszustand jedes Patienten wurde durch den Acute Physiology Score (APS) beurteilt. Der APS ist ein akzeptiertes Maß für den Schweregrad der Erkrankung eines Intensivpatienten. Zusammen mit den diagnostizierten Vorerkrankungen bildet der APS den APACHE II Score (Acute Physiology and Chronic Health Evaluation, 2.15.5). Dieser Score dient zur objektiven Beurteilung der Prognose eines Patienten und wurde nach der Definition von Knaus et al. (1985) angewandt.

Den Patienten wurde Blut abgenommen und folgende Parameter bestimmt: FPC-Konzentration, LOOH-Konzentration, PAF und PAF-ähnliche Bioaktivität, Phospholipase A<sub>2</sub> Aktivität, PAF-Acetylhydrolase Aktivität, Laktat-Konzentration, Fibrinogen-Konzentration und Differentialblutbild.

## 2.16.5 APACHE II (Knaus et al., 1985)

Tabelle 1: Acute Physiology Score

Funktionsgröße	erhöhte Werte			erniedrigte Werte					
	+4	+3	+2	+1	0	+1	+2	+3	+4
Rektaltemperatur [° C]	≥41	39– 40,9		38,5– 38,9	36– 38,4	34– 35,9	32– 33,9	30– 31,9	≤29,9
arterieller Mitteldruck [mmHg]	≥160	130– 159	110– 129		70–109		50–69		≤49
Herzfrequenz [min <sup>-1</sup> ] Kammerfrequenz	≥180	140– 179	110– 139		70–109		55–69	40–54	≤39
Atemfrequenz [min <sup>-1</sup> ] (spontan oder beatmet)	≥50	35–49		25–34	12–24	10–11	6–9		≤5
Oxygenation [mmHg] a) F <sub>I</sub> O <sub>2</sub> /D <sub>Aa</sub> O <sub>2</sub> b) F <sub>I</sub> O <sub>2</sub> <0,5 P <sub>a</sub> O <sub>2</sub>	≥500	350– 499	200– 349		<200 >70	61–70		55–60	<55
arterieller pH- Wert	≥7,7	7,6– 7,69		7,5– 7,59	7,33– 7,49		7,25– 7,32	7,15– 7,24	<7,15
Na im Serum [mmol/l]	≥180	160– 179	155– 159	150– 154	130– 149		120– 129	111– 119	≤110
K im Serum [mmol/l]	≥7	6–6,9		5,5–5,9	3,5–5,4	3–3,4	2,5–2,9		<2,5
Kreatinin im Serum [mg/dl]	≥3,5	2–3,4	1,5–1,9		0,6–1,4		<0,6		
Hämatokrit [%]	≥60		50– 59,9	46– 49,9	30– 45,9		20– 29,9		<20
Leukozyten [1000 mm <sup>3</sup> ]	≥40		20– 39,9	15– 19,9	3–14,9		1–2,9		<1
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> , venöses Blut [mmol/l] (nur wenn Blutgase fehlen)	≥52	41– 51,9		32– 40,9	22– 31,9		18– 21,9	15– 17,9	<15
Glasgow Coma Scale	Score = minus Glasgow Coma Scale-Punkte								

Tabelle 2: Alterspunkte

Alter (Jahre)	Punkte
≤44	0
45-54	2
55-64	3
65-74	5
≥75	6

Punkte für chronische Erkrankungen:

Für Patienten mit vorbestehenden schweren Insuffizienzen eines Organsystems oder Patienten mit Immunschwäche gelten folgende Punkte:

- a) für nichtoperative Patienten oder Notfalloperationen      5 Punkte
- b) für Elektivoperationen      2 Punkte

Berechnung des APACHE II Score:

APS+Altersbewertung+Bewertung chronischer Grunderkrankungen=APACHE II

## 2.17 Statistik

Die angegebenen Daten wurden als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung angegeben, wobei ein bestimmter Stichprobenumfang (n) zugrunde gelegt wurde. Angewandt wurde der Student-t-Test für verbundene Stichproben, wenn eine Normalverteilung vorlag. Beim Vergleich unverbundener Stichproben kam der ungepaarte Student-t-Test zur Anwendung. Der Einfluss zweier Variablen auf eine Population wurde mit Hilfe der doppelten Varianzanalyse (two-way ANOVA) untersucht. Bei dem Einfluss einer Variablen auf nicht normalverteilte

Stichproben wurde der Kruskal-Wallis-Test angewandt. Verbundene Stichproben, die nicht normalverteilt waren, wurden mit dem Wilcoxon-Test überprüft. Unverbunden nicht normalverteilte Stichproben wurden mit dem U-Test getestet. Eine Abhängigkeit zweier Variablen wurde durch den Korrelationskoeffizienten nach Pearson ermittelt. Ein signifikanter Unterschied wurde bei allen Tests mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit kleiner als 5 % ( $p < 0,05$ ) bestimmt. Für die statistischen Berechnungen wurde SigmaStat (Jandel Scientific Corp.) verwendet.

## 3 ERGEBNISSE

### 3.1 Lokalisation von FPC

FPC wurde ursprünglich in plättchenreichem Plasma entdeckt. Deshalb sollte untersucht werden, ob FPC an Thrombozyten, Lipoproteinen oder wasserlöslichen Proteinen gebunden ist oder ob es frei in der wässrigen Phase vorkommt.

#### 3.1.1 Thrombozyten

Im ersten Versuch wurde die relative Verteilung von FPC zwischen Thrombozyten und Plasma untersucht. Durch Zentrifugation wurde plättchenreiches Plasma in Thrombozyten und Überstand getrennt. Fünf unabhängige Versuche zeigten, dass sich rund 85 % von FPC im Überstand befanden (Abbildung 8), so dass FPC nicht gebunden an Thrombozyten im Plasma vorliegt.

#### 3.1.2 Plasma

In einem weiteren Versuch wurde die relative Verteilung von FPC zwischen Lipoproteinen, Proteinen und der wasserlöslichen Fraktion untersucht. Durch Differentialfällung nach Burstein et al. (1973) wurden aus plättchenarmem Plasma die LDL-, HDL-, Albumin- und die wasserlösliche Fraktion gewonnen. Die Verteilungsanalyse ergab, daß zwei Drittel von FPC in der LDL-Fraktion und ein Drittel in der HDL-Fraktion nachweisbar sind. Die FPC-Verteilung unterscheidet sich von der Verteilung des PC, das zu gleichen Teilen in der HDL und LDL-Fraktion gefunden wurde (Tabelle 3).

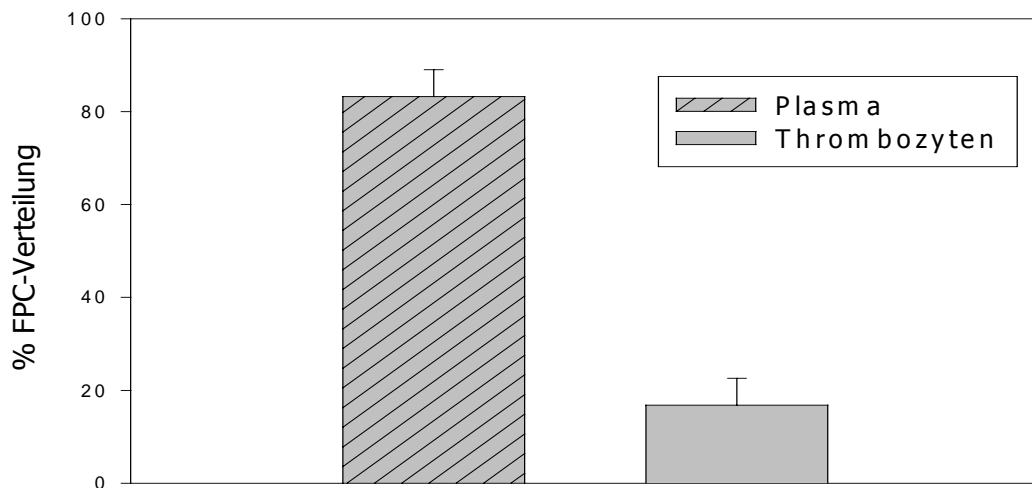


Abbildung 8: FPC-Verteilung zwischen Thrombozyten und Plasma

Die Abbildung zeigt die prozentuale Verteilung von FPC zwischen Thrombozyten und Überstand (n=5). \* markiert den statistisch signifikanten Unterschied zu der FPC-Konzentration der Thrombozyten ( $p < 0,05$ ; Wilcoxon-Test;  $\alpha = 5\%$ ).

Diese Verteilung sollte mittels einer unabhängigen Analysenmethode überprüft werden. Aus diesem Grund wurde Plasma durch Dichtegradientenultrazentrifugation in die Albumin-, HDL-, LDL- und VLDL-Fraktion getrennt. Die Hauptmenge an FPC (50 %) konnte in der Albumin-Fraktion gefunden werden, gefolgt von der HDL-Fraktion (20 %) und der LDL-Fraktion (10 %). PC verteilte sich zu zwei Drittel auf die HDL- und zu einem Drittel auf die LDL-Fraktion (Tabelle 4). Bei der Dichtegradientenultrazentrifugation erfolgt die Trennung der Lipoproteine aufgrund ihrer hydratisierten Dichte. Die schlechte Trennschärfe der Methode hat eine Vermischung der aneinanderliegenden Fraktionen zur Folge. Dadurch können Austauschprozesse zwischen den verschiedenen Fraktionen begünstigt werden. Da in unserem Experiment die Albumin- und HDL-Fraktion nicht getrennt vorlagen, könnte während der Dichtegradientenultrazentrifugation ein Austausch der FPC-Spezies von HDL auf Albumin stattgefunden haben. Die Wiederfindungsraten der Proteine (Albumin, Apo A1, Apo B) lagen deutlich unter der Wiederfindungsrate des PC. Eine Absorption der Proteine an den Gefäßwänden der Reagenzgläser könnte hierfür eine Ursache sein. Die Wiederfindungsrate von FPC lag bei 69 %.

### 3.1.3 Parenchymatöses Gewebe

Dieses Experiment sollte die Frage beantworten, ob FPC auch in Gewebe gefunden werden, und in welcher subzellulären Fraktionen FPC vorkommen. Deshalb beschränkten wir uns auf ein Experiment, das einen repräsentativen Überblick geben sollte.

Lebergewebe wurde homogenisiert und in einem Aliquot des Homogenats die FPC-Konzentration bestimmt. Das Homogenat wurde dann mittels Differentialzentrifugation in die einzelnen subzellulären Fraktionen getrennt und in diesen die FPC-Konzentration gemessen. Bezogen auf die Proteinkonzentration war die FPC-Konzentration in den Mikrosomen am höchsten, gefolgt von Mitochondrien, dem Cytosol und der nukleäre Fraktion. Der Anteil des zellulären FPC verteilt sich in folgender Reihenfolge auf Mitochondrien > Mikrosomen > nukleäre Fraktion > und Cytosol (Tabelle 5).

Tabelle 5: Untersuchung von parenchymatösem Gewebe auf FPC

Fraktionen	Protein µg	%	FPC nmol	%	FPC nmol/ mg Protein
Homogenat	1640	100	3,50	100	2,13
Nukleäre Fraktion	466	28	0,44	13	0,95
Mitochondrien	618	38	1,29	37	2,09
Mikrosomen	322	20	0,84	24	2,60
Cytosol	172	10	0,34	10	1,98

Proteinmenge und FPC-Menge werden im Homogenat gleich 100 % gesetzt (n=1).

Tabelle 3: Differentialfällung der Lipoproteine und Proteine nach Burstein et al. (1973)

	Ig G mg	%	Albumin mg	%	Apo A1 mg	%	Apo B mg	%	PC μmol	%	FPC nmol	%
Plasma Ausgangswert	11,16 ± 0,93	100 ± 8	44,7 ± 2,6	100 ± 6	1,19 ± 0,55	100 ± 5	0,83 ± 0,08	100 ± 10	2,78 ± 0,22	100 ± 8	1,57 ± 0,68	100 ± 43
Fällung 1 LDL / VLDL	0,42 ± 0,14	4 ± 1	1,7 ± 0,5	4 ± 1	0,14 ± 0,01	12 ± 1	0,58 ± 0,17	69 ± 21	1,11 ± 0,11	40 ± 4	0,72 ± 0,7	46 ± 45
Fällung 2 wasserlösliche Proteine	5,88 ± 3,28	53 ± 29	26,2 ± 2,4	59 ± 5	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0,03 ± 0,06	1 ± 2	0,06 ± 0,07	4 ± 4
Fällung 3 HDL	0,10 ± 0,10	1 ± 1	2,2 ± 0,7	5 ± 2	0,70 ± 0,20	59 ± 17	0 ± 0	0 ± 0	1,25 ± 0,28	45 ± 10	0,36 ± 0,29	23 ± 18

Angegebene Zahlen sind Mittelwerte ± Standardabweichung (n=5). Im Überstand (nicht aufgelistet) befanden sich die restlichen Anteile der wasserlöslichen Proteine, Apo A1 und B, jedoch nicht FPC.

Tabelle 4: Trennung der Lipoproteine und Proteine mittels Ultrazentrifugation

	Albumin mg	%	Apo A1 mg	%	Apo B mg	%	PC μmol	%	FPC nmol	%
Plasma Ausgangswert	45,7 ± 2,6	100 ± 6	1,20 ± 0,06	100 ± 5	0,81 ± 0,08	100 ± 10	2,91 ± 0,31	100 ± 11	1,67 ± 0,75	100 ± 45
Fraktion 1 Albumin	22,0 ± 1,0	48 ± 2	0,03 ± 0,07	3 ± 5	0 ± 0	0 ± 0	0,05 ± 0,04	2 ± 1	0,81 ± 1,3	49 ± 78
Fraktionen 2 und 3 HDL	8,1 ± 3,1	18 ± 7	0,91 ± 0,20	76 ± 16	0,06 ± 0,05	7 ± 6	1,65 ± 1,42	57 ± 49	0,27 ± 0,14	16 ± 8
Fraktionen 4 und 5 LDL	0,7 ± 0,9	2 ± 2	0,16 ± 0,10	13 ± 9	0,47 ± 0,17	58 ± 21	0,84 ± 0,15	29 ± 5	0,17 ± 0,15	10 ± 9
Fraktion 6 Chylomikronen / VLDL	1,7 ± 1,6	4 ± 4	0,03 ± 0,06	2 ± 5	0,09 ± 0,02	12 ± 2	0,18 ± 0,05	6 ± 2	0,04 ± 0,01	2 ± 1

Angegebene Zahlen sind Mittelwerte ± Standardabweichung (n=5).

### 3.2 Biologische Aktivität von FPC

Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit zu PAF war anzunehmen, dass FPC PAF-ähnliche biologische Aktivität hat. Da FPC für die Detektion chemisch derivatisiert wird, kann man seine biologische Aktivität nicht mehr mit einem Bioassay messen. Deshalb sollte durch paralleles Monitoring die biologische Aktivität und die FPC-Konzentration bestimmt werden. Dazu wurden Plasmalipide gereinigt und mit Hilfe der HPLC fraktioniert. Anschließend wurde in jeder Fraktion die biologische Aktivität gemessen. Parallel dazu wurde in jeder Fraktion nach Zugabe des Derivatisierungsreagenz die Konzentration von FPC bestimmt. Durch das parallele Monitoring erhielten wir die chromatographischen Elutionsprofile der biologischen Aktivität und des FPC, die wir miteinander vergleichen konnten.

Abbildung 9 A zeigt das HPLC-Elutionsverhalten der biologischen Aktivität. In Fraktion 5 befand sich die Hauptmenge der Substanzen mit biologischer Aktivität. Im Vergleich dazu zeigt Abbildung 9 B das HPLC-Elutionsverhalten des FPC. Auch die größte Menge an FPC befand sich in Fraktion 5. FPC und die biologische Aktivität wurden demnach in den gleichen chromatographischen Fraktionen gefunden.

Die biologische Aktivität wurde in diesem Experiment durch die Freisetzung von [ $^3\text{H}$ ] Serotonin aus Thrombozyten gemessen. Die Methode kann jedoch nicht zwischen PAF und PAF-ähnlichen Lipiden unterscheiden. Damit war in unserem Versuch noch ungeklärt, ob PAF oder PAF-ähnliche Lipide die biologische Aktivität verursachen. In einem separaten Versuch wurde deshalb Plasma mit [ $^3\text{H}$ ] PAF versetzt und das chromatographische Elutionsverhalten von [ $^3\text{H}$ ] PAF bestimmt (Abbildung 9 C). Die Hauptmenge an [ $^3\text{H}$ ] PAF wurde in Fraktion 7 eluiert. [ $^3\text{H}$ ] PAF hatte somit eine längere Retentionszeit und war deutlich

getrennt von den Fraktionen, in der sich die Hauptmenge der biologischen Aktivität und des FPC befanden. Dies zeigte, dass die biologische Aktivität des Plasmas nicht durch PAF, sondern durch PAF-ähnliche Lipide verursacht wird, die sich chromatographisch wie FPC verhalten.

### 3.3 FPC bei oxidativem Stress in biologischen Systemen

Dieses Kapitel beschäftigt sich mit der Frage, ob oxidativer Stress einen Einfluss auf die FPC-Konzentration in biologischen Systemen hat. Unter oxidativem Stress versteht man ein Ungleichgewicht zwischen Oxidantien und Antioxidantien zugunsten der Oxidantien. In den folgenden Experimenten wurde *in vivo* durch Tabakrauch und *in vitro* durch Inkubation mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  der Oxidantienanteil erhöht und oxidativer Stress ausgelöst. Im Gegensatz dazu wurde in einem weiteren Experiment versucht, durch Verringerung des Antioxidantiengehaltes (Vitamin E-Depletion), oxidativen Stress auszulösen.

#### 3.3.1 Einfluss von Tabakrauch

Fünf gesunde Probanden mussten innerhalb von 5 Minuten eine Zigarette rauchen. Vor dem Rauchen wurde die Ausgangskonzentration von FPC bestimmt. Es folgten weitere Messungen direkt nach Beendigung des Rauchens, sowie 10, 25 und 55 Minuten nach dem Rauchen. Die Anfangskonzentration im Plasma lag bei  $3,0 \pm 1,5 \mu\text{M}$ . Direkt nach Beendigung des Rauchens stieg die FPC-Konzentration statistisch signifikant um fast das Doppelte auf  $5,6 \pm 3,0 \mu\text{M}$  an. Die FPC-Konzentration blieb auch nach 10 Minuten ( $6,3 \pm 3,5 \mu\text{M}$ ) und 25 Minuten ( $6,3 \pm 3,3 \mu\text{M}$ ) signifikant erhöht. Nach 55 Minuten sank die FPC-Konzentration wieder fast auf das Anfangsniveau ab ( $3,7 \pm 2,1 \mu\text{M}$ ) (Abbildung 10). Es wurde gezeigt, dass Rauchen die FPC-Konzentration *in vivo* erhöht.

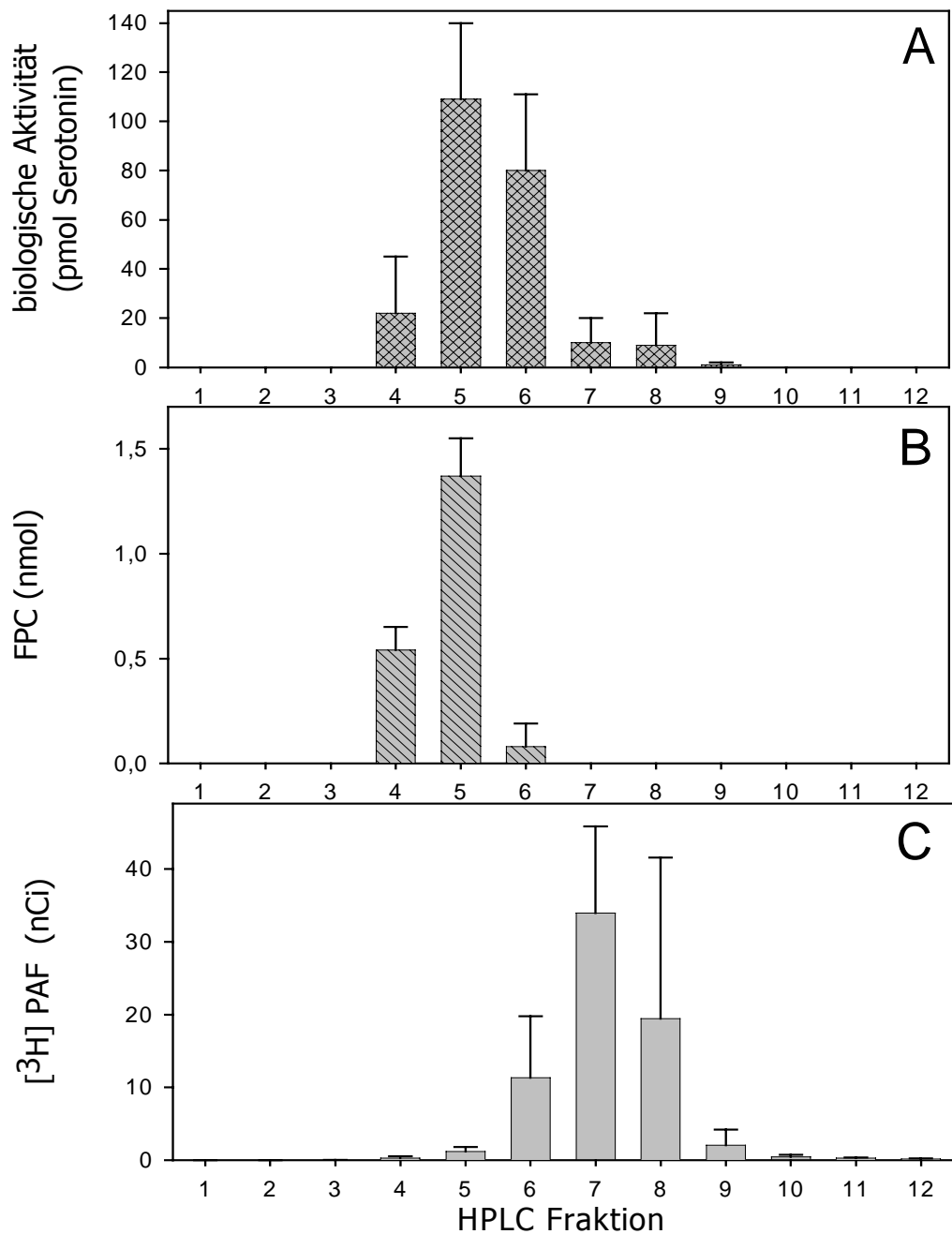


Abbildung 9: Vergleich des chromatographischen Verhaltens von thrombozytenstimulierender Bioaktivität, FPC und [<sup>3</sup>H] PAF

Lipide wurden aus Plasma extrahiert, gereinigt und mittels HPLC in 12 Fraktionen getrennt. In jeder Fraktion wurde die thrombozytenstimulierende Bioaktivität (A) und die FPC-Konzentration (B) bestimmt. In einem separaten Experiment wurde das chromatographische Verhalten von [<sup>3</sup>H] PAF untersucht (C) (n=5). Das chromatographische Verhalten von PAF unterscheidet sich signifikant von dem Verhalten von FPC und der biologischen Aktivität (p<0,05; Wilcoxon-Test; α= 5 %).

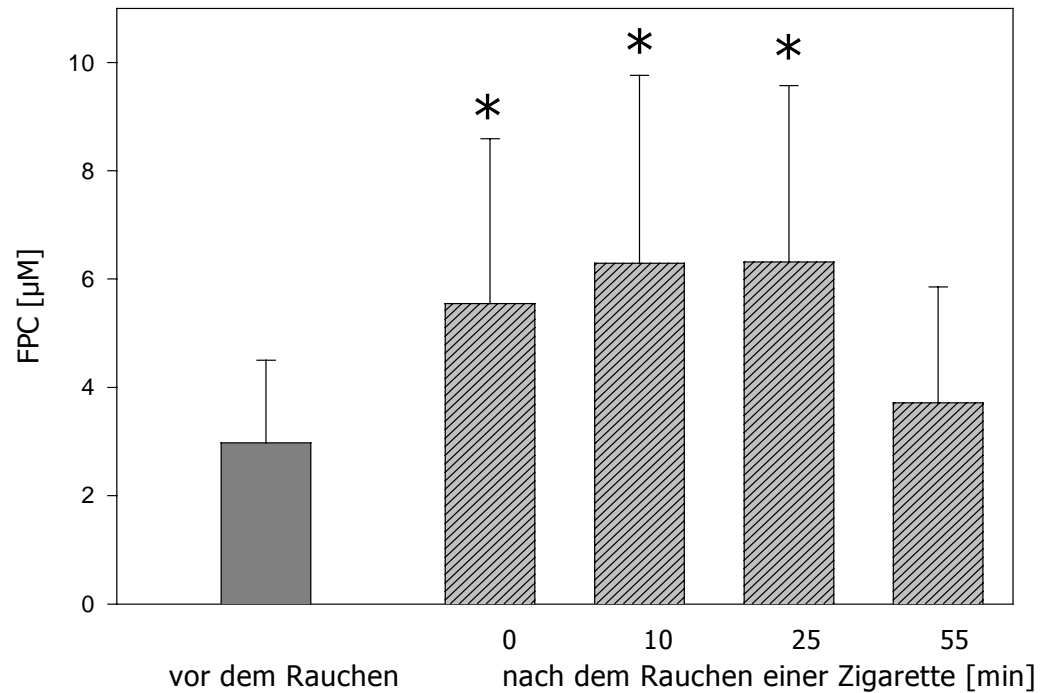


Abbildung 10: Der Einfluss von Zigarettenrauch auf die FPC-Konzentration im Plasma

Fünf gesunde Probanden mussten innerhalb von fünf Minuten eine Zigarette rauchen. Vor dem Rauchen wurde die Anfangskonzentration von FPC bestimmt. Es folgten weitere Messungen direkt nach Beendigung des Rauchens, sowie 10, 25 und 55 Minuten nach dem Rauchen (n=5). \* markiert den statistisch signifikanten Unterschied zur Anfangskonzentration von FPC ( $p < 0,05$ ; Wilcoxon-Test;  $\alpha = 5\%$ ).

### 3.3.2 Einfluss von $H_2O_2$

Frisch isolierte Typ II Zellen wurden in Suspension mit  $300\ \mu M\ H_2O_2$  für 30 Minuten inkubiert und die intrazelluläre FPC-Konzentration bestimmt.  $H_2O_2$  induzierte einen FPC-Konzentrationsanstieg um das 2-10 fache (Abbildung 11). Damit konnte demonstriert werden, dass auch Zellkulturen auf oxidativen Stress mit einem FPC-Konzentrationsanstieg reagieren.

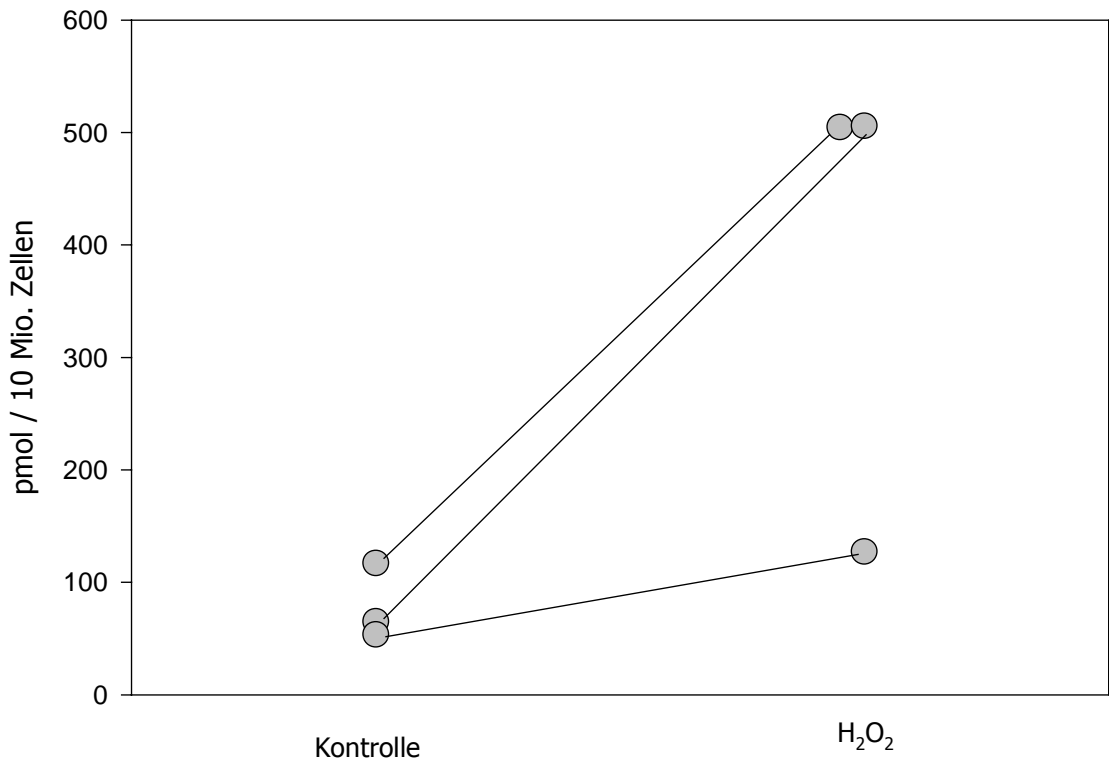


Abbildung 11: Reaktion von Typ II Zellen auf H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Die Abbildung zeigt die FPC-Konzentration in Typ II Zellen nach Inkubation mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Die FPC-Konzentration der Kontrolle wurde von einem Aliquot Typ II Zellen bestimmt, die ohne H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inkubiert wurden (n=3). Es besteht ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-behandelten Zellen und der Kontrolle (p<0,05; U-Test; α= 5 %).

### 3.3.3 Vitamin E-Mangel

Vitamin E ist das wichtigste lipophile Antioxidanz, dass als Radikalfänger Lipidperoxidation verhindern kann (Burton und Ingold, 1983; Fukuzawa et al., 1981; Halliwell, 1981; Hicks und Gebicki, 1981; Hornsby und Crivello, 1983; Slater, 1982; Tappel, 1980; Witting, 1980; Cadenas, 1995). Ziel war es, oxidativen Stress durch Verminderung der Vitamin E-Konzentration auszulösen. Neben dem Einfluss eines Vitamin E-Mangels auf die FPC-Konzentration wurde die Aktivität der FPC-abbauenden Enzyme Phospholipase A<sub>2</sub> und PAF-Acetylhydrolase bestimmt. Damit wurde überprüft, ob der Organismus mit einer Erhöhung der Aktivität der abbauende Enzyme auf eine erhöhte oxidative Be-

lastung reagiert.

Wistar Ratten wurden 5 Wochen lang mit Vitamin E-armer Nahrung gefüttert. Sie bildeten die Vitamin E-arme Gruppe. Ein Teil dieser Tiere erhielt nach 24-stündigem Fasten Vitamin E-reiches Futter für 48 Stunden. Diese Tiere wurden als Vitamin E-reiche Gruppe bezeichnet. Mit dieser Gruppe sollte überprüft werden, ob die durch Vitamin E-Depletion hervorgerufene Veränderung durch hohe Gaben an Vitamin E wieder ausgeglichen werden kann. Die Kontrolltiere erhielten normales Futter mit einem moderaten Vitamin E-Gehalt.

Die Bestimmung des Vitamin E-Gehaltes, der FPC-Konzentration, der Phospholipase A<sub>2</sub> und der PAF-Acetylhydrolase Aktivität erfolgte in folgenden Fraktionen: Plasma, Leber, Typ II Zellen und alveolärer Lavage (Tabellen 6 und 7). Vitamin E-Depletion führte im Plasma, in der Leber, in den Typ II Zellen und in der alveolären Lavage zu einer Verminderung des Vitamin E-Gehaltes auf 13 bis 27 % der Kontrolle. Die Fütterung Vitamin E-armer Tiere mit einer Vitamin E-reichen Diät erhöhte den Vitamin E-Gehalt in den untersuchten Fraktionen in unterschiedlichem Ausmaß. Der Vitamin E-Gehalt im Plasma und der Leber stieg im Vergleich zu der Vitamin E-armen Gruppe um das 10 und 100 fache. In den Typ II Zellen und der Lavage erhöhte sich die Vitamin E-Konzentration nur um das Doppelte im Vergleich zu den Vitamin E-armen Tieren.

Durch Vitamin E-Depletion stieg im Vergleich zur Kontrolle die FPC-Konzentration im Plasma, der Leber und der alveolären Lavage. Die Aktivität der Phospholipase A<sub>2</sub> erhöhte sich im Plasma. In der Leber, den Typ II Zellen und der alveolären Lavage verminderte sich die Phospholipase A<sub>2</sub>-Aktivität. Die PAF-Acetylhydrolase-Aktivität der Vitamin E-armen Gruppe war in der Leber und den Typ II Zellen reduziert und in der Lavage erhöht.

Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse, dass Vitamin E-Depletion über 5 Wochen den Vitamin E-Gehalt in allen untersuchten Fraktionen gegenüber der Kontrolle senkt. Die Gabe von hohen Dosen Vitamin E erhöhte den Vitamin E-Gehalt wieder, wobei in Abhängigkeit von der untersuchten Fraktion die Kontrollwerte deutlich überschritten oder nur annähernd erreicht wurden. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Vitamin E-Mangel eine Erhöhung der FPC-Konzentration im Plasma, der Leber und der alveolären Lavage bewirkte. Gleichzeitig veränderte sich in unterschiedlichem Ausmaß die Aktivität der Phospholipase A<sub>2</sub> und der PAF-Acetylhydrolase.

### **3.4 FPC unter klinischen Bedingungen**

#### **3.4.1 Herzchirurgische Operation**

Es sollte untersucht werden, wie sich die FPC-Konzentration im Verlauf einer Herzoperation mit Herz-Lungen-Maschine verhält. Die Herz-Lungen-Maschine ermöglicht durch Errichtung eines extrakorporalen Kreislaufes einen chirurgischen Eingriff am offenen und blutleeren Herzen. Wird der Patient wieder von der Herz-Lungen-Maschine getrennt, kommt es zu einer Reperfusion des Herzens und der Lunge. Dies führt zur PMN-Aktivierung und dadurch zu einer vermehrten Bildung freier Radikale in der Reperfusionsphase (Rashid et al., 1991; Tortolani et al., 1993). Da freie Radikale Oxidationsmittel sind, bedeutet die Reperfusionsphase oxidativen Stress für den Patienten.

Vier herzchirurgischen Patienten wurde zu sechs Zeitpunkten Blut entnommen, um die Konzentration von FPC im Plasma zu bestimmen. Gleichzeitig wurden zu diesen Zeitpunkten die PMNs und die Thrombozyten gemessen.

Tabelle 6: Der Einfluss von Vitamin E auf FPC

Vitamin E

	Plasma			Leber			Typ II Zellen			Lavage		
	µg / ml	%	n	µg / mg Protein	%	n	µg / Mio.	%	n	ng / mg Protein	%	n
Kontrolle	8,4 ± 1,4	100 ± 17	3	4,60 ± 0,80	100 ± 17	3	0,056 ± 0,003	100 ± 5	2	1,037 ± 0,463	100 ± 45	3
Vitamin E-arm	1,5 ± 0,4°	18 ± 5	4	1,25 ± 0,20°	27 ± 4	4	0,015 ± 0,007°	27 ± 13	2	0,135 ± 0,050°	13 ± 5	4
Vitamin E-reich	15,1 ± 2,3°	180 ± 27	4	130,1 ± 25,6°	2826±557	4	0,028 ± 0,004°	50 ± 7	3	0,628 ± 0,021	61 ± 2	4

FPC

	Plasma*			Leber*			Typ II Zellen			Lavage*		
	pmol / ml	%	n	pmol / mg Protein	%	n	pmol / Mio.	%	n	pmol / ng Protein	%	n
Kontrolle	408 ± 150	100 ± 37	6	329 ± 228	100 ± 69	3	8,8 ± 0,7	100 ± 8	3	48,6 ± 18,0	100 ± 37	3
Vitamin E-arm	1363 ± 487°	334 ± 120	7	895 ± 53,5°	272 ± 16	4	8,5 ± 0	97 ± 0	3	123 ± 91,2	253 ± 188	3
Vitamin E-reich	734 ± 278°	180 ± 68	7	1120 ± 262°	340 ± 80	4	8,7 ± 1,0	99 ± 11	3	53,3 ± 9,3	110 ± 19	3

Die Tabelle zeigt die Mittelwerte ± Standardabweichung. Die Werte der Kontrollgruppe sind gleich 100 % gesetzt. \* markiert den statistisch signifikanten Einfluss des Vitamin E-Gehaltes auf die gemessenen Parameter (Kruskal-Wallis-Test mit  $p < 0,05$ ;  $\alpha = 5\%$ ). ° markiert den statistisch signifikanten Unterschied zur Kontrolle ( $p < 0,05$ ; U-Test;  $\alpha = 5\%$ ).

Tabelle 7: Der Einfluss von Vitamin E auf die Phospholipase A<sub>2</sub> und die PAF-Acetylhydrolase

Phospholipase A<sub>2</sub>

	Plasma*			Leber*			Typ II Zellen*			Lavage*		
	pmol / h ml	%	n	pmol / h µg Protein	%	n	pmol / h Mio.	%	n	pmol / h µg Protein	%	n
Kontrolle	1728 ± 209	100 ± 12	3	591 ± 62	100 ± 11	3	12,3 ± 0,9	100 ± 7	2	8,5 ± 5,0	100 ± 59	3
Vitamin-E-arm	3587 ± 1289°	207 ± 36	4	475 ± 61	80 ± 11	4	10,5 ± 1,7°	78 ± 14	4	7,9 ± 5,5	93 ± 64	4
Vitamin-E-reich	3096 ± 119°	179 ± 4	4	541 ± 161	92 ± 27	4	13,0 ± 0,6	105 ± 5	4	6,2 ± 2,5	72 ± 30	4

PAF-Acetylhydrolase

	Plasma*			Leber*			Typ II Zellen*			Lavage*		
	nmol/ min ml	%	n	pmol / min mg Protein	%	n	pmol / min Mio.	%	n	pmol / min µg Protein	%	n
Kontrolle	32,4 ± 3,3	100 ± 10	3	6,2 ± 0,9	100 ± 14	3	51 ± 5,1	100 ± 10	3	4,5 ± 1,4	100 ± 35	3
Vitamin-E-arm	33,4 ± 1,6	103 ± 5	4	5,6 ± 1,9	91 ± 31	3	48,1 ± 1,3	94 ± 3	4	4,7 ± 1,3	106 ± 29	4
Vitamin-E-reich	32,8 ± 1,2	101 ± 4	4	9,6 ± 1,1°	156 ± 18	3	52,8 ± 5,1	104 ± 10	4	3,4 ± 0,5	76 ± 12	4

Die Tabelle zeigt die Mittelwerte ± Standardabweichung. Die Werte der Kontrollgruppe sind gleich 100 % gesetzt. \* markiert den statistisch signifikanten Einfluss des Vitamin E-Gehaltes auf die gemessenen Parameter (Kruskal-Wallis-Test mit  $p < 0,05$ ;  $\alpha = 5\%$ ). ° markiert den statistisch signifikanten Unterschied zur Kontrolle ( $p < 0,05$ ; U-Test;  $\alpha = 5\%$ ).

Nach der Heparinisierung und nach Anschluss an die Herz-Lungen-Maschine verminderte sich die FPC-Konzentration in geringem Maße, stieg jedoch in der Reperfusionphase signifikant an. Die PMNs reagierten ebenfalls mit einem signifikanten Anstieg auf die Reperfusion und blieben bis zu drei Stunden nach der Operation erhöht. Die Thrombozytenzahl nahm kontinuierlich ab. Erst drei Stunden nach der Operation stieg die Thrombozytenzahl wieder an. Der Hämatokrit erreichte einen signifikanten Abfall nach Anschluss an die Herz-Lungen-Maschine, nahm dann wieder stetig zu bis fast auf das Ausgangsniveau (Abbildung 12). In diesem Experiment konnten wir zeigen, dass die FPC-Konzentration während der Aktivierung der PMNs in der Reperfusionphase signifikant ansteigt.

#### 3.4.2 Intensivpatienten

Es wurden Intensivpatienten mit der Fragestellung untersucht, ob ein Zusammenhang zwischen der Konzentration von FPC-ähnlichen Lipidperoxidationsprodukten und dem Schweregrad inflammatorischer Erkrankungen besteht. Intensivpatienten leiden nach einer Herzoperation oftmals unter charakteristischen Reaktionen. Zu diesen Reaktionen gehören Symptome wie das Systemische Inflammatorische Reaktionssyndrom (SIRS), Thrombozytopenie (TP) und das Krankheitsbild des Multiorganversagens (MOV).

Die Patienten wurden in 3 Untersuchungs- und eine Kontrollgruppe unterteilt (Abbildung 13). Wie erwartet waren die Patienten der Untersuchungsgruppen in einem schlechteren Gesundheitszustand als die Kontrollgruppe (Tabelle 8). Dies zeigte sich an einem signifikant höheren APACHE II Score und einem signifikant höheren Acute Physiology Score (APS). In Tabelle 9 wurden die Patienten, die gleichzeitig an SIRS und Thrombozytopenie litten, weiter unterteilt in eine Untergruppen mit und eine ohne Multiorganversagen (Abbildung 13).

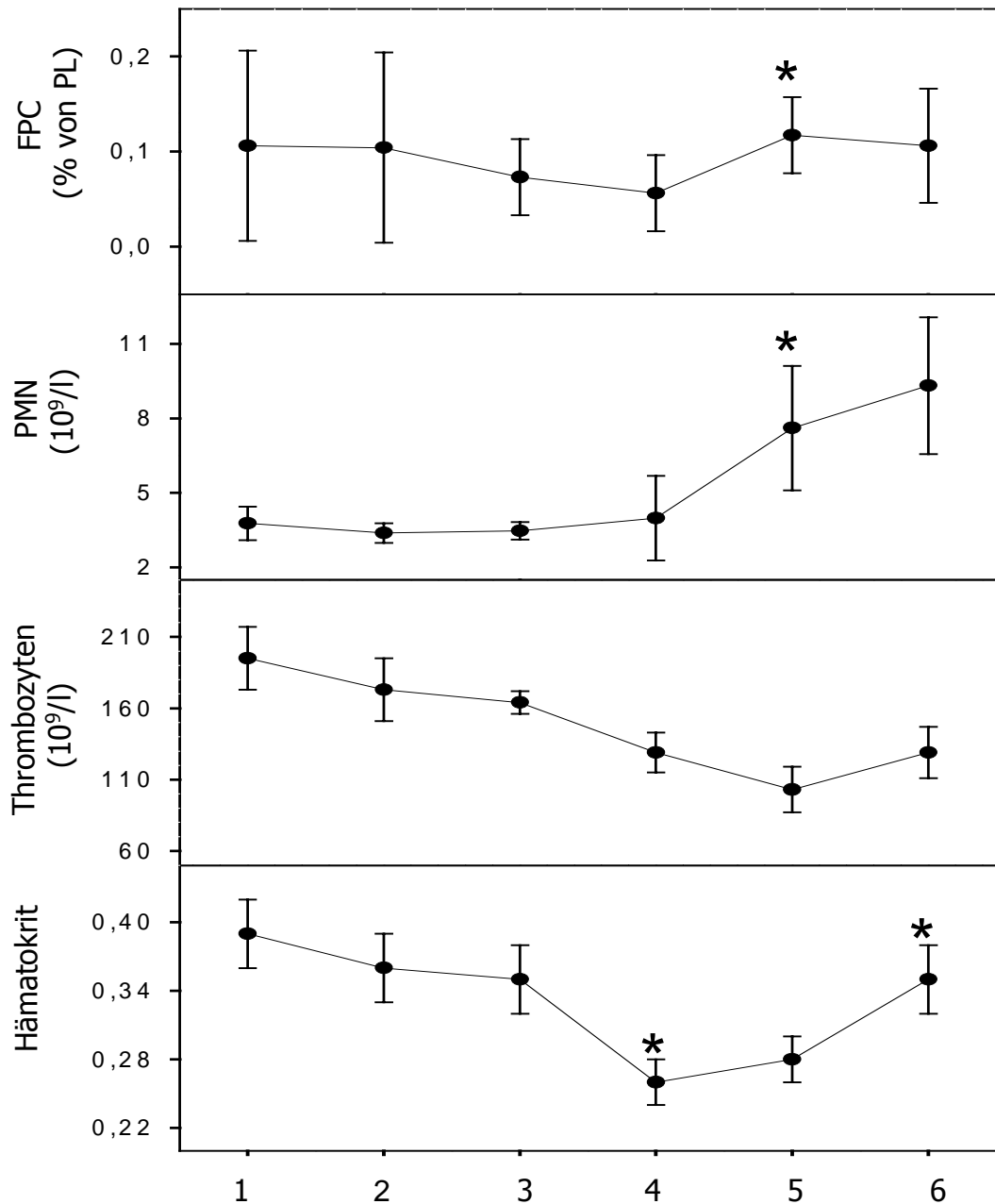


Abbildung 12: Verlauf einer Herzoperation

Vier herzchirurgischen Patienten wurde (1) vor und (2) nach Narkoseeinleitung, (3) fünf Minuten nach Verabreichung des Antikoagulanz Heparin (400 U/kg Körpergewicht), (4) 25 Minuten nach Anschluss an die Herz-Lungen-Maschine, (5) 10 Minuten nach Trennung von der Herz-Lungen-Maschine und (6) drei Stunden nach der Operation Blut abgenommen und die FPCs, PMNs und Thrombozyten bestimmt (n=5). Um die Plasmaverdünnung während der Operation zu berücksichtigen, wurde der Hämatokrit bestimmt. \* markiert den statistisch signifikanten Unterschied zur Anfangskonzentration ( $p < 0,05$ ; Wilcoxon-Test;  $\alpha = 5\%$ ). Gezeigt werden Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung.

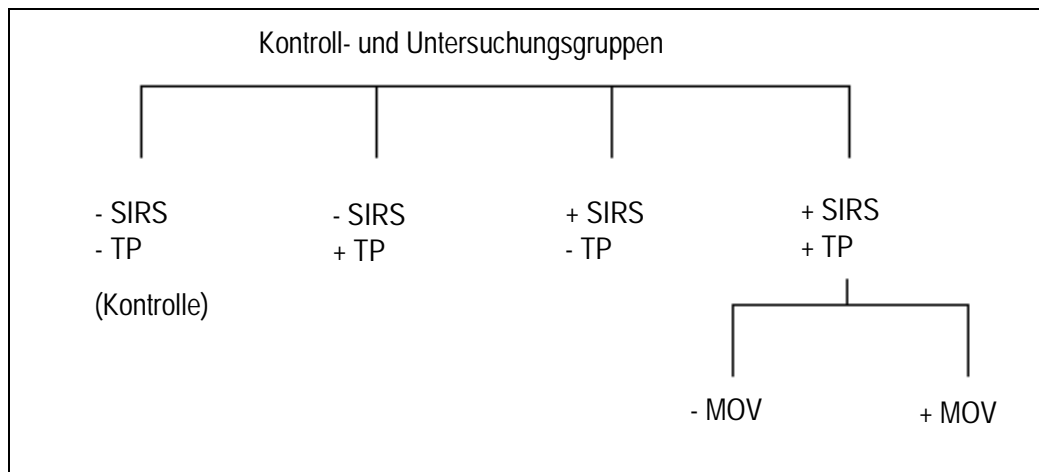


Abbildung 13: Einteilung des Patientenguts

Bei dem Kollektiv handelt es sich um Patienten nach einem Eingriff am offenen Herzen. Die Patienten wurden in drei Untersuchungsgruppen und eine Kontrollgruppe eingeteilt. In den Untersuchungsgruppen hatten die Patienten TP, SIRS oder gleichzeitig TP und SIRS. Die Patienten, die gleichzeitig unter SIRS und TP litten, wurden weiter unterteilt in eine Untergruppe mit und ohne Multiorganversagen. In die Kontrollgruppe wurden Patienten eingeschlossen, die nach kurzer Beobachtungsphase ohne Komplikationen auf eine Normalstation verlegt werden konnten.

In allen Patientenproben wurden die FPC-ähnlichen Lipidperoxidationsprodukte FPC, LOOH und PAF Aktivität gemessen. SIRS oder Thrombozytopenie hatten keinen signifikanten Einfluss auf die gemessenen Parameter. Auch Multiorganversagen korrelierte nicht mit den FPC-ähnlichen Lipidperoxidationsprodukten. Lediglich die PAF Aktivität schien in der Gruppe mit Multiorganversagen erhöht zu sein im Vergleich zu den Patienten ohne Multiorganversagen (42 pmol/l vs. 1 pmol/l, ungepaarter t-Test;  $p=0.095$ ).

Als Marker für die oxidative Belastung der Lipide im Organismus wurde der Vitamin  $E_{\text{chinon}}$ / E Quotient bestimmt. Dabei handelt es sich um das Verhältnis zwischen dem Oxidationsprodukt von Vitamin E ( $\alpha$ -Tocochinon) zu Vitamin E. Der Vitamin  $E_{\text{chinon}}$ / E Quotient war in den Untersuchungsgruppen erhöht und die Vitamin E-Konzentration reduziert. In den Patienten mit Multiorganversagen war die Vitamin E-Konzentration signifikant verringert im Vergleich zu Patienten ohne Multiorganversagen. Gleichzeitig war der Vitamin  $E_{\text{chinon}}$ / E Quotient

erhöht, jedoch ohne statistische Signifikanz (Tabelle 9).

In Patienten mit SIRS waren die PMNs und die Monozyten signifikant vermehrt, nicht jedoch die Lymphozyten. Die Thrombozytenzahl bei Patienten mit Thrombozytopenie war, wie erwartet, signifikant erniedrigt. Patienten mit Multiorganversagen hatten ebenfalls eine signifikant erniedrigte Thrombozytenzahl und eine signifikant geringere Fibrinogenkonzentration im Vergleich zu Patienten ohne Multiorganversagen. Der Laktat Spiegel war signifikant erhöht in den Patienten mit Multiorganversagen. Eine erniedrigte Fibrinogenkonzentration und ein erhöhter Laktat Spiegel sind typische Begleitsymptome bei Multiorganversagen.

Die Phospholipase A<sub>2</sub> zeigte eine erhöhte Aktivität bei Patienten mit SIRS, zeigte jedoch keine weitere Zunahme bei Multiorganversagen. Die Aktivität der PAF-Acetylhydrolase war in der Untersuchungs- und Kontrollgruppe gleich.

Der Marker für oxidative Belastung (Vitamin E<sub>chinon</sub>/E Quotient) der Patienten mit Multiorganversagen war signifikant erhöht im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abbildung 14). Gleichzeitig war die Vitamin E-Konzentration signifikant reduziert in der Patientengruppe mit Multiorganversagen. Das bedeutete, dass der Organismus im Multiorganversagen einer erhöhten oxidativen Belastung ausgesetzt ist, die jedoch keine Anreicherung von FPC-ähnlichen Lipidperoxidationsprodukten im Plasma wie FPC, LOOH oder PAF Aktivität zur Folge hat.

Tabelle 8: Zusammenhang zwischen gemessenen Parametern und SIRS oder TP

Parameter	Kontrolle n=19	TP n=10	SIRS n=5	TP+SIRS n=21	doppelte Varianzanalyse	
					<i>p</i> for TP	<i>p</i> for SIRS
Acute physiology score	1,6±2,6	4,7±3,4	4,4±1,8	8,0±4,1	<0,003	<0,006
APACHE II score	5,4±2,6	9,0±3,8	10,2±2,2	12,9±4,6	<0,02	<0,001
Hämatokrit (%)	35±4,4	33±3,2	33±2,2	34±4,6	n. s.	n. s.
Thrombozyten (10 <sup>9</sup> /l)	235±52	85±25	260±103	65±32	<0,001	n. s.
WBK (10 <sup>9</sup> /l)	10,9±3,5	13,1±5,7	18,4±4,9	15,4±5,0	n. s.	<0,005
PMN (10 <sup>9</sup> /l)	7,9±2,2	9,4±4,1	13,7±3,4	12,7±5,5	n. s.	<0,001
Monozyten (10 <sup>8</sup> /l)	7,2±2,2	7,1±2,5	9,3±3,1	9,2±4,1	n. s.	<0,05
Lymphozyten (10 <sup>9</sup> /l)	1,3±0,4	1,2±0,6	1,2±0,9	0,9±0,5	n. s.	n. s.
Vitamin E(μmol/L)	27,6±5,7	24,2±7,3	26,4±5,8	23,9±7,8	n. s.	n. s.
Vitamin E <sub>chinon</sub> /E (10 <sup>-3</sup> )	14±52	43±79	28±57	59±115	n. s.	n. s.
LOOH (μmol/l)	3,6±3,9	6,0±6,3	7,2±4,2 <sup>a</sup>	3,2±3,7 <sup>a</sup>	n. s.	n. s.
FPC (μmol/l)	1,5±1,3	0,7±0,6	0,7±0,4	1,8±2,3	n. s.	n. s.
PAF (pmol/l)	20±35	17±19	7±9	26±55	n. s.	n. s.
Phospholipase A <sub>2</sub> (pmol/h/ml)	168±100	274±294	412±114 <sup>b</sup>	272±170 <sup>b</sup>	n. s.	<0,04
PAF-Acetylhydrolase (nmol/min/ml)	12,2±2,6	12,7±3,5	11,7±3,6	11,3±3,2	n. s.	n. s.

Die gezeigten Daten sind Mittelwerte ± Standardabweichungen. <sup>a</sup>LOOH sind signifikant höher in der Gruppe mit SIRS verglichen zu SIRS+TP (*p*<0.03). <sup>b</sup>Phospholipase A<sub>2</sub> ist signifikant höher in der Gruppe mit SIRS verglichen zu SIRS+TP (*p*<0.04). Die statistische Signifikanz wurde durch die doppelte Varianzanalyse errechnet (*p*<0,05; α=5 %).

Tabelle 9: Vergleich der Patienten mit und ohne Multiorganversagen aus der TP+SIRS Gruppe

Parameter	Ohne MOV n=9	MOV n=12	t-Test p
Acute physiology score	6,1±3,3	9,3±4,2	n. s.
APACHE II score	10,9±3,9	14,4±4,8	n. s.
Hämatokrit (%)	35±3	33±3,5	n. s.
Thrombozyten (10 <sup>9</sup> /l)	89±24	48±28	<0,003
WBK (10 <sup>9</sup> /l)	11,8±4,2	18,1±3,8	<0,003
PMN (10 <sup>9</sup> /l)	9,3±3,3	15,8±4,8	<0,003
Monozyten (10 <sup>9</sup> /l)	0,69±0,24	1,12±0,45	<0,02
Lymphozyten (10 <sup>9</sup> /l)	0,8±0,3	1,0±0,7	n. s.
Laktat (mmol/l)	0,9±0,3	1,7±1,4	<0,05
Fibrinogen (g/l)	5,2±1,5	3,5±1,4	<0,03
Vitamin E (µmol/l)	28,1±6,9	20,8±7,3	<0,04
Vitamin E <sub>chinon</sub> /E (10 <sup>-3</sup> )	7±9	97±142	n. s.
LOOH (µmol/l)	4,0±3,9	2,5±3,5	n. s.
FPC (µmol/l)	1,4±1,5	2,2±10,7	n. s.
PAF (pmol/l)	1±3	42±59	n. s.
Phospholipase A <sub>2</sub> (pmol/h/l)	284±171	263±180	n. s.
PAF-Acetylhydrolase (nmol/min/ml)	12,0±3,3	10,9±3,5	n. s.

Gezeigt werden die Mittelwerte ± Standardabweichungen. Die statistische Signifikanz wurde durch den t-Test für unverbundene Stichproben errechnet (p<0,05; α= 5%).

Mit den gemessenen Daten der roten und weißen Blutkörperchen, den FPC-ähnlichen Lipidperoxidationsprodukten, dem Marker für oxidative Belastung und den Enzymaktivitäten wurde die Pearson Korrelationsanalyse durchgeführt. Diese zeigte, dass FPC negativ mit der Phospholipase A<sub>2</sub> korreliert. Weiterhin konnte festgestellt werden, dass eine positive Korrelation zwischen den LOOHs und den weißen Blutkörperchen, sowie eine negative Korrelation zwischen den Thrombozyten und dem Vitamin E<sub>chinon</sub>/ E Quotient bestand. Alle anderen Parameter zeigten keine Korrelation (Tabelle 10).

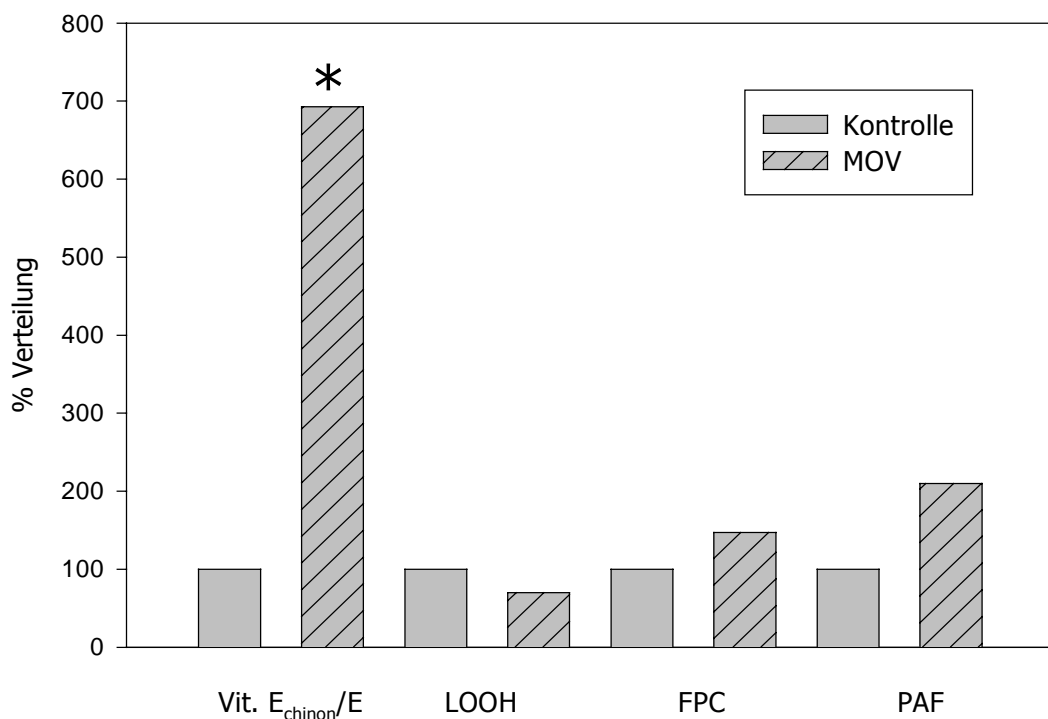


Abbildung 14: Vergleich der Patienten im Multiorganversagen mit der Kontrollgruppe

Die gemessenen Lipidparameter der Patientengruppe mit Multiorganversagen und der Kontrollgruppe wurden verglichen. Die Werte der Kontrollgruppe wurden gleich 100 % gesetzt. In der Patientengruppe mit Multiorganversagen befanden sich 12, in der Kontrollgruppe 19 Patienten. \* markiert den signifikanten Unterschied der Kontrolle zu Patienten mit MOV ( $p < 0,05$ ; gepaarter t-Test;  $\alpha = 5\%$ ).

Die negative Korrelation zwischen FPC und der Phospholipase A<sub>2</sub> deutete auf eine Beteiligung der Phospholipase A<sub>2</sub> bei dem Abbau oxidierter Lipide hin. Um diese Vermutung zu überprüfen, untersuchten wir im Plasma in einem weiteren Experiment den Einfluss der Phospholipase A<sub>2</sub> auf FPC. Da Phospholipase A<sub>2</sub> durch Applikation hoher Heparindosen induziert werden kann, nutzten wir dies in einem klinischen Modell. Im Plasma von elf kardiochirurgischen Patienten wurde die FPC-Konzentration und die Phospholipase A<sub>2</sub> Aktivität vor und nach Heparinisierung bestimmt. Direkt nach Verabreichung von Heparin (500 U/ kg) erhöhte sich die Aktivität der Phospholipase A<sub>2</sub> von  $41 \pm 29$  pmol/h ml auf  $267 \pm 249$  pmol/h ml ( $p=0,012$ ). Gleichzeitig fiel die FPC-Konzentration signifikant um 30 % ab. Des weiteren wurde die PAF-Acetylhydrolase bestimmt, da auch sie FPC und PAF-ähnliche Lipide abbauen kann. Die PAF-Acetylhydrolase zeigte jedoch keine Veränderung nach Heparin-gabe (Abbildung 15).

Tabelle 10: Pearson Korrelation

Parameter	Pearson Korrelation	
	r	p
Thrombozyten vs. LOOH	0,098	n. s.
Thrombozyten vs. FPC	0,106	n. s.
Thrombozyten vs. PAF	- 0,089	n. s.
Thrombozyten vs. Vitamin E <sub>chinon</sub> / E	- 0,298	< 0,04
Thrombozyten vs. Phospholipase A <sub>2</sub>	- 0,142	n. s.
Leukozyten vs. LOOH	0,421	< 0,02
Leukozyten vs. FPC	- 0,155	n. s.
Leukozyten vs. PAF	0,102	n. s.
Leukozyten vs. Vitamin E <sub>chinon</sub> / E	- 0,027	n. s.
Leukozyten vs. Phospholipase A <sub>2</sub>	0,202	n. s.
Vitamin E <sub>chinon</sub> / E vs. LOOH	- 0,267	n. s.
Vitamin E <sub>chinon</sub> / E vs. FPC	0,118	n. s.
Vitamin E <sub>chinon</sub> / E vs. PAF	- 0,189	n. s.
LOOH vs. FPC	- 0,163	n. s.
FPC vs. PAF	0,201	n. s.
PAF vs. LOOH	- 0,094	n. s.
Phospholipase A <sub>2</sub> vs. FPC	- 0,380	< 0,04
Phospholipase A <sub>2</sub> vs. PAF	- 0,198	n. s.

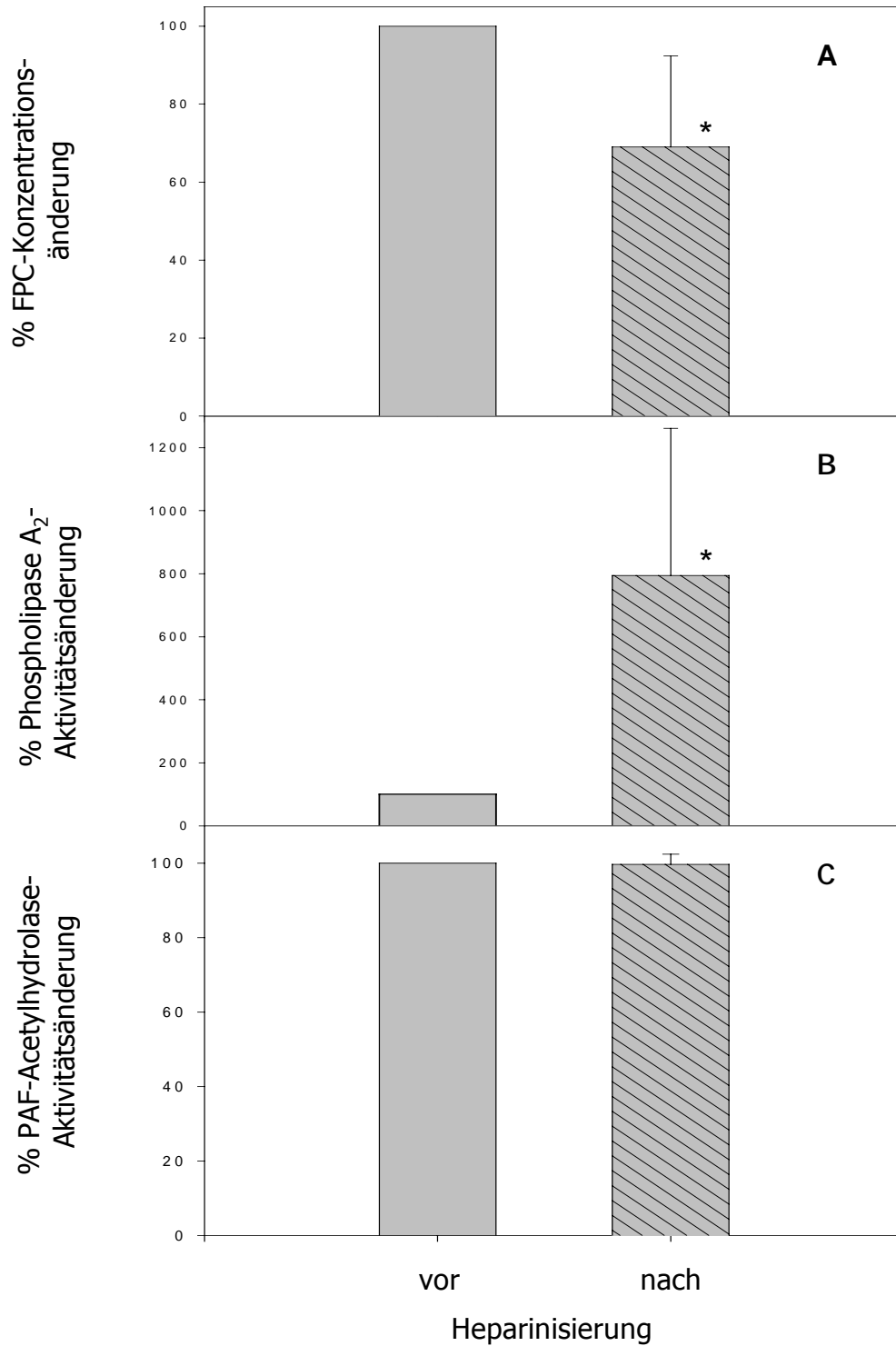


Abbildung 15: Einfluss der Phospholipase A<sub>2</sub> Induktion durch Heparin

Die Abbildung zeigt die prozentuale Veränderung der FPC-Konzentration (A), der Phospholipase A<sub>2</sub> (B) und PAF-Acetylhydrolase Aktivität (C) vor und nach Heparinisierung von kardiochirurgischen Patienten (n=11). Die Werte vor Heparinisierung wurden jeweils gleich 100 % gesetzt. \* markiert die statistische Signifikanz zum Ausgangswert ( $p < 0,02$ ; gepaarter t-Test;  $\alpha = 5\%$ ). Die gezeigten Zahlen sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen.

## 4 DISKUSSION

### 4.1 Mögliche Lokalisationsorte von FPC im Plasma

Plasma besteht unter anderem aus Lipoproteinen, wasserlöslichen Proteinen und einer wässrigen Phase. Lipoproteine fungieren durch ihre Lipid-komplexierenden Eigenschaften als Transportform für die im Blut unlöslichen Lipide wie Cholesterol, Cholesterolester, Triglyceride und Phospholipide. Albumin besitzt ebenfalls hydrophobe Bindungsmöglichkeiten, so dass sowohl Albumin als auch Lipoproteine als Transportform für FPC in Frage kommen.

Die Verteilungsanalyse durch Differentialpräzipitation nach Burstein et al. (1973) zeigte, dass FPC von LDL und HDL transportiert wird (Tabelle 3). Übereinstimmend mit diesem Ergebnis isolierten und identifizierten Watson et al. (1999) zwei PAF-ähnliche Lipide aus oxidiertem LDL. Das oxidierte LDL wurde dabei aus der Aortenwand eines Kaninchens isoliert, das cholesterolreiches Futter erhielt (Watson et al., 1997). Bereits 1991 konnte Imaizumi (1991) zeigen, dass PAF-ähnliche Lipide in LDL und HDL von Rauchern existieren. Die Struktur der PAF-ähnlichen Lipide wurde allerdings nicht aufgeklärt. Als unabhängige Methode zur Untersuchung der FPC-Lokalisation wurde die Plasmafraktionierung mittels Dichtegradienten-ultrazentrifugation durchgeführt. Diese Methode zeigte, dass FPC neben der HDL- und LDL-Fraktion auch in der Albumin-Fraktion lokalisiert ist (Tabelle 4).

Mit diesen Ergebnissen konnte gezeigt werden, dass FPC von Lipoproteinen transportiert wird. Ob Albumin ebenfalls FPC transportiert muss offengelassen werden. Dies müsste zum Beispiel mittels FPLC nochmals überprüft werden. Die Annahme, dass auch Albumin als Transportform für FPC in Frage kommt, wird

durch Untersuchungen des strukturverwandten PAF unterstützt. Dabei demonstrierten Stafforini et al. (1987), dass exogenes PAF nach Zugabe zu Plasma nicht in Lipoproteine inkorporiert, sondern an Albumin gebunden vorliegt. Außerdem wird PAF nach der Sekretion aus Zellen an Albumin gebunden (Zimmermann et al., 1992; Kulikokov und Bergel'son, 1984; Bratton et al., 1991).

#### 4.2 FPC und biologische Aktivität

Oxidativ modifizierte Phospholipide scheinen an der Pathogenese verschiedener Erkrankungen, wie z. B. der Arteriosklerose beteiligt zu sein (Esterbauer et al., 1992; Steinberg, 1997). Diese Verbindungen haben PAF-ähnliche Struktur und besitzen biologische Aktivität (Tokumura et al., 1995). Es wurde von verschiedenen Gruppen gezeigt, dass PAF-ähnliche Lipide eine Plättchenaggregation auslösen (Tanaka et al., 1994), Neutrophile aktivieren (Patel et al., 1992), die Proliferation der vaskulären glatten Muskelzellen stimulieren (Heery et al., 1995), das Anhaften der Monozyten an vaskuläre Endothelzellen induzieren (Watson et al., 1997) und die Produktion von Stickstoffmonoxid blockieren (Tokumura et al., 2000). Es konnte eine erhöhte biologische Aktivität von PAF-ähnlichen Lipiden in der cerebrospinalen Flüssigkeit von Kindern mit Meningitis (Arditi et al., 1990), in der Pleuraflüssigkeit von Patienten mit Lungenentzündung (Oda et al., 1991), und in verschiedenen Syndromen wie Ischämie-Reperfusion (Kubes et al., 1990), Schlaganfall (Hirashima et al., 1994; Satoh et al., 1992) und akuten Asthmaanfällen (Hsieh und Ng, 1993) gemessen werden. PAF ist an der Pathogenese von Glomerulonephritis (Bustos et al., 1996) beteiligt. Da allerdings bei dieser Gruppe die biologische Aktivität von PAF durch den Plättchenaggregationstest gemessen wurde, kann bei diesem Ergebnis nicht ausgeschlossen werden, dass die PAF-ähnlichen Lipide die biologische Aktivität bewirkten. Tanaka et al. (1994) und Kern et al. (1998) konnten zeigen, dass synthetische PAF-ähnliche Lipide mit bekannter Struktur biologisch aktiv sind.

Damit stellte sich die Frage, ob das im Plasma identifizierte FPC auch biologische Aktivität besitzt.

Wie bereits in Kapitel 3.2 beschrieben, konnte die biologische Aktivität des FPC nicht direkt bestimmt werden, da es bei der Detektion chemisch derivatisiert wird. Deshalb wurden Plasmalipide extrahiert, durch HPLC fraktioniert und in allen Fraktionen parallel die biologische Aktivität und die FPC-Konzentration bestimmt. Dabei zeigte sich, dass FPC und die biologische Aktivität in den gleichen HPLC-Fraktionen gefunden wurde. Daraus schließen wir, dass FPC biologische Aktivität zeigt. PAF wurde dagegen deutlich getrennt von FPC und der biologischen Aktivität eluiert.

Die biologische Aktivität kann mittels verschiedener Methoden untersucht werden. Zu der am meisten verwendeten Methode gehört der Plättchenaggregationstest (Hanahan und Weintraub, 1985). Dieser Test basiert auf der Interaktion von PAF mit Plättchen und die daraus resultierende Plättchenaggregation. Die Methode ist nicht quantitativ und aufgrund der Thrombozyten schwierig zu standardisieren (Baldo et al., 1991). Ebenso fehlt der Methode die Spezifität, so dass eine Unterscheidung zwischen PAF und PAF-ähnlichen Lipiden nicht möglich ist. Massenspektrometrische Untersuchungen sind dagegen spezifisch und sensitiv, jedoch relativ zeit- und kostenintensiv, so dass diese Methoden nur selten angewandt werden. Eine weitere Methode ist der spezifische Radioimmunassay für PAF, dessen Sensitivität im Bereich von 0,02-2 pmol liegt (Baldo et al., 1991). Auch diese Methode kann nicht zwischen PAF und PAF-ähnlichen Lipiden unterscheiden, so dass sich lange die Annahme halten konnte, dass PAF die biologische Aktivität bewirkt.

Wir bestimmten die biologische Aktivität durch die Freisetzung von Serotonin aus Thrombozyten. Dieser Bioassay kann ebenfalls nicht zwischen PAF und PAF-ähnlichen Lipiden unterscheiden. Deshalb wurde in einem separaten Versuch

das Elutionsverhalten von [<sup>3</sup>H] PAF untersucht. [<sup>3</sup>H] PAF wurde dabei deutlich getrennt von den biologisch aktiven Plasmafraktionen eluiert, so dass deren biologische Aktivität nicht durch PAF, sondern durch PAF-ähnliche Lipide, wie FPC, erklärt werden muss.

Lehr et al. (1997) induzierten in Hamstern durch Rauchexposition die Bildung von biologisch aktiven Lipiden und konnten zeigen, dass sich diese biologische Aktivität chromatographisch von PAF trennen lässt. Genau wie in unserem Experiment wurden die biologisch aktiven Lipide vor PAF von einer RP-Säule eluiert, d.h. die biologische Aktivität wurde von Lipiden verursacht, die noch polarer waren als PAF. Lehr et al. (1997) bestimmten die biologische Aktivität durch die Adhäsion aktivierter PMNs auf Endothelzellen, sowie durch Aggregation von Thrombozyten und Monozyten.

Durch Ergebnisse von Lehr et al. (1997) und eigenen Daten konnte mit verschiedenen Methoden nachgewiesen werden, dass die im Plasma zirkulierende biologische Aktivität in erster Linie durch PAF-ähnliche Lipide (Lipidperoxidation) und nicht durch PAF bewirkt wird. Bei allen Experimenten konnte durch Einsatz von PAF-Antagonisten die biologische Aktivität gehemmt werden. Damit konnte gezeigt werden, dass die biologische Aktivität durch den PAF-Rezeptor ausgelöst wurde. Es kann aber nicht eindeutig geklärt werden, ob nur PAF die biologische Aktivität bewirkt, da auch die PAF-ähnlichen Lipide über den PAF-Rezeptor biologische Aktivität bewirken. Die Struktur der PAF-ähnlichen Lipide wurde allerdings bei Lehr et al. (1997) nicht identifiziert. Die Strukturaufklärung von FPC zeigte, dass es einen Palmitoylrest in *sn*-1 Position und eine kurze C<sub>3</sub> oder C<sub>4</sub> Kette in *sn*-2 Position hat (Frey et al., 2000).

Es stellte sich die Frage, welche strukturellen Voraussetzungen FPC erfüllen müsste, um biologisch aktiv zu sein. Kern et al. (1998) und Tanaka et al. (1994) synthetisierten PAF-ähnliche Lipide, die in *sn*-1 Position einen Palmitoyl- oder

Hexadecylrest, und in *sn*-2 Position einen Propionyl- (C<sub>3</sub>), Succinyl- (C<sub>4</sub>), Valeroyl- (C<sub>5</sub>), Glutaroyl- (C<sub>5</sub>) oder Suberoylrest (C<sub>8</sub>) verestert waren. Die Messung der biologischen Aktivität erfolgte durch Serotoninfreisetzung aus Thrombozyten, die Zunahme von intrazellulärem Calcium in menschlichen Monozyten, oder mit dem Thrombozytenaggregationstest. Dabei zeigte sich, dass alle gemessenen PAF-ähnlichen Lipide biologisch aktiv waren. Eine Kettenverkürzung von C<sub>8</sub> auf C<sub>3</sub> in *sn*-2 Position bewirkte eine Zunahme der biologischen Aktivität um das 10-100 fache (Tanaka et al., 1994; Demopoulos et al., 1979; Blank et al., 1982; Stremmler et al., 1991). Diese Ergebnisse zeigten, dass PAF-ähnliche Lipide mit einem Palmitoylrest in *sn*-1 Position und einer kurzen Kette in *sn*-2 Position biologische Aktivität besitzen. Damit besitzt auch FPC die strukturellen Voraussetzungen, um biologische Aktivität zu besitzen.

Kürzlich konnte Marathe et al. (1999) nachweisen, dass die nach Oxidation von LDL gemessene biologische Aktivität, hauptsächlich auf PAF-ähnliche Lipide mit Alkylrest zurückzuführen war. Es wurde gezeigt, dass die PAF-ähnlichen Lipide mit Alkylrest etwa 800 Mal aktiver waren als PAF-ähnliche Lipide mit einem Acylrest und deshalb trotz ihrer geringeren Konzentration für den Hauptanteil der biologischen Aktivität verantwortlich waren. FPC (1-Acyl-PC) liegt in einem Konzentrationsbereich von 1,0–4,0 µM im menschlichen Plasma vor. Unbekannt ist, in welcher Konzentration die biologisch aktiven Alkyl-PCs im Plasma vorliegen. Es ist nicht auszuschließen, dass mit der FPC-Bestimmungsmethode auch die wesentlich aktiveren 1-Alkyl-PCs getrennt werden. Dies könnte durch HPLC-MS-Ankopplung identifiziert werden. Aus dem chromatographischen Verhalten von authentischem PAF in unserem System kann man jedoch schließen, dass PAF-ähnliche Lipide mit einem Alkylrest (1-Alkyl-PCs) nicht mit FPC und anderen Acylrest-haltigen PAF-ähnlichen Lipiden chromatographiert werden (Frey et al. 2000).

### 4.3 FPC und oxidativer Stress

In vitro entstanden durch Radikal-initiierte Lipidperoxidation aus ungesättigtem Phosphatidylcholin PAF-ähnliche Lipide (Tanaka et al., 1993; Smiley et al., 1991; Itabe et al., 1988). Folglich stellte sich die Frage, ob auch in vivo durch Radikal-initiierte Lipidperoxidation PAF-ähnliche Lipide entstehen können.

Es gibt verschiedene Faktoren, die zur Bildung freier Radikale in vivo führen können. Dazu gehören Entzündungen, Reperfusion, therapeutische Maßnahmen wie Hyperoxie und Umweltfaktoren, zum Beispiel in Form von Tabakrauch. In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Modelle gewählt, um in biologischen Systemen oxidativen Stress auszulösen. Zu den Modellen gehörte Tabakrauch, die Inkubation von Zellen mit  $H_2O_2$  und die Reduktion des antioxidativen Potentials durch Verminderung des Vitamin E-Gehaltes. Mit allen Experimenten wurde gezeigt, dass oxidativer Stress in biologischen Systemen zu einem Anstieg der FPC-Konzentration führt. Damit wurde die Theorie bestärkt, dass auch in vivo durch Radikal-induzierte Lipidperoxidation PAF-ähnliche Lipide, wie FPC, gebildet werden können.

Beim Rauchen werden freie Radikale erzeugt, die eine Kettenreaktion auslösen (Church und Pryor, 1985; Pryor et al., 1993). Pro Zigarettenzug werden ungefähr 5 nmol Radikale freigesetzt (Church und Pryor, 1985), die wiederum die Leukozyten zur Bildung weiterer reaktiver Sauerstoffradikale in vivo anregen. Lehr et al. (1997) setzten Hamster Tabakrauch aus und bestimmten zu verschiedenen Zeiten nach der Rauchexposition die biologische Aktivität PAF-ähnlicher Lipide. Die biologische Aktivität wurde durch die Aggregation von Leukozyten und Thrombozyten bestimmt. Im Unterschied zu Lehr et al. (1997), bestimmten wir durch eine chemische Methode die Konzentration von FPC im Plasma von Rauchern nach dem Rauchen einer Zigarette. Die biologische Akti-

vität und die FPC-Konzentration erhöhten sich signifikant nach der Rauchexposition. Nach 60 Minuten erreichten sie wieder den Anfangszustand. Vor der Rauchexposition wurde bei Lehr et al. (1997) keine biologische Aktivität gemessen. Im Gegensatz dazu konnten wir vor dem Rauchen eine geringe Ausgangskonzentration von FPC bestimmen. Gründe dafür können Unterschiede zwischen Menschen und Hamstern sein, unterschiedliche Sensitivität der Methoden oder die Tatsache, dass verschiedene Substanzen detektiert wurden. Die Struktur der PAF-ähnlichen Lipide bei Lehr et al. (1997) blieb unbekannt.

Verschiedene Gruppen untersuchten  $F_2$ -Isoprostan, einen anerkannten Marker für Lipidperoxidation (Pratico et al., 1998; Morrow et al., 1990; 1992; 1995; Reilly et al., 1996; Delanty et al., 1996; 1997).  $F_2$ -Isoprostan wird durch Radikal-induzierte Veränderung des Arachidonsäurerests von Phospholipiden gebildet. In Übereinstimmung mit unseren FPC-Daten wurde gezeigt, dass die Konzentration von  $F_2$ -Isoprostan im Blut direkt nach dem Rauchen einer Zigarette ansteigt. Der Einsatz von Antioxidantien führte bei Rauchern zur Reduktion des  $F_2$ -Isoprostan-Spiegel im Urin (Reilly et al., 1996).

In einem weiteren Experiment wurde durch Reduktion der antioxidativen Kapazität oxidativer Stress ausgelöst. Hierzu wurden Ratten mit Vitamin E-armer Nahrung gefüttert, was zu einer Verminderung des Vitamin E-Gehaltes in der alveolären Lavage, den Typ II Zellen, der Leber und im Plasma führte. Es wurde gezeigt, dass Vitamin E-Mangel eine Erhöhung der FPC-Konzentration im Plasma, der Leber und der alveolären Lavage bewirkte. „Refeeding“ des Vitamins wirkte den durch Vitamin E-Mangel ausgelösten Effekten entgegen. In der Leber wurde durch „refeeding“ ein 30 Mal höherer Vitamin E-Gehalt erreicht. Demgegenüber konnte die FPC-Konzentration in dieser Fraktion durch „refeeding“ nicht den Kontrollwerten genähert werden. Dies hängt vermutlich damit zusammen, dass die Zeit des „refeedings“ nicht ausreichend ist, um den Effekten des Vitamin E-Mangels entgegenzuwirken. Rüstow und Mitarbeiter (persönliche Mitteilung) untersuchten die oxidative Belastung eines Vitamin E-

Mangels auf Leber, Plasma und Typ II Zellen und zeigten, dass ein Marker für oxidative Belastung (Vitamin E<sub>chinon</sub>/ E) im Plasma um den Faktor 2, in den Typ II Zellen um den Faktor 3 und in der Leber um den Faktor 7 anstieg. Demnach ist die Leber durch Vitamin E-Mangel einem größeren oxidativen Stress ausgesetzt als die anderen untersuchten Fraktionen.

Unbeeinflusst von dem Vitamin E-Mangel blieb die FPC-Konzentration in den Typ II Zellen. Die Typ II Zellen der Lunge synthetisieren und sezernieren das alveoläre Surfactant, das intrazellulär sehr wahrscheinlich mit verschiedenen Antioxidantien versorgt wird (Tölle et al., 1997; Mustafa und Tierney, 1978; Matalon et al., 1990). Diese verschiedenen Antioxidantien scheinen in der Lage zu sein der Vitamin E-Verarmung entgegenzuwirken.

Bei kardiochirurgischen Patienten muß der Blutkreislauf durch eine Herz-Lungen-Maschine aufrechterhalten werden, damit das Herz über eine längere Dauer ruhiggestellt werden kann. Während dieser Unterbrechung der Durchblutung durch Einsatzes der Herz-Lungen-Maschine kommt es zur Ischämie von Herz und Lunge. Neutrophile werden durch Interaktionen mit Endothelzellen aktiviert. Es entstehen freie Radikale durch Autoxidation von Katecholaminen, die während der Ischämiephase verstärkt freigesetzt wurden (Southorn et al., 1988). Weitere Radikale entstehen während der Bildung bzw. Freisetzung der Arachidonsäure durch den Cyclooxygenase oder Lipoxygenase Bildungsweg (Kukreja et al., 1986; Chien et al., 1984, 1985).

Nach Öffnen der Aortenklemme werden die Organe reperfundiert und aktivierte PMNs fließen in den Kreislauf (Hug et al., 1994). Während der Reperfusionphase werden durch die Reoxygenation verstärkt sauerstoffhaltige Radikale freigesetzt. Die Reperfusionphase ist begleitet von mikrovaskulären Veränderungen, wie das Anschwellen von Endothelzellen, eine erhöhte Gefäßpermeabilität sowie einer erhöhten Kapillarfiltration (Engler et al., 1983;

Gidlof et al., 1982; Granger et al., 1989). Verschiedene Gruppen konnten zeigen, dass in isolierten Ratten- oder Kaninchenherzen nach einer Ischämiephase in der Reperfusionphase eine erhöhte Radikalkonzentration gemessen werden konnte (Zweier et al., 1987; Zweier, 1987; 1988; Garlick et al., 1987). Es wird vermutet, dass während der Reperfusionphase Oxidantien durch die Xanthin-Oxidase erzeugt werden, die wiederum die Bildung weiterer Oxidationsmittel auslösen. Diese Oxidationsmittel aktivieren die Leukozyten (Kubes et al. 1990). Weiterhin wird die Lipidperoxidation ausgelöst und die Phospholipase A<sub>2</sub> aktiviert (Otamiri et al., 1988). In der Reperfusionphase wurde von Kubes et al. (1990) ein signifikanter Anstieg der PAF-Aktivität gemessen. Wir konnten in der Reperfusionphase einen signifikanten FPC-Konzentrationsanstieg, begleitet von einem Anstieg der PMN-Zahl, feststellen. Manchmal kommt es zu einem Blutdruckabfall im systemischen Kreislauf und zu einem Blutdruckerhöhung im pulmonalen Kreislauf. Da PAF-ähnliche Lipide PAF-ähnliche Wirkung besitzen, könnten sie für die genannten Symptomen verantwortlich sein. Übereinstimmend mit unseren Ergebnissen wurde ein Anstieg der Urinkonzentration von F<sub>2</sub>-Isoprostan in der Reperfusionphase gemessen (Morrow et al., 1995; Reilly et al., 1996; Delanty et al., 1997).

#### 4.4 FPC und systemische Inflammation

In der vorliegenden Studie wurden Patienten untersucht, die während einer Herzoperation oxidativem Stress durch z.B. die Ischämie-Reperfusion, die Herz-Lungen-Maschine und weitere Faktoren, ausgesetzt waren. Wir zeigten bereits, dass oxidativer Stress in biologischen Systemen zu einem Anstieg der FPC-Konzentration führt. Deshalb stellten wir die Hypothese auf, dass es zu einer Anreicherung von oxidativ modifizierten Lipiden mit biologischer (proinflammatorischer) Aktivität in kardiochirurgischen Patienten kommt und damit das postoperative Morbiditätsrisiko steigt. Uns dienten 2 Krankheitsprozesse als Auswahlkriterien für die Patienten, nämlich Thrombozytopenie (TP) und Systemisches Inflammatorisches Reaktionssyndrom (SIRS), die beide durch

Aktivierung Radikal-produzierender Zellen gekennzeichnet sind. Eine Systemische Inflammatorische Reaktion kann während einer Herzoperation durch eine Vielzahl an Prozessen ausgelöst werden. Dazu gehört der Kontakt des Blutes mit einer körperfremden Oberfläche in der Herz-Lungen-Maschine (Kirklin et al., 1983), die Entstehung von Schäden in der Ischämie- und Reperfusionphase (Sawa et al., 1996) und die Gegenwart von Endotoxinen (Kharazmi et al., 1989).

SIRS und TP wurden von weiteren Erkrankungen begleitet und hatten deshalb hohe „Acute Physiology Scores“ (APS) im Vergleich zur Kontrolle (Tabelle 8). PAF ist beteiligt an Sepsis und Multiorganversagen (Mathiak et al., 1997). Unsere Patienten mit Multiorganversagen hatten ebenfalls eine erhöhte PAF Aktivität, die jedoch im Vergleich zu anderen Gruppen nicht statistisch signifikant war. Die PAF-Acetylhydrolase, die PAF und PAF-ähnliche Lipide abbaut, zeigte eine geringere Aktivität in Patienten mit Multiorganversagen (Tabelle 9) verglichen mit den Patienten mit SIRS und TP, jedoch ohne Multiorganversagen. Bisherige Veröffentlichungen zu diesem Thema sind widersprüchlich, so zeigte Graham et al. (1994), dass die Aktivität der PAF-Acetylhydrolase bei Patienten mit Sepsis erniedrigt ist. Endo et al. (1994) zeigte hingegen, dass die Überlebenden einer Sepsis eine niedrigere PAF-Acetylhydrolase Aktivität hatten, im Vergleich zu verstorbenen Sepsis Patienten. Schlame et al. (1998) untersuchten die PAF-Acetylhydrolase Aktivität vor und nach einem kardiochirurgischen Eingriff. Dabei zeigte sich, dass Patienten mit einer erniedrigten präoperativen PAF-Acetylhydrolase Aktivität bevorzugter postoperativ ein SIRS zeigten. Wir konnten wiederum in unserer Studie zeigen, dass SIRS keinen signifikanten Einfluss auf die postoperative PAF-Acetylhydrolase Aktivität hat.

Der erhöhte Vitamin E<sub>chinon</sub>/ E Quotient deutet auf eine erhöhte oxidative Belastung der Patienten mit Multiorganversagen hin (Tabelle 8). Trotzdem hatte dies keine Anreicherung von oxidativ modifizierten Lipiden wie LOOH, FPC oder

PAF Aktivität zur Folge (Tabelle 8). Da oxidativ modifizierte Lipide intermediäre Peroxidationsprodukte sind, ist es möglich, dass eine erhöhte Bildung dieser Stoffe durch einen erhöhten Abbau wieder ausgeglichen wird. SIRS Patienten hatten im Gegensatz zu den Patienten mit Multiorganversagen keine erhöhte oxidative Belastung (Tabelle 9), obwohl die Anzahl der Radikal-produzierenden PMNs und Monozyten stark erhöht war. Der einzige Zusammenhang zwischen Radikal-produzierenden Zellen zeigte sich in einer schwachen Korrelation zwischen LOOH und der Anzahl der weißen Blutkörperchen (Tabelle 10). Damit wird die Vermutung unterstützt, dass Leukozyten wichtig sind für die Bildung von LOOH und somit Auslöser der Lipidperoxidation sein könnten.

Bei TP Patienten konnte wie bei SIRS Patienten eine Lipidperoxidation nicht eindeutig gezeigt werden, obwohl der Vitamin E<sub>chinon</sub>/ E Quotient erhöht war und eine schwache Korrelation zwischen diesem Vitamin E<sub>chinon</sub>/ E Quotienten und der Thrombozytenzahl bestand (Tabelle 10).

Ursache für die fehlende Anreicherung von oxidativ modifizierten Lipiden bei Multiorganversagen könnte die Erhöhung von Faktoren sein, die solche Lipide abbauen. Als Beispiel hierfür steht die Phospholipase A<sub>2</sub>, ein Akutphasenprotein (Grönroos et al., 1994), das in allen postoperativen Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden erhöht war. Der Einfluss von SIRS erhöhte signifikant die Phospholipase A<sub>2</sub> (Tabelle 8). Daraus schließen wir, dass die Phospholipase A<sub>2</sub> eine Anreicherung der oxidativ modifizierten Lipide während oxidativer Belastung im Multiorganversagen verhindert. Unsere Vermutung wurde dabei durch eine negative Korrelation von FPC mit der Phospholipase A<sub>2</sub> unterstützt (Tabelle 10). Darüber hinaus wurde diese Vermutung durch den extremen Abfall der FPC-Konzentration als Reaktion auf die Heparin-induzierte Erhöhung der Phospholipase A<sub>2</sub> Aktivität bestätigt (Abbildung 14). Es bleibt allerdings die Frage offen, ob FPC selektiv durch die Phospholipase A<sub>2</sub> hydrolysiert wird, oder ob das Enzym Veränderungen in der Lipidzusammensetzung des Plasmas verursacht und damit indirekt eine Anreicherung von FPC verhindert.

Zusammenfassend zeigten wir, dass es zu keiner Anreicherung von oxidativ modifizierten Lipiden in postoperativen Patienten mit den Symptomen SIRS, TP und Multiorganversagen kommt, auch nicht bei erhöhter Lipidperoxidation im Multiorganversagen. Weiterhin geben die Ergebnisse Grund zur Vermutung, dass das Akutphasenprotein Phospholipase A<sub>2</sub> an der Beseitigung potentiell schädlicher oxidiertes Phospholipide, die durch inflammatorische Prozesse gebildet werden beteiligt sein könnte.

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Oxidativ modifizierte Phospholipide haben PAF-ähnliche Struktur und zeigen in vitro PAF-ähnliche Wirkung. Dabei handelt es sich hauptsächlich um fragmentierte Phosphatidylcholine, die eine lange Fettsäure- oder Alkylkette in sn-1 Stellung und einen kurzen Acylrest (C4-C9) mit oxidiertem C-Atom in sn-2 Stellung haben und als PAF-ähnliche Lipide bezeichnet werden. In der vorliegenden Arbeit wurden durch eine neue HPLC-Fluoreszenzmethode ein Vertreter dieser in vivo existierender PAF-ähnlichen Lipide im Plasma quantifiziert. Dieses fragmentierte Phosphatidylcholin (FPC) besitzt einen Palmitoylrest in sn-1 Position, sowie eine C3 oder C4 Kette in sn-2 Position und erfüllt damit die strukturelle Voraussetzungen für biologische Aktivität. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass FPC in biologisch aktiven Fraktionen enthalten war, deren biologische Aktivität jedoch nicht von PAF bewirkt wurde, sondern von PAF-ähnlichen Lipiden. Dies unterstützt die Vermutung, dass FPC biologische Aktivität zeigt. Im Plasma wird FPC von Lipoproteinen transportiert. Oxidativer Stress in biologischen Systemen, ausgelöst durch Tabakrauch, Organischämie/ Reperfusion, Vitamin E-Mangel oder Inkubation von Zellen mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, führte zu einer Erhöhung der FPC-Konzentration. Damit wurde gezeigt, dass die PAF-ähnlichen Lipide in vivo durch Radikal-induzierte Lipidperoxidation gebildet werden können. Trotz eines Konzentrationsanstiegs von FPC nach oxidativem Stress, kam es bei einer systemischen Inflammation, die von Radikal-bildenden Prozessen begleitet ist, jedoch nicht zu einer Anreicherung von FPC-ähnlichen Lipidperoxidationsprodukten. Ursache für die fehlende Anreicherung von oxidativ modifizierten Lipiden bei einer systemischen Inflammation könnte ihr rascher Abbau durch Phospholipasen, oder der Abbau von Vorstufen, bzw. die Substratminderung, sein.

## Literaturverzeichnis

- 1 American College of Chest Physicians / Society of Critical Care Medicine  
Consensus Conference; Crit Care Med (1992) *20*, S. 864-874
- 2 Arditi M, Manoque KR, Caplan M, Yoger RJ; Infect Dis (1990) *162*, S. 139-147
- 3 Baldo BA, Smal MA, McCaskill; Lipids (1991) *26* 1136-1139
- 4 Bartlett GRJ; Biol Chem (1959) *234*, S. 466-468
- 5 Benveniste J, Henson PM, Cochrane CJ; Exp Med (1972) *136*, S. 1356-1375
- 6 Benveniste J, Le Couedic JP, Polonsky J, Tence M; Nature (1977) *269*, S. 170-171
- 7 Benveniste J, Tence M, Varenne P, Bidault J, Fruchardt JC; FEBS Lett (1979) *226*, S. 371-376
- 8 Blank ML, Cress EA, Lee TC, Malone B, Surlis JR, Piantadosi C, Snyder F; Res Commun Chem Pathol Pharmacol (1982) *38*, S. 3-20
- 9 Blank ML, Cress EA, Whittle T, Snyder F; Life Sci (1981) *29*, S. 769-775
- 10 Blank ML, Snyder F, Byers LW, Brooks B, Muirhead E; Biophys Res Commun (1979) *90*, S. 1194-1200
- 11 Bligh EG, Dyer WJ; Can J Biochem Physiol (1959) *37*, S. 911-917
- 12 Bradford M; Analyt Biochem (1976) *72*, S. 248-254
- 13 Braquet P, Touqui L, Shen TY, Vargaftig BB; Pharmacol Rev (1987) *39*, S. 97-145
- 14 Bratton DL, Kailey JM, Clay KL, Henson PM; Biochim Biophys Acta (1991) *75*, S. 24-35
- 15 Burstein M, Scholnick HR; Adv Lipid Res (1973) *11*, S. 67-108
- 16 Burton GW, Ingold KU; Protective Agents in Cancer: DCH McBrien und TF Slater; Academic Press London, S. 81-99
- 17 Bustos C, Gonzalez-Cuadrado S, Ortiz A, Muley R; Nephrol Dial Transplant (1996) *11*, S. 282-286
- 18 Cadendas E; Oxidative Stress and Antioxidant Defenses in Biology; S Ahmed : New York Chapman and Hall (1995), S. 1-46
- 19 Catignani GL, Bieri JG; Clin Chem (1983) *29*, S. 708-712
- 20 Chien KR, Han A, Sen A, Buja LM, Willerson JT; Circ Res (1984) *54*, S. 313-322
- 21 Church DF, Pryor W; Environ Health Perspect (1985) *64*, S. 111-126
- 22 Clay KL; Methods Enzymol (1990) *187*, S. 134-142

- 23 Delanty N, Reilly MP, Pratico D, Fitzgerald JA, Lawson JA, Fitzgerald GA; *Br J Clin Pharmacol* (1996) *42*, S. 15-19
- 24 Delanty N, Reilly MP, Pratico D, Lawson JA, McCarthy JF, Wood AE, Fitzgerald GA; *Circulation* (1997) *95*, S. 2492-2499
- 25 Demopoulos CA, Pinckard RN, Hannahan DJ; *J Biol Chem* (1979) *254*, S. 9355-9358
- 26 Dobbs LG, Gonzalez R, Williams MC; *Am Rev Respir Dis* (1986) *134*, S. 141-145
- 27 Dole VP, Meimertz H; *J Biol Chem* (1960) *235*, S. 2595-2599
- 28 Dumas BT; *Clin Chim Acta* (1971) *31*, S. 87
- 29 Endo S, Katsuya I, Yamashita H, Takakuwa T, Nakae H; *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* (1994) *83*, S. 289-295
- 30 Engler RL, Schmid-Schoenbein GW, Pavelec RS; *Am J Pathol* (1983) *111*, S. 98-111
- 31 Frey B, Haupt R, Alms S, Holzmann G, König T, Kern H, Rüstow B, Schlame M; *J Lipid Res* (2000) *41*, S. 1145-1153
- 32 Forstegard J, Huang YH, Ronnelid J, Schafer-Elinder; *Arterioscler Thromb Vasc Biol* (1997) *17*, S. 963-968
- 33 Fukuzawa K, Chida H, Tokumura A, Tsukatani H; *Arch Biochem Biophys* (1981) *206*, S. 173-180
- 34 Garlick PB, Davies MJ, Hearse DJ, Slater TF; *Circ Res* (1987) *61*, S. 757-760
- 35 Gidlof A, Hammersen F, Larsson J, Lewis DH, Liljedahl SO; *Induced Skeletal Muscle Ischemia in Man: DH Lewis Basel Karger* (1982), S. 63
- 36 Girotti A; *J Lipid Res* (1998) *39*, S. 1529-1539
- 37 Graham RM, Stephans CJ, Silvester W; *Crit Care Med* (1994) *22*, S. 204-212
- 38 Granger DN, Benoit JN, Suzuki, Grisham MB; *Am J Physiol* (1989) *257*, S. G683-688
- 39 Grönroos JM, Forsström JJ, Irjala K, Nevalainen TJ; *Clin Chem* (1994) *40*, S. 1757-1760
- 40 Halliwell B, Gutteridge JMC; *Free radicals in biology and medicine* (1989) *2nd ed.*, S. 1-85
- 41 Halliwell B; *Age Pigments*; RS Sohal: New York, Elsevier (1981), S. 1-62
- 42 Hall LM, Murphy RC; *Anal Biochem* (1998) *258*, S. 184-194
- 43 Hanahan DJ; *Ann Rev Biochem* (1986) *55*, S. 483-509
- 44 Hanahan DJ, Weintraub ST; *Methods Biochem Anal* (1985) *31*, S. 195-219
- 45 Heery JM, Kozak M, Stafforini DM, Jones DA, Zimmermann GA, McIntyre TM,

- Prescott SM; *J Clin Invest* (1995) *96*, S. 2322-2330
- 46 Henson PM; *J Exp Med* (1971) *131*, S. 287-304
- 47 Hicks M, Gebicki JM; *Arch Biochem Biophys* (1981) *210*, S. 56-63
- 48 Hirashima Y, Endo S, Ohmori T, Kato R, Takaku A; *J Neurosurg* (1994) *80*, S. 31-36
- 49 Honda Z, Nakamura M, Miki I, Watanabe T, Seyama Y, Okado H, Toh H, Ito K, Miyamoto T, Shimizu T; *Nature* (1991) *349*, S. 342-346
- 50 Hornsby PJ, Crivello JF; *Mol Cell Endocrinol* (1983) *30*, S. 1-20
- 51 Hsieh KH, Ng CKJ; *Allergy Clin Immunol* (1993) *91*, S. 650-657
- 52 Hug CC, Shanewise JS, Miller RD; In *Anesthesia*: New York; Churchill Livingstone (1994), S. 1757-1809
- 53 Hwang SB, Lam MH, Alberts AW, Bugianesi RL, Chabala JC, Ponpipom MM; *J Pharmacol Exp Ther* (1988) *246*, S. 534-541
- 54 Itabe H, Kishi Y, Handa S, Inoue K; *Biochim Biophys Acta* (1988) *96*, S. 28-15
- 55 Kern H, Volk T, Knauer-Schiefer S, Miethe T, Rüstow B, Kox WJ, Schlame M; *Biochim Biophys Acta* (1998) *1394*, S. 33-42
- 56 Kharazmi A, Andersen LW, Baek L; *J Thorac Cardiovasc Surg* (1989) *98*, S. 381-385
- 57 Kim DK, Bonventre JV; *Biochem J* (1993) *294*, S. 261-270
- 58 Kirklin JK, Westaby S, Blackstone EH; *J Thorac Cardiovasc Surg* (1983) *86*, S. 845-857
- 59 Knaus WA, Draper EA, Wagner DP, Zimmermann JE; *Crit Care Med* (1985) *13*, S. 818-829
- 60 Kubes P, Ibbotson G, Russell J, Wallace JL, Granger N; *Am J Physiol* (1990) *259*, S. G300-G304
- 61 Kulikov VI, Bergel'son LD; *Biokhimiia* (1984) *49*, S. 1310-1315
- 62 Kukreja RC, Kontos HA, Hess ML, Ellis EF; *Cir Res* (1986) *59*, S. 612-619
- 63 Kunz D, Gerard NP, Gerard C; *J Biol Chem* (1992) *267*, S. 9101-9106
- 64 Lehr HA, Weyrich AS, Saetzler RK, Jurek A, Arfors KE, Zimmermann GA, Prescott SM, McIntyre TM; *J Clin Invest* (1997) *99*, S. 2358-2364
- 65 Marshall JC, Cook DJ, Christou NV; *Crit Care Med* (1995) *23*, S. 1638-1652
- 66 Marathe G, Prescott SM, Zimmermann GA, McIntyre TM; *J Biol Chem* (1999) *40*, S. 28395-28404
- 67 Matalon S, Holm BA, Baker RR, Whitfield MK, Freeman BA; *Biochim Biophys Acta* (1990) *1035*, S. 121-127

- 68 McIntyre TM, Zimmermann GA, Prescott SM; *J Biol Chem* (1999) *274*, S. 25189-25192
- 69 McManus LM, Deavers SI; *Clinics Chest Med* (1989) *10*, S. 107-118
- 70 McManus LM, Ostrom KK; *FASEB J* (1988) *2*, S. 411
- 71 McManus LM, Woodward DS, Deavers SI, Pinckard RN; *Lab Invest* (1993) *69*, S. 639-650
- 72 Minotti G, Aust SD; *Chem Phys Lipids* (1987) *44*, S. 191-208
- 73 Morrow JD, Awad JA, Boss HJ, Blair IA, Roberts LJ; *Proc Natl Acad USA* (1992) *89*, S. 10721-10725
- 74 Morrow JD, Frei B, Longmire AW, Gaziano JM, Lynch SM, Roberts LJ; *N Eng J Med* (1995) *332*, S. 1198-1203
- 75 Morrow JD, Hill KE, Burk RF, Nammour TM, Badr KF, Roberts JR; *Proc Natl Acad USA* (1990) *87*, S. 9383-9387
- 76 Mueller HW, O'Flaherty JT, Wykle RL; *J Biol Chem* (1984) *259*, S. 14554-14559
- 77 Muirhead EE, Jones F, Stirman JA; *J Lab Clin Med* (1960) *56*, S. 167-180
- 78 Mustafa MG, Tierney DF; *Am Rev Respir Dis* (1978) *118*, S. 1061-1090
- 79 Nakamura H, Kim DK, Philbin D, Bonventre JV; *J Clin Invest* (1995) *95*; S. 1062-1070
- 80 Nakamura M, Honda Z, Izumi T, Sakanaka C, Mutoh H, Minami M, Bito H, Seyama Y, Matsumoto T, Noma M, Shimizu T; *J Biol Chem* (1991) *266*, S. 20400-20405
- 81 Nijssen JT, Roosenboom CFP, van den Bosch H; *Biochim Biophys Acta* (1986) *876*, S. 611-618
- 81 Porter NA, Weber BA, Weenen H, Khan JA; *J Am Chem Soc* (1989) *102*, S. 5597-5601
- 82 Nishida K, Markey SP; *Stroke* (1996) *27*, S. 514-519
- 83 Oda M, Satouchi K, Ikeda I, Sakakura M, Yasunaga K, Saito K; *Am Rev Respir Dis* (1991) *141*, S. 1469-1473
- 84 O'Flaherty JT, Tessner T, Greene D, Redmann JR, Wykle RL; *Biochim Biophys Acta* (1994) *1210*, S. 209-216
- 85 O'Flaherty JT, Wykle RL; *Clin Rev Allergy* (1983) *1*, S. 353-357
- 86 Ohishi N, Ohkawa H, Miike A, Tatano T, Yagi K; *Biochem Int* (1985) *10*, S. 205-211
- 87 Otamiri T, Lindahl M, Tagesson C; *Gut* (1988) *29*, S. 489-494
- 88 Patel KD, Zimmermann GA, Prescott SM, McIntyre TM; *J Biol Chem* (1989)

267, S. 15168-15175

- 90 Practico D, Basili S, Vieri M, Cordova C, Violi F, Fitzgerald GA; *Am J Respir Crit Care Med* (1998) *158*, S. 1709-1714
- 91 Prewitt RL, Leach BE, Byers LW, Brooks B, Lands WEM, Muirhead EE; *Hypertension* (1979) *1*, S. 299-308
- 92 Prescott SM, McIntyre TM, Zimmermann GA; *Thromb Haemost* (1990) *64*, S. 99-103
- 93 Pryor WA, Stone K; *Ann NY Acad Sci* (1993) *686*, S. 12-28
- 94 Rashid MA, William-Olsson G; *Thorac Cardiovasc Surg* (1991) *39*, S. 193-195
- 95 Reilly M, Delanty N, Lawson JA, Fitzgerald GA; *Circulation* (1996) *94*, S. 19-25
- 96 Saito K, Nakayama R, Yasuda K, Sugatani J, Satouchi K; International Medical Publishers; *Platelet-Activating Factor and Diseases* Tokyo, S. 19
- 97 Satoh K, Imaizumi TA, Yoshida H, Hiramoto M, Takamatsu S; *Acta Neurol Scand* (1992) *85*, S. 122-127
- 98 Satouchi K, Makoto O, Ysunaga K, Saito K; *Biochem Biophys Res Commun* (1985) *128*, S. 1409-1417
- 99 Satouchi K, Oda M, Saito K; *Lipids* (1987) *22*, S. 285-287
- 100 Sattler W, Mohr D, Stocker R; *Methods in Enzym* (1994) *233*, S. 469-489
- 101 Sawa Y, Shimazaki Y, Kadoba K; *J Thorac Cardiovas Surg* (1996) *111*, S. 29-35
- 102 Schlame M, Haupt R, Wisedel I, Kox WJ, Rüstow B; *J Lipid Res* (1996) *37*, S. 2608-2615
- 103 Schlame M, Schmid A, Haupt R, Rüstow B, Kox WJ; *Shock* (1998) *9*, S. 1-7
- 104 Sies H; *Oxidative Stress*: London, Academic Press (1985), S. 1-8
- 105 Slater TF; *Biochem Soc Trans* (1982) *10*, S. 70-71
- 106 Smiley PL, Stremmer KE, Prescott SM, Zimmermann GA, McIntyre TM; *J Biol Chem* (1991) *266*, S. 11104-11110
- 107 Snyder F; *Proc Soc Exp Biol Med* (1989) *190*, S. 125-135
- 108 Snyder F; *Am J Physiol* (1990) *259*, S. C697-C708
- 109 Southorn PA, Powis G; *Mayo Clin Proc* (1988) *63*, S. 381-389
- 110 Stafforini DM, Prescott SM, McIntyre TM; *J Biol Chem* (1987) *262*, S. 4223-4230
- 111 Stremmer KE, Stafforini DM, Prescott SM, McIntyre TM; *J Biol Chem* (1991) *266*, S. 11095-11103

- 112 Tanaka T, Iimori M, Tsukatani H, Tokumura A; *Biochim Biophys Acta* (1994) *1210*, S. 202-208
- 113 Tanaka T, Minamino H, Unezaki S, Tsukatani H, Tokumura A; *Biochim Biophys Acta* (1993) *1166*, S. 264-274
- 114 Tappel AL, Pryor WA; *Free Radicals in Biology*: New York, London (1980), S. 1-45
- 115 Tateishi T, Yoshimine N, Kuzuya F; *Exp Gerontol* (1987) *22*, S. 103-111
- 116 Tölle A, Kolleck I, Schlame M, Wauer R, Stevens PA, Rüstow B; *Biochem Biophys Acta* (1997) *1346*, S. 198-204
- 117 Tokumura A; *Prog Lipid Res* (1995) *34*, S. 151-184
- 118 Tokumura A, Asai T, Takauchi, Kamiyasu K, Ogawa T, Tsukatani H; *Biochem Biophys Res Commun* (1988) *155*, S. 863-869
- 119 Tokumura A, Kamiyasu K, Takauchi K, Tsukatani H; *Biochem Biophys Res Commun* (1987) *145*, S. 415-425
- 120 Tokumura A, Takauchi K, Asai T, Kamiyasu K, Ogawa T, Tsukatani H; *J Lipid Res* (1989) *30*, S. 219-224
- 121 Tokumura A, Tanaka T, Yotsumoto T, Tsukatani H; *Biochem Biophys Res Commun* (1991) *177*, S. 466-473
- 122 Tortolani AJ, Powell SR, Misik V, Weglicki WB, Pogo GJ, Kramer JH; *Free Radic Biol Med* (1993) *14*, S. 421-426
- 123 Tsukatani H, Yamada S, Tokumura A, Miyamoto T, Takauchi; *Chem Pharm Bull* (1976) *24*, S. 2294-2300
- 124 Valone FH, Coles E, Reinhold VR, Goetzl EJ; *J Immunol* (1982) *129*, S. 1637-1641
- 125 Vaskovsky VE, Kostetsky EY; *J Lipid Res* (1968) *9*, S. 396
- 126 Wang CJ, Tai HH; *J Biol Chem* (1990) *266*, S. 12372-12378
- 127 Watson AD, Subbanagounder G, Welsbie DS, Faull KF, Navab M, Jung ME, Fogelman AM, Berliner JA; *J Biol Chem* (1999) *274*, S. 24787-24798
- 128 Watson AD, Leitinger N, Navab M, Faull KF, Hörkkö S, Witztum JL, Palinski W, Schwenke D, Salomon RG, Sha W, Subbanagounder G, Fogelman AM, Berliner JA; *J Biol Chem* (1997) *272*, S. 868-876
- 129 Weintraub ST, Ludwig JC, Mott GE, McManus LM, Pinckard RN; *Biochem Biophys Res Commun* (1991) *129*, S. 868-876
- 130 Weintraub ST, Lear CL, Pinckard RN; *J Lipid Res* (1990) *31*, S. 719-725
- 131 Witting LA, Pryor WA; *Free Radicals in Biology*: New York, London; Academic Press (1980), S. 295-319
- 132 Woodard DS, Mealey BL, Lear CS, Satsangi RK, Prihoda TJ, Weintraub ST,

- Pinckard RN, McManus LM; *Biochim Biophys Acta* (1995) *1259*, S. 137-147
- 133 Yoshida J, Tokumura A, Fukuzawa K, Terao M, Takauchi K, Tsukatani H; *J Pharm Pharmacol* (1986) *38*, S. 878-882
- 134 Yue TL, Rabinovici R, Farhat M, Feuerstein G; *Prostaglandins* (1990) *39*, S. 469-480
- 135 Zimmermann GA, Prescott SM, McIntyre TM; Gallin JI; New York: Raven Press (1992), S. 149-176
- 136 Zweier JL, Flaherty JT, Weisfeldt ML; *Proc Natl Acad Sci* (1987) *84*, S. 1404-1407
- 137 Zweier JL; *J Biol Chem* (1988) *263*, S. 1353-1357
- 138 Zweier JI, Rayburn BK, Flaherty JT, Weisfeldt ML; *J Clin Invest* (1987) *80*, S. 1728-1734

## 6 Anhang

### Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Betreuer Herrn PD Dr. Michael Schlame für die Überlassung des Themas und seine zahlreichen Anregungen und Hinweise. Besonders danken möchte ich ihm für seine ständige Hilfsbereitschaft und die von ihm geschaffene persönliche Atmosphäre.

Weiterhin bedanke ich mich bei Herrn Prof. Bernd Rüstow für die wertvollen Diskussionen, Vorschläge und kritischen Hinweise.

Herrn Prof. M. Melzig möchte ich für seine Bereitschaft, meine externe Promotion zu unterstützen und für sein Interesse am Fortgang dieser Arbeit ganz herzlich danken.

Frau Dr. Renate Haupt danke ich für die ehrenamtliche Betreuung, die tatkräftige Unterstützung bei allen Problemen und das sehr gute Arbeitsklima.

Ich danke Sonja Alms und Wolfram Johnen für ihre Hilfsbereitschaft, Zuverlässigkeit und Kollegialität, die eine harmonische und erfolgreiche Teamarbeit ermöglichten.

Für das freundliche Miteinander im Labor und die Hilfsbereitschaft danke ich Frau Beate Diemar, Frau Ruth Hermann, Frau Roswitha Jehle, Frau Dr. Ingrid Kolley, Frau Antje Meier, Frau Ulrike Noack, sowie den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Laboratoriumsmedizin und Pathobiochemie.

## Lebenslauf

Name Bettina Frey  
Geburtsdatum 27. Mai 1973  
Geburtsort Reutlingen

### Schule

1979-1983 Grundschule, Hofheim-Diedenbergen  
1983-1989 Leibniz-Gymnasium, Frankfurt  
1989-1992 Gymnasiale Obersufe, Hofheim am Taunus (Abschluß:  
Abitur)

### Studium

1992-1996 Studium der Pharmazie an der Humboldt-Universität zu  
Berlin

### Beruf

11/96-10/97 Praktisches Jahr  
Apotheke Zum Phönix, Berlin  
Derriford Hospital, Plymouth GB  
01/98 Erhalt der Approbation als Apothekerin  
01/98-01/00 Wissenschaftliche Mitarbeiterin an der Klinik für  
Anästhesiologie und operative Intensivmedizin in der  
Charité, Medizinische Fakultät der Humboldt-Universität  
zu Berlin  
01/99-04/99 Forschungsaufenthalt am Hospital for Special Surgery in  
New York, USA  
07/00- Trainee im Geschäftsbereich Technologie und  
Pharma Herstellung bei Boehringer Ingelheim Pharma KG,  
Ingelheim

## Erklärung

Hiermit erkläre ich, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe.

Berlin, den

Bettina Frey