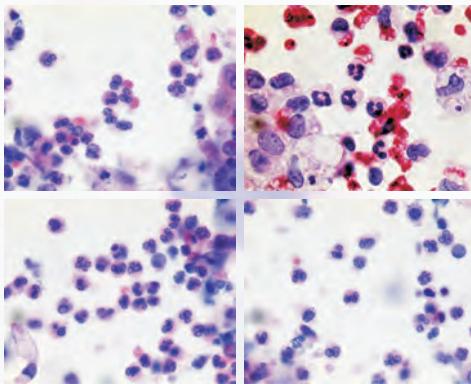


## Diana Burchert

Der Einfluß von Taurin und  $\beta$ -Alanin auf die Pools primärer Amino- und  $\alpha$ -Ketosäuren sowie ausgewählte Immunfunktionen in menschlichen polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten



INAUGURALDISSERTATION zur Erlangung des Grades eines **Doktors der Medizin**  
des Fachbereiches Medizin der Justus-Liebig-Universität



*edition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**



**Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.**

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2011

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1<sup>st</sup> Edition 2011

© 2011 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen  
Printed in Germany



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN  
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890  
email: [redaktion@doktorverlag.de](mailto:redaktion@doktorverlag.de)

[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)

Der Einfluß von Taurin und  $\beta$ -Alanin auf die Pools primärer  
Amino- und  $\alpha$ -Ketosäuren sowie ausgewählte  
Immunfunktionen in menschlichen polymorphkernigen  
neutrophilen Granulozyten

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

des Fachbereiches Medizin

der Justus-Liebig-Universität

vorgelegt von Burchert, Diana, geb. Quandt

aus Iserlohn

Gießen 2010

Aus dem Zentrum für Chirurgie, Anaesthesiologie und Urologie  
Klinik für Anaesthesiologie, Operative Intensivmedizin und Schmerztherapie  
des Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH  
Standort Gießen

Direktor/Leiter: Univ.-Prof. Dr. med. Markus Weigand

Gutachter: Prof. Dr. med. Jörg Mühling, MBA

Gutachter: Prof. Dr.med. Holger Hackstein

Tag der Disputation: 14.01.2011

# Inhaltsverzeichnis

<b>1 EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
1.1 EINFÜHRUNG IN DIE THEMATIK	1
1.2 INTRAZELLULÄRE AMINOSÄURE- UND $\alpha$ -KETOSÄURENANALYTIK IN POLYMORPHKERNIGEN GRANULOZYTEN (PMN)	4
1.3 ZIELSETZUNG UND FRAGESTELLUNGEN	7
<b>2 MATERIAL UND METHODIK .....</b>	<b>8</b>
2.1 HOCHSELEKTIVE SEPARATION VON PMN AUS VOLLBLUT	8
2.2 BESTIMMUNG PLASMATISCHER UND FREIER INTRAZELLULÄRER AMINOSÄUREN IM PMN MITTELS HOCHAUFLÖSENDE FLUORESCENZ-HOCHDRUCK-FLÜSSIGKEITS-CHROMATOGRAPHIE (F-HPLC)	10
2.2.1 Puffer, Lösungen und Reagenzien zur Probenvorbereitung und Fluoreszenz-derivatisierung	10
2.2.1.1 Standardextraktionspuffer (primäre Aminosäuren)	10
2.2.1.2 Externe Aminosäurestandardproben (primäre Aminosäuren)	11
2.2.1.3 Boratpuffer	12
2.2.1.4 o-Phthaldialdehyd-Mercaptoethanol-Reagenz (OPA)	12
2.2.1.5 HCl-Lösung (0,75 N)	12
2.2.1.6 Methanol-Natriumacetatpuffer	13
2.2.1.7 HPLC- Spüllösung	13
2.2.2 Geräteanforderung: Fluoreszenz-Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie	14
2.2.3 Automatisierte Vorsäulen-Derivatisierung	15
2.2.4 Gradienten	16
2.3 BESTIMMUNG PLASMATISCHER UND FREIER INTRAZELLULÄRER $\alpha$ -KETOSÄUREN IN PMN MITTELS HOCHAUFLÖSENDE F-HPLC	18
2.3.1 Puffer, Lösungen und Reagenzien zur Probenvorbereitung und Fluoreszenzderivatisierung	19
2.3.1.1 Standardextraktionspuffer für die $\alpha$ -Ketosäureanalytik (SEP-KS)	19
2.3.1.2 Externe $\alpha$ -Ketosäurestandardproben	19
2.3.1.3 o-Phenyldiaminreagenz (PDA)	20
2.3.2 Pipettierschema der PDA-Reagenz-vermittelten halbautomatischen $\alpha$ -Ketosäure-derivatisierung	20
2.3.3 Gradienten	22
2.4 BESTIMMUNG DER GRANULOZYTÄREN SUPEROXIDANION- ( $O_2^-$ ) UND WASSERSTOFF-PEROXIDBILDUNG ( $H_2O_2$ ) SOWIE DER AKTIVITÄT DER VON PMN FREIGESETZTEN MYELOPEROXIDASE (MPO)	23
2.4.1 Bestimmung der granulozytären Superoxidationbildung nach hochselektiver Separation von PMN aus menschlichem Vollblut	24
2.4.2 Bestimmung der granulozytären Wasserstoffperoxidbildung nach hochselektiver Separation von PMN aus menschlichem Vollblut	25
2.4.3 Bestimmung der Aktivität der von PMN freigesetzten Myeloperoxidase nach hochselektiver Separation aus menschlichem Vollblut	26
2.5 INKUBATIONEN MIT TAURIN UND $\beta$ -ALANIN	26
2.5.1 Taurin	27

---

2.5.2 $\beta$ -Alanin	28
2.6 STATISTISCHE AUSWERTUNG	29
<b>3 ERGEBNISSE</b> .....	<b>30</b>
3.1 HOCHSELEKTIVE SEPARATION VON PMN AUS VOLLBLUT	30
3.2 BESTIMMUNG PLASMATISCHER UND FREIER INTRAZELLULÄRER AMINOSÄUREN IN PMN MITTELS F-HPLC	30
3.2.1 Ergebnisse der Standardisierungs- und Validierungsverfahren im Rahmen der Quantifizierung von Aminosäurestandardproben	31
3.3 BESTIMMUNG PLASMATISCHER UND FREIER $\alpha$ -KETOSÄUREN IN PMN MITTELS F-HPLC	31
3.3.1 Ergebnisse der Standardisierungs- und Validierungsverfahren im Rahmen der Quantifizierung von $\alpha$ -Ketosäurestandardproben	31
3.4 EINFLUß DER IMMUNONUTRITIVEN AMINOSÄURE TAURIN UND DEM STOFFWECHSELMODULATOR $\beta$ -ALANIN AUF DIE FREIEN AMINO- UND $\alpha$ -KETOSÄUREPOOLS IN PMN SOWIE AUF AUSGESUCHTE GRANULOZYTÄRE IMMUNFUNKTIONEN	32
3.4.1 Immunonutritive Aminosäure	32
3.4.1.1 Einfluß von Taurin auf den intragranulozytären Pool primärer Aminosäuren	32
3.4.1.2 Einfluß von Taurin auf den intragranulozytären $\alpha$ -Ketosäurenpool	32
3.4.1.3 Einfluß von Taurin auf granulozytäre Immunfunktionsmarker (Superoxidanionbildung, Wasserstoffperoxidproduktion, Myeloperoxidaseaktivität)	33
3.4.2 Stoffwechselmodulator $\beta$ -Alanin	33
3.4.2.1 Einfluß von $\beta$ -Alanin auf den intragranulozytären Pool primärer Aminosäuren	33
3.4.2.2 Einfluß von $\beta$ -Alanin auf den intragranulozytären $\alpha$ -Ketosäurenpool	33
3.4.2.3 Einfluß von $\beta$ -Alanin auf granulozytäre Immunfunktionsparameter (Superoxidanionbildung, Wasserstoffperoxidproduktion, Myeloperoxidaseaktivität)	33
3.4.3 Immunonutritive Aminosäure + Stoffwechselmodulator $\beta$ -Alanin	34
3.4.3.1 Einfluß von Taurin kombiniert mit $\beta$ -Alanin auf den intragranulozytären Pool primärer Aminosäuren	34
3.4.3.2 Einfluß von Taurin kombiniert mit $\beta$ -Alanin auf den intragranulozytären $\alpha$ -Ketosäurenpool	34
3.4.3.3 Einfluß von Taurin kombiniert mit $\beta$ -Alanin auf granulozytäre Immunfunktionsparameter (Superoxidanionbildung, Wasserstoffperoxidproduktion, Myeloperoxidaseaktivität)	34
<b>4 DISKUSSION</b> .....	<b>35</b>
4.1 DISKUSSION DER VERWENDETEN METHODEN UND MESSVERFAHREN	35
4.1.1 Quantitative Aminosäurebestimmung in menschlichen polymorphkernigen Granulozyten	35
4.1.2 Quantitative $\alpha$ -Ketosäurenbestimmung in menschlichen polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten	38
4.1.3 Analytikverfahren zur Quantifizierung der Superoxidanion- und Wasserstoffperoxidbildung sowie der Aktivität der von neutrophilen Granulozyten freigesetzte Myeloperoxidase	41
4.2 DISKUSSION DER PATHOPHYSIOLOGISCHEN BEDEUTUNG VON TAURIN SOWIE TAURINABHÄNGIGER STOFFWECHSELPROZESSE FÜR PMN-ZELLEN	45
<b>5 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK</b> .....	<b>53</b>

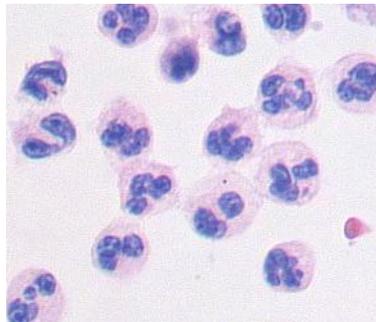
<b>6 SUMMARY .....</b>	<b>55</b>
<b>7 LITERATUR.....</b>	<b>56</b>
<b>8 ANHANG.....</b>	<b>71</b>
8.1 ERGEBNISTABELLEN	71
8.1.1 Taurin	71
8.1.2 Stoffwechselmodulator $\beta$ -Alanin ( $\beta$ -Ala)	78
8.1.3 Taurin + Stoffwechselmodulator $\beta$ -Alanin	81
8.2 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	85
8.3 EIGENE PUBLIKATIONEN	88
8.4 ERKLÄRUNG	89
8.5 LEBENSLAUF	90
8.6 DANKSAGUNG	91



# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Einführung in die Thematik

Neutrophile polymorphkernige Granulozyten (PMN) repräsentieren den sowohl mobilsten und zahlenmäßig bedeutendsten, zellulären Bestandteil der natürlichen unspezifischen Immunabwehr des menschlichen Organismus (Bernard et al. 2005). Ihre Aufgabe ist es, pathogene Mikroorganismen, als pathogen erkannte Zellen und Antigene zu bekämpfen. Durch proinflammatorische und chemotaktische Faktoren, sowie unterschiedlichste Mediatoren des Immunsystems (z. B. Komplementfaktoren, Cytokine oder Antikörper wie z. B. IgG) an Orte traumatischer oder infektiöser Gewebeschädigungen angelockt, verfügen PMN über ein breites Spektrum effizienter Abwehrmechanismen wie Phagozytose, Degranulation und oxidative Aktivität (Burg et al. 2001; Edwards et al. 1995; Witko-Sarsat et al. 2000).



**Abb. 1:** Aufgenommen mit 40 x 10facher Vergrößerung

Zeiss Axioskop, Programm Diskus

Die Bereitstellung der Energie, wie auch die Substrate und Metabolite zur Immunabwehr, erfolgt über eigene umfangreiche stoffwechselphysiologische Mechanismen, wie unter anderem einen eigenen Glukosestoffwechsel (Glykolyse und Glukoneogenese), einen Harnstoffzyklus und eine aktive Protein-, Enzym- und Lipidbiosynthese. Ferner verfügen sie für eine oxidative Phosphorylierung über die erforderlichen Enzymkomplexe. Ein anderer wichtiger Faktor ist das Vorhandensein eines eigenen Zitratzyklus, in dem die Endprodukte kataboler Stoffwechselwege eingeschleust werden und aus dem entstehende Zwischenprodukte für anabole intrazelluläre Stoffwechselsequenzen genutzt werden (Frei et al. 1975; Rossi et al. 1976).

Durch Untersuchungen in den letzten Jahren stellte sich heraus, dass für die vielfältigen immunologischen Aufgaben, aber auch für die zelluläre Integrität von neutrophilen Granulozyten ein aktiver intragranulozytärer Aminosäurenstoffwechsel von Bedeutung zu sein scheint (Al Sawaf et al. 1993; Carrea et al. 1993; Metcoff 1986). Dabei soll sowohl die Stoffwechselaktivität einzelner besonderer Aminosäuren (wie z. B. Taurin), als auch die qualitative und quantitative Zusammensetzung des intrazellulären Aminosäurepools eine essentielle Bedeutung besitzen (Grimble RF 1994; Grimm et al. 2001; Huemer et al. 2009; Nakajima et al. 2009). Die Zusammensetzung eben dieses Pools scheint hier direkt auf die zellspezifischen Aufgaben, Anforderungen und wichtigen physiologischen Funktionen abgestimmt zu sein. Dies wird klar bei Betrachtung wichtiger Stoffwechselprozesse anderer Körperzellen (Glykolyse, Zitrat- und Harnstoffzyklus, Proteinbiosynthese), die primär von einem ausgewogenen Gehalt intrazellulärer Substrate sowie Metabolite, insbesondere auch von freien Aminosäuren, abhängen und erst sekundär den Einflüssen und potentiellen Veränderungen des extrazellulären Aminosäurepools (Plasma, Gewebe) unterliegen (Cassol et al. 2009; Fürst 1998; Grimble 2001; Manhart et al. 2003). Diese freien Einzel-Aminosäuren können für PMN wichtige Substrate für die Synthese von Proteinen, Enzymen oder anderer wichtiger zellulärer Makromoleküle (kompartimentiert z. B. in Vesikeln und Granula) darstellen und als Stickstoff- bzw. Aminogruppendonatoren bei der Biosynthese wichtiger stickstoffhaltiger Verbindungen wie Purinen, Pyrimidinen oder auch Stickstoffmonoxid (NO) wirken (Grimble 1995; Metcoff 1986, Newsholme et al. 2005). Der freie Aminosäurebestand ist keinesfalls statisch, er unterliegt besonderen Stoffwechselsituationen und zellspezifischen Erfordernissen und Funktionen (wie z. B. den zuvor beschriebenen Immunfunktionen oder der Aufrechterhaltung der Zellintegrität). Hierfür werden die benötigten einzelnen Aminosäuren nicht nur aus dem Extrazellulärraum aufgenommen, sondern auch in den Zellen selbst produziert und bei Bedarf zu hochaktiven zellulären Substraten umgeformt (Fürst et al. 2004; Metcoff 1986; Newsholme 2005). Durch Beobachtung und Untersuchung der freien intragranulozytären Aminosäuren konnte festgestellt werden, dass einige Aminosäuren, wie z. B. Taurin, verglichen mit menschlichen Plasmaproben bis zu 200-fach höher konzentriert vorliegen, was wiederum als Beweis für die aktive Aminosäureaufnahme aus dem extrazellulären Kompartiment, bzw. für eine Aminosäuresyntheseaktivität gedeutet werden kann (Bender 1985; Fürst 2004; Mühling et al. 1999). Gerade die Aminosäuresyntheseaktivität ist besonders wichtig, da die neutrophilen Granulozyten nur auf etwa 1% des körpereigenen freien Aminosäurepools zurückgreifen können (Fuchs et al. 1994; Mühling et al. 1999, 2003).

Wieso einige Aminosäuren (wie z. B. Taurin) in großen Mengen in den PMN vorkommen, ist bis jetzt nicht ausreichend erforscht. Es besteht jedoch die interessante These, dass diese Aminosäuren im Zuge der granulozytären Immunantwort benötigt werden (Coëffier et al. 2009; Grimble et al. 1998, Mühling et al. 2002, 2005, 2007; Redmond 1998). 2009; Marcinkiewicz J. 2009; Nakajima et al. 2009; Newsholme 1995; Suchner et al. 2000).

Bei Untersuchungen von Immunfunktionen und stoffwechselphysiologischen Erfordernissen von polymorphkernigen Granulozyten soll nun speziell die Rolle des Taurins betrachtet werden.

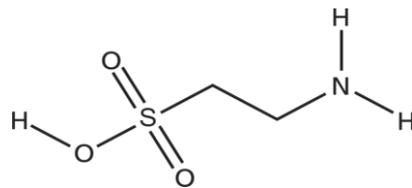


Abb. 2: Taurinmolekül/Quelle: Wikipedia

Die nichtproteinogene Aminosäure Taurin (2-Aminoethylsulfonsäure) wurde erstmals 1827 von den Chemikern Friedrich Tiedemann und Leopold Gmelin aus der Galle von Stieren (lateinische Bezeichnung: Fel tauri) durch Kochen in Wasser isoliert und zunächst nur als stoffwechselneutrales und reaktionsträges Zellabfallsprodukt ohne besondere Funktion beschrieben (Tiedemann & Gmelin 1827). Die neu entdeckte Aminosäure wurde Gallen-Asparagin genannt und erst 1838 als Taurin in der Literatur erwähnt. Im Körper findet sich Taurin hauptsächlich in Muskeln, Gehirn, Herz und Blut. Obwohl der erwachsene menschliche Körper in der Lage ist, die Aminosäure aus Cystein selbst herzustellen und somit eine äußere Zufuhr nicht nötig ist, ist Taurin vor allem als Zusatz in Energy-Drinks bekannt. Einen leistungssteigernden Effekt konnte jedoch bislang in „in vivo“ Untersuchungen nicht ausreichend bestätigt werden (Ito et al. 2009; Goodmann et al. 2009).

Bei Forschungen an Leukozyten stellten Learn et al bzw. Fürst et al Anfang der 90er Jahre fest, dass Taurin den größten Anteil mit etwa 60% an der Gesamtmenge freier intragranulozytärer Aminosäuren in PMN hat und dieser gegen einen hohen extra- versus intrazellulären Gradienten (ca. 1:100-200) auch bei abfallenden extrazellulären Taurinspiegeln, z. B. im Rahmen taurindepletierter Diäten, aufrechterhalten wird (Jacobson et al. 1986; Fürst et al. 1987; Learn et al. 1990; Suleiman et al. 1993).

Laut neuesten Untersuchungen könnte die Hauptaufgabe in der Immunregulation und Immunfunktionserhaltung liegen (z.B. Membranstabilisierung, Osmoregulation und

Antidotwirkung) (Nakajima et al. 2009; Redmond et al. 1998; Stapleton et al. 1998). Folgt man der Hypothese, dass Taurin für die Zelle selbst aber auch für die extragranulozytäre Matrix als Radikal- und Substratfänger fungiert und somit einen Schutzfaktor haben könnte, verwundert es nicht, dass Veränderungen des intrazellulären Taurinpools (vor allem eine Reduktion), mit katabolischen und inflammatorischen Geschehen assoziiert werden können (Cassol et al. 2009; Grimm et al. 2001; Marcinkiewicz et al. 1995; Masuda et al. 1984; Mühling et al. 2002, 2005, 2007; Park et al. 2002; Redmond et al. 1998). Wie und in welchem Ausmaß eine Taurindepletion (z. B. im Rahmen einer Diät) oder eine Supplementation (z. B. bei einer medikamentösen Therapie) Auswirkungen auf den intragranulozytären Amino- und  $\alpha$ -Ketosaurenpool hat und ob ein Zusammenhang mit granulozytären Immunfunktionen besteht, ist noch wenig erforscht. (Schuller-Lewis et al. 2004).

## **1.2 Intrazelluläre Aminosäure- und $\alpha$ -Ketosaurenanalytik in polymorphkernigen Granulozyten (PMN)**

Von den ersten Anfängen bis zur Gegenwart war und sind die Methodiken zur intragranulozytären Aminosäurenanalytik großen Veränderungen unterworfen. Kjeldahl und etwas später Slyke waren Ende des vorletzten Jahrhunderts die Vorreiter auf diesem Gebiet. Sie entwickelten die Methode Aminosäuren unspezifisch als Total-Aminostickstoff zu bestimmen (Kjeldahl 1883; Van Slyke 1911,1912). Im Jahr 1912 gelang es Folin und Denis Tyrosin mit Hilfe eines Phenol-Reagenz kalorimetrisch zu bestimmen (Folin et al. 1912). In den folgenden Jahren wurden weitere Aminosäuren durch kalorimetrische Untersuchungen dargestellt, wie Arginin durch die Sakaguchi-Reaktion oder Histidin mit diazotierter Sulfanilinsäure oder auch mit Zuhilfenahme von Bromin (Hanke et al. 1920; Koessler et al. 1919). Erst Anfang der vierziger Jahre war es durch die Verteilungschromatographie mithilfe von Kieselgelsäulen möglich geworden, Phenylalanin, Isoleucin, Leucin, Prolin und Valin zu trennen (Martin et al. 1941). Durch Einsatz von Stärke-Säulen war es sogar unnötig geworden, die Aminosäuren vorher zu derivatisieren (Synge 1944). Der entscheidende Durchbruch in der Aminosäurenanalytik gelang Ende der vierziger Jahre mit dem Einsatz von Ionenaustausch-Harzen und einer kontinuierlichen Detektion des Eluats unter Verwendung von Ninhydrin zur Online-Nachsäulen-Reaktion (postcolumn derivatization) (Moore et al. 1948, 1952). Dadurch konnten selbst aus Plasma, Urin oder Geweben mehr freie Aminosäuren bestimmt werden. Nachteilig waren dennoch die lange Analysezeit (> 42 h/Probe) und die große erforderliche Probenmenge (> 4 ml proteinfreies Filtrat) (Spackmann

et al. 1958). Mitte der sechziger Jahre wurde mit der Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC) ein universell einsetzbares analytisches Instrument entwickelt, welches die Auftrennung verschiedenster Substanzgemische unter Verwendung der Ionenaustausch-, der Absorptions-, der Verteilungs-, der Affinitäts- oder auch Aufschlusschromatographie erlaubt (Horvath 1967; Huber 1969).

Dank Kirkland war es dann im Jahr 1971 möglich, polare und unpolare Aminosäuren gleichzeitig zu trennen (Kirkland 1971). Betrachtet man die Entwicklung der Aminosäureanalytik, so kann man sagen, dass die Analytikprinzipien von Spackmann, Moore und Stein auch heute noch gelten. Jedoch sind nun durch den technischen Fortschritt (z. B. mikroprozessorgesteuerte Gradientenelution und Datenauswertung) nur noch geringe Probenmengen und eine kürzere Analysezeit nötig (Kirkland 2000, Fuchs, Mühling, 1999 + 2003).

Ein weiterer Schritt war es, eine effiziente Methodik zur sicheren Quantifizierung freier intrazellulärer Aminosäuren in Blutzellen zu finden, die einen stoffwechselneutralen Status sowie eine hohe Zellreinheit ohne vorzeitige Zerstörung der Zellintegrität gewährleistet. (al Sawaf et al. 1993; Fürst et al. 1987; Learn et al. 1990; Metcalf 1986). Problematisch ist auch die für die Standardisierung des Aminosäurenmonitoring nötige stoffwechselneutrale PMN-Zelllyse und die weitere Probenvorbereitung (wie z. B. stoffwechselneutrale Lagerung, Schutz vor hydrolytischem Aminosäurenabbau). Auch die daraus resultierende kurze Probenhaltbarkeit vor der Analyse muss beachtet werden (Davis et al. 2009; Fuchs 1998, 1994). Kein Wunder also, dass es an sowohl befriedigenden, als auch an vergleichbaren Ergebnissen mangelt, betrachtet man zusätzlich noch die unterschiedlichen Analysetechniken oder aber auch die unübersichtliche Darstellung der intrazellulären Aminosäurenkonzentrationen (Fuchs 1998). Fast ausschließlich werden der intrazelluläre Aminosäuregehalt bzw. die Aminosäurekonzentrationen in direktem Bezug zu biologischen Parametern gesetzt wie Intrazellulärwasser, intrazellulärer Protein- oder auch DNA-Gehalt (Baron et al. 1969; Carrea et al. 1993; Fürst et al. 1987; Metcalf 1986). Nur einige wenige Studien wählten explizit den Bezug auf das weder direkt noch indirekt beeinflussbare Einzelzell-Niveau (Metcalf et al. 1986, 1987).

Zur Einschätzung anaboler und kataboler Stoffwechselsituationen sind, neben der Bestimmung intrazellulärer Aminosäuren, auch die Veränderungen ihrer ersten Transaminierungs- und Desaminierungsprodukte, nämlich die  $\alpha$ -Ketosäuren, von großer Bedeutung (Fuchs et al. 1994). Zur Evaluierung potentieller nutritiver und immunologischer

Effekte von Einzelaminosäuren wurde L-Taurin (Sigma, Deisenhofen) hinsichtlich seines Einflusses auf den freien Aminosäure- und  $\alpha$ -Ketosäurepool und auf granulozytäre Immunfunktionen untersucht. Ferner wurden zur Überprüfung des spezifischen Einflusses einzelner granulozytärer Aminosäurestoffwechsel- und Signalübertragungswege auf den intrazellulären Aminosäure- und  $\alpha$ -Ketosäurepool und auf granulozytäre Immunfunktionen wurden in der vorliegenden Arbeit auch ein spezieller für den Aminosäuremetabolismus relevanter Stoffwechselmodulator nach möglichen additiven oder sich inhibierenden Effekten getestet. Die Einzelaminosäuren L-Taurin (1 mM) wurden hierzu in Kombination mit dem oben genannten Stoffwechselmodulator  $\beta$ -Ala (10 mM) eingesetzt. Um potentielle Effekte möglichst eindeutig fassen zu können, orientierten sich die gewählten Inkubationszeiten an den signifikanten Stoffwechsel- und Immunfunktionsbefunden der oben beschriebenen Einzeluntersuchungen. Es konnte nachgewiesen werden, dass die von den Aminosäuren Leucin, Isoleucin und Threonin gebildeten  $\alpha$ -Ketosäuren auf das Proteolyse- und das Proteinsynthesegleichgewicht unterschiedlicher Zellen bedeutende stoffwechselregulatorischen Einfluß besitzen. Aber auch Veränderungen der  $\alpha$ -Ketosäuren  $\alpha$ -Ketogluarat, Pyruvat oder auch p-Hydroxy-Phenylpyruvat können bei sehr stoffwechselaktiven Zellen wie beispielsweise den PMN, aufgrund des engen Zusammenspiels des intrazellulären Aminosäurestoffwechsels mit dem zellulären Energiehaushalt wichtige grundlegende Hinweise über die intrazelluläre Rekrutierung energiereicher Substrate liefern (Fuchs et al. 1994; Riedel et al. 1992, 2000). Durch die zuvor beschriebene komplizierte Analysemethodik wurden bis jetzt wenig die möglichen Einflussgrößen auf den intragranulozytären  $\alpha$ -Ketosäurenstoffwechsel untersucht, da zur Zeit nur einzelne Analysemodelle für intragranulozytären  $\alpha$ -Ketosäuren in menschlichen polymorphkernigen Granulozyten vorliegen, sondern ausschließlich für extrazelluläre  $\alpha$ -Ketosäuren ( $\alpha$ -Ketosäuren-quantifizierung im Plasma) (Fuchs et al. 1994; Reidel et al. 1992).

### 1.3 Zielsetzung und Fragestellungen

Wie zuvor erläutert, ergeben sich dabei die folgenden Fragestellungen:

1. Welchen immunonutritiven Einfluß besitzt die Einzelaminosäure Taurin auf die intragranulozytären Amino- und  $\alpha$ -Ketosäurepools sowie auf ausgewählte granulozytäre Immunfunktionen? Werden potentielle Effekte dosis- aber auch expositionszeitabhängig induziert? Kann durch eine Modulation speziell ausgewählter Aminosäurestoffwechselprozesse auf spezifische immunonutritive Einzeleffekte der verwendeten Substanzen geschlossen werden?
2. Kann die parallele Applikation von Taurin mit einem spezifischen zellulären Stoffwechselmodulator wie das  $\beta$ -Alanin zu essentiellen Veränderung der intragranulozytären Stoffwechsel- und Signalübertragungswege führen? Ergeben sich mögliche additive oder inhibierende Effekte?

---

## 2 MATERIAL UND METHODIK

### 2.1 Hochselektive Separation von PMN aus Vollblut

Die verwendeten Methoden zur hochselektiven Separation vitaler PMN aus menschlichem Vollblut sind signifikante Weiterentwicklungen der von Eggleton et al. (Eggleton et al. 1989) sowie Krumholz und Mitarbeitern (Krumholz 1991) beschriebenen Verfahren. Die Extraktion der PMN aus Vollblut erfolgte hierbei mittels eines gekühlten (4°C) Percoll®-Gradienten (Pharmacia, Uppsala, Schweden). Direkt nach Blutentnahme (Bestimmung der Referenzbereiche der primären Aminosäure- sowie  $\alpha$ -Ketosäurekonzentrationen in PMN) bzw. im unmittelbaren Anschluß an die nachfolgend beschriebenen Inkubationsverfahren (siehe Methodikteil 2.5) wurden jeweils 4 ml der heparinisierten Vollblutproben (10 I.E. Heparin-Natrium/ml) auf einen mit 0,9%-iger NaCl-Lösung vorbereiteten sowie auf 4°C gekühlten 55%:70%igen Percoll®-Gradienten überschichtet und anschließend 15 Minuten (350 x g, 4 °C) zentrifugiert (Biofuge®, Heraeus, Hanau).

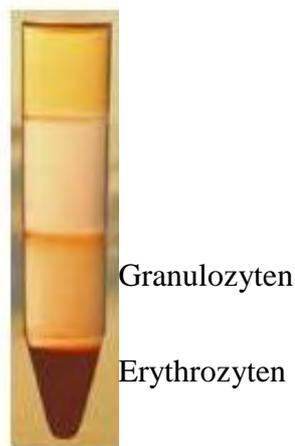


Abb. 3: Quelle: geocities/centrifugacion

Nach Auftrennung der Zellfraktionen wurden die PMN aus der Probe entnommen (Sterican® 20G; B. Braun, Melsungen) und mit 10 ml gekühltem (4°C) sowie vorher 1:10 verdünntem PBS®-Puffer [10x (w/o  $\text{Ca}^{2+}$ /  $\text{Mg}^{2+}$ ) Gibco, Karlsruhe] resuspendiert. Nach einer weiteren Zentrifugation (350 x g, 5 Minuten, 4°C) wurde der PBS-Puffer verworfen und die in der Probe verbliebenen Erythrozyten mittels 2 ml gekühltem (4°C) Aqua destillata (Pharmacia, Uppsala, Schweden) hämolysiert. Nach exakt 20 Sekunden erfolgte durch Applikation von

1 ml 2,7%-iger NaCl-Lösung (Merck, Darmstadt) eine Re-Isotonisierung der Probe, die direkt anschließend erneut mit verdünntem PBS-Puffer auf 10 ml aufgefüllt wurde. Nach einer weiteren Zentrifugation (350 x g, 5 Minuten, 4°C) wurde der PBS-Puffer-Überstand erneut verworfen, die verbliebene PMN-Suspension homogenisiert (Rüttelmixer) und anschließend 2 Aliquots zur lichtmikroskopischen Kontrolle (Zeiss, Oberkochen) der Anzahl und Reinheit (Neubauer-Zählkammer; Färbung mit Türks-Lösung<sup>®</sup>, Merck, Darmstadt) sowie auch der Vitalität (Färbung mit Trypanblau<sup>®</sup>, Merck, Darmstadt) der in der Probe vorhandenen PMN entnommen (Gitter et al. 1978). Proben mit einem PMN-Reinheitsgehalt <96% bzw. solche mit >4% avitalen PMN wurden verworfen. Unmittelbar nach Entnahme und Aufbereitung wurden die entnommenen und gekühlten PMN-Proben bei -20°C eingefroren und anschließend zur kurzfristigen Lagerung (Aminosäureproben <4 Wochen;  $\alpha$ -Ketosäureproben <2 Wochen) bei -80°C tiefgefroren. Im weiteren Verlauf wurden die PMN-Proben einem so genannten Lyophilisierungsverfahren (Gefriertrocknung unter Hochvakuum bei -80°C, CIT-2<sup>®</sup>, Heraeus, Hanau) unterzogen. Die Lyophilisierung ermöglichte zum einen die schonende nicht chemisch vermittelte PMN-Zelllyse sowie die längerfristige Lagerfähigkeit der Proben. Die Qualität der PMN-Zelllyse mittels Lyophilisierung wurde darüber hinaus bei Einrichtung der vorliegenden Aminosäureanalytikverfahren mit einem standardisierten aminosäure- und proteinschonenden Zelllyseverfahren (Hippenstiel et al. 1998; Krüll et al. 1999) verglichen [Lysepuffer nach Laemmli et al.: 20 mM HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazino)-Ethansulfonsäure; pH 7,4), 100 mM NaF, 2 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 15 mM Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, 1 mM PMSF, 2  $\mu$ g/ml, Leupeptin, 2  $\mu$ g/ml Pepstatin, 2  $\mu$ g/ml Antipain, 10  $\mu$ l Triton x-100 1%; (Roth, Karlsruhe; Merck, Darmstadt; Sigma, Deisenhofen), n= 40]. Die so vorbereiteten Proben wurden anschließend bis zur weiteren Analyse im Rahmen der Fluoreszenz-HPLC lichtgeschützt bei -80°C gelagert (Proben primärer Aminosäuren < 6 Monate,  $\alpha$ -Ketosäureproben < 4 Wochen).

## **2.2 Bestimmung plasmatischer und freier intrazellulärer Aminosäuren im PMN mittels Hochauflösender Fluoreszenz-Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie (F-HPLC)**

Die Analytik zur exakten Quantifizierung des intrazellulären Gehaltes primärer Aminosäuren in menschlichen polymorphkernigen Granulozyten (PMN) bis auf Einzelzellniveau wurde für die vorliegenden Untersuchungen völlig neu entwickelt wie ebenso präzise standardisiert und validiert. Die verwendeten Methodiken sind signifikante Weiterentwicklungen der von Fuchs et al. (1998) und Riedel et al. (1989; 1992) zur Bestimmung primärer Aminosäuren im Plasma beschriebenen Analytikverfahren.

### **2.2.1 Puffer, Lösungen und Reagenzien zur Probenvorbereitung und Fluoreszenz-Derivatisierung**

#### **2.2.1.1 Standardextraktionspuffer (primäre Aminosäuren)**

Der so genannte Standardextraktionspuffer (SEP) diente zur Resuspendierung der bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingelagerten und lyophilisierten Standard- und PMN-Proben. Der SEP bestand aus einem Gemisch von 80% Methanol für die HPLC und 20%  $\text{H}_2\text{O}$  für die HPLC (beide Merck, Darmstadt), der zusätzlich zur internen Standardisierung der Analytik das in physiologischen Aminosäuregemischen nicht vorkommende Homoserin (Sigma, Deisenhofen) in einer Konzentration von  $4\ \mu\text{g/ml}$  beinhaltete. Darüber hinaus gewährleistete der Standardextraktionspuffer die kurzfristige Lagerungsfähigkeit der resuspendierten Aminosäurelyophilisate im Rahmen der sich anschließenden automatisierten Vorsäulen-Derivatisierung („chemische Konservierung“ für wenigstens 55-60 Stunden) (Fuchs et al. 1998). Die gefriergetrockneten primären Aminosäurestandard-, Plasma- und PMN-Proben wurden mittels  $280\ \mu\text{l}$  dieses Standardextraktionspuffers resuspendiert.

### 2.2.1.2 Externe Aminosäurestandardproben (primäre Aminosäuren)

Zur externen Standardisierung und Kalibrierung der Aminosäureanalytik kamen eigene Aminosäurestandardproben in physiologischer NaCl-Konzentration unter Verwendung analysereiner Reagenzien und Lösungen zur Anwendung (Sigma, Deisenhofen). Den Standardproben wurde zusätzlich humanes Serumalbumin (4%; Merck, Darmstadt) zugemischt. Folgende Einwaagen wurden in jeweils 20 ml 0,9%-iger NaCl-Lösung (Merck, Darmstadt) vorgenommen:

- Lösung 1:** 2 mg: Tyrosin (Tyr)
- Lösung 2:** 10 mg: Valin (Val)  
je 20 mg: Glutamin (Gln), Threonin (Thr)  
50 mg: Ornithin (Orn)
- Lösung 3:** je 20 mg: Glutaminsäure (Glu), Alanin (Ala), Phenylalanin (Phe)  
je 50 mg: Histidin (His), Lysin (Lys)
- Lösung 4:** 10 mg: Isoleucin (Ile)  
je 20 mg: Asparagin (Asn), Citrullin (Cit), Taurin (Tau)  
 $\alpha$ -Aminobuttersäure (Aba)  
40 mg: Tryptophan (Trp)
- Lösung 5:** 10 mg: Leucin (Leu)  
je 20 mg: Serin (Ser), Glycin (Gly), Methionin (Met), Asparaginsäure (Asp)  
Hypotaurin (H-Tau)  
50 mg: Arginin (Arg)

4 ml der Lösung 1 und je 400  $\mu$ l der Lösungen 2-5 wurden vereinigt und 800 mg humanes Serumalbumin (Merck, Darmstadt) dazugegeben und gelöst. Anschließend wurden jeweils 200  $\mu$ l dieser Stammlösung in Eppendorfgefäße gefüllt und zunächst bei -20°C eingefroren. Direkt im Anschluss wurden die bei -20°C eingefrorenen Standardproben bei -80°C zwischengelagert und am nächsten Tag dem oben beschriebenen Lyophilisierungsverfahren unterzogen und bei -80°C eingelagert (Lagerzeit: < 6 Monate).

### **2.2.1.3 Boratpuffer**

Die reproduzierbare und vollständige Bildung von Isoindol-Derivaten aus primären Aminosäuren erfolgte im alkalischen Medium (pH 9,5). Die Vorbereitung zur Fluoreszenzmarkierung im Rahmen der automatisierten Vorsäulenderivatisierung wurde mittels eines speziell hergestellten Boratpuffers durchgeführt. Hierzu wurden 5,03 g Tetraborat (Merck, Darmstadt) durch 5-minütiges Kochen bei 100°C in 200 ml „H<sub>2</sub>O für die HPLC“ gelöst und nach Abkühlen der Lösung mittels HCl- bzw. NaOH-Lösungen auf einen pH-Wert von exakt 9,5 eingestellt. 5-minütiges Kochen gewährleistet hierbei reproduzierbare Pufferkapazitäten (Fuchs et al. 1998). Dieser Boratpuffer wurde lichtgeschützt bei 20°C eingelagert und war unter diesen Bedingungen mindestens 3 Monate haltbar.

### **2.2.1.4 o-Phtaldialdehyd-Mercaptoethanol-Reagenz (OPA)**

Zur Fluoreszenzmarkierung der primären Aminosäuren im Rahmen der automatisierten Vorsäulenderivatisierung wurde o-Phtaldialdehyd-Mercaptoethanol-Reagenz (OPA-Thiol-Reagenz) verwendet. Zur Herstellung des OPA-Thiol-Reagenz wurden 100 mg o-Phtaldialdehyd (Merck, Darmstadt) in 9 ml Methanol für die HPLC vollständig gelöst und 1 ml des Boratpuffers (siehe oben) sowie 100 µl 2-Mercaptoethanol (Merck, Darmstadt) dazugegeben. Dieses OPA-Thiol-Reagenz wurde vor jeder Fluoreszenz-HPLC-Aminosäureanalyse frisch hergestellt und bis zum Analysenbeginn bei 4°C zwischengelagert. Die Haltbarkeit des OPA-Thiol-Reagenz bei Raumtemperatur beträgt hierbei mindestens 3 Tage (Fuchs et al. 1998).

### **2.2.1.5 HCl-Lösung (0,75 N)**

Um die Stabilität der im alkalischen Medium fluoreszenzmarkierten primären Aminosäuren zu gewährleisten wie auch die Stabilität des Säulenmaterials zu schonen, wurden die Fluoreszenzderivate im Rahmen der automatisierten Vorsäulenderivatisierung mittels 0,75 N HCl auf pH-Werte von durchschnittlich 7,3-7,4 abgepuffert. Hierzu wurde 1 N HCl-Lösung (Merck, Darmstadt) mittels H<sub>2</sub>O für die HPLC zu einer 0,75 N HCl-Lösung verdünnt. Da die Pufferkapazität des Boratpuffers von der Auflösungstemperatur abhängt, konnte im automatisierten Analysenschritt bei der Titration mittels 0,1 N HCl eine reproduzierbare Neutralisation und somit reproduzierbare pH-Werte ( $7,4 \pm 0,15$ ) gewährleistet werden.

### **2.2.1.6 Methanol-Natriumacetatpuffer**

Zur optimalen Trennung des komplexen OPA-Thiol-Aminosäurederivatgemisches wurde ein binäres Eluentensystem aus Methanol/Acetatpuffer verwendet. Es wurde zunächst mit H<sub>2</sub>O für die HPLC eine 0,5 M Acetatlösung hergestellt und diese mittels 6M HCl auf einen pH-Wert von 7,2 eingestellt. Dieser 0,5 M Acetatpuffer war dann lichtgeschützt bei 20°C unbegrenzt lagerbar. Unmittelbar vor der Methanolzugabe wurde dieser Puffer mit H<sub>2</sub>O für die HPLC 1:10 verdünnt (= 0,05 M Acetatpuffer) und Methanol für die HPLC dazugegeben. Folgende Elutionspuffer kamen zur Anwendung:

Elutionspuffer A: 19% Methanol und 81% 0,05 M Acetatpuffer

Elutionspuffer B: 75% Methanol und 25% 0,05 M Acetatpuffer

### **2.2.1.7 HPLC- Spüllösung**

Als Wasch- und Spüllösung zur Reinigung des gesamten Systems sowie der Probenschleife und Injektionsnadel des Autosamplers wurde eine Lösung bestehend aus 50% Methanol für die HPLC sowie 50% H<sub>2</sub>O für die HPLC angewendet. Nach Vermischen wurde diese Lösung über einen Zeitraum von 15 Minuten mittels Ultraschall (Sonorex Super RK 103<sup>®</sup>, Bandelin, Berlin) entgast.

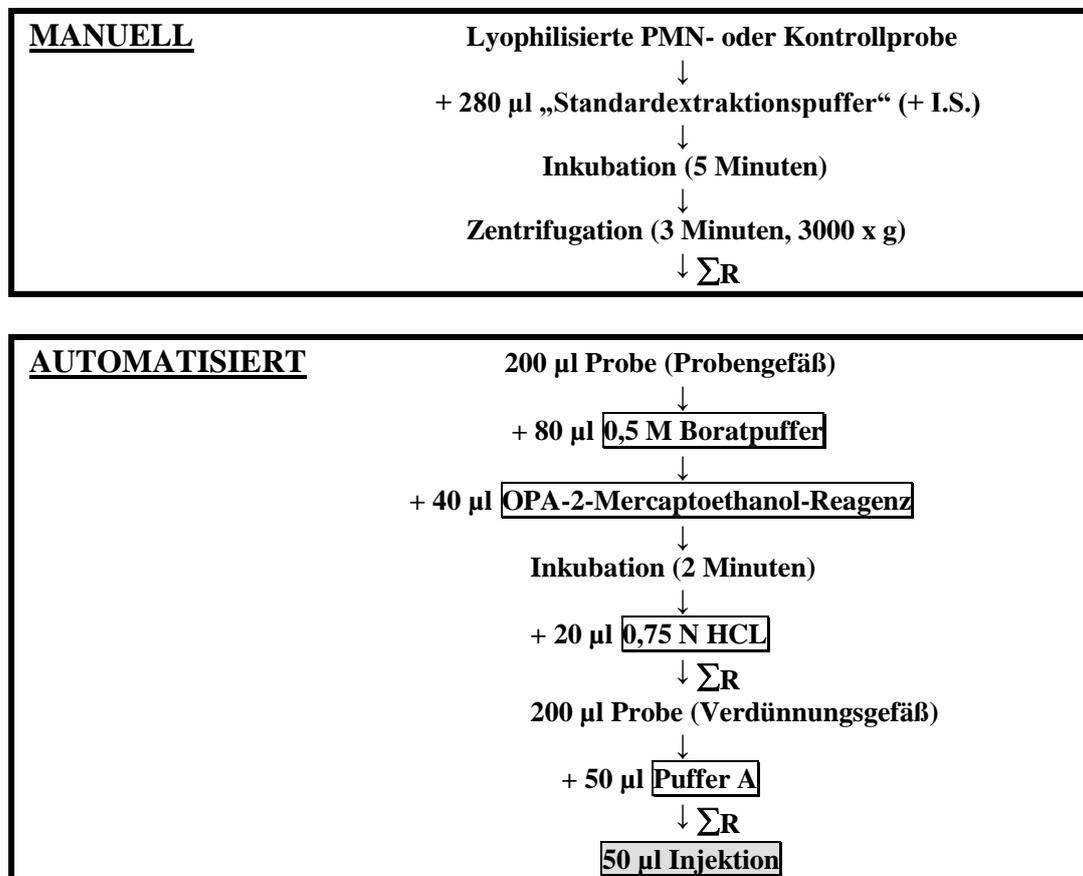
### 2.2.2 Geräteanforderung: Fluoreszenz-Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie

Die Fluoreszenz-Hochdruck-Flüssigkeits-chromatographische Analytik von primären Aminosäuren und  $\alpha$ -Ketosäuren erforderte folgende Gerätekonfiguration:

1. Eine hydrostatische Gradientenpumpe mit angeschlossener Kontrolleinheit zur Gradientenprogrammierung (600 E<sup>®</sup>, Waters, U.S.A.).
2. Ein 3-Kanal-Degaser (Knauer, Berlin) zur kontinuierlichen Entgasung der Elutionspuffer.
3. Eine programmierbare Autosampler-Pipettiereinheit (Triathlon<sup>®</sup>, Spark, Holland) mit integriertem Rheodyne-Injektionsventil und daran angeschlossener 100  $\mu$ l fassender Probenschleife (AS 300<sup>®</sup>, Sunchrom, Friedrichsdorf) zur automatisierten Vorsäulenderivatisierung.
4. Eine Reversed-Phase F-HPLC-Trennsäule (Nova Pak RP-C-18<sup>®</sup>, 300 x 3,9 mm, I.D.; 60 Å, 4  $\mu$ m; Waters, U.S.A.).
5. Ein Säulenofen (Knauer, Berlin) zur kontinuierlichen Temperierung der Trennsäule (35°C) während der Analytik.
6. Ein Fluoreszenzspektrometer (RF-530<sup>®</sup>, Shimadzu, Kyoto, Japan).
7. Eine Interfacebox (Knauer, Berlin) zur digitalen Umwandlung der analog vom Fluoreszenzspektrometer aufgenommenen Daten.
8. Eine computergestützte Meßwerterfassung und Datenauswertung (Compaq, U.S.A.) unter Zuhilfenahme einer speziell für Aminosäurechromatogramme aus biologischen Proben entwickelten Integrationssoftware (EuroChrom 2000 für Windows<sup>®</sup>, Version 1,65; Knauer, Berlin).

### 2.2.3 Automatisierte Vorsäulen-Derivatisierung

Wie aus dem nachfolgend aufgeführten Schema zu ersehen ist (Tabelle 1), wurden die lyophilisierten Proben vor der Vorsäulenderivatisierung manuell durch Aufpipettieren von



**Tabelle 1:** Pipettierschema der automatisierten OPA-Thiol-Fluoreszenz-Vorsäulenderivatisierung. (R= Verwerfen;   = als Reagenz im Autosampler bereitstellen).

Standardextraktionspuffer gelöst und so ein methanolischer Extrakt der Probe hergestellt. Nach Inkubation und Zentrifugation (Rotixa/ KS<sup>®</sup>, Tuttlingen) wurde die Probe in ein spezielles Probengefäß überführt (2-CRV<sup>®</sup>, Chromacoll, Trumbull, U.S.A), nachfolgend (200 µl Extrakt) automatisiert mit 0,5 M Boratpuffer basisch gepuffert (pH= 9,5), OPA-Thiol-Reagenz zugesetzt und die Derivatisierung nach exakt 120 Sekunden durch Neutralisierung mittels 0,75 N HCL gestoppt (pH ≈ 7,2). Dieser Ansatz wurde weiterhin mit dem Elutionspuffer A 1:4 verdünnt und 50 µl dieser Lösung in das System injiziert.

## 2.2.4 Gradienten

Nach sorgfältiger Äquilibration der Analytik ( $\geq 4$  h) erfolgte die Gradientenelution wie in Tabelle 2 beschrieben.

<b>Gradientenzeitverläufe (primäre Aminosäuren)</b>		
<b>Zeit [min]</b>	<b>Puffer A</b>	<b>Puffer B</b>
<b>0</b>	<b>97</b>	<b>3</b>
<b>3</b>	<b>97</b>	<b>3</b>
<b>3,1</b>	<b>100</b>	<b>0</b>
<b>37</b>	<b>70</b>	<b>30</b>
<b>63</b>	<b>0</b>	<b>100</b>
<b>67</b>	<b>97</b>	<b>3</b>

<b>Puffer A:</b>	19% Methanol/ 81% 0,05 M Acetat, pH 7,2
<b>Puffer B:</b>	75% Methanol/ 25% 0,05 M Acetat, pH 7,2
<b>Flußrate:</b>	1 ml/min
<b>Druck:</b>	2900 PSI* $\pm$ 150 PSI* (A: 97%/ B: 3%)
<b>Fluoreszenzdetektion:</b>	Anregungswellenlänge: 330 nm Emissionswellenlänge: 450 nm

**Tabelle 2:** Elutionsbedingungen des binären Gradientenelutionssystems zur Analyse freier primärer Aminosäuren. Zur Verwendung kamen 2 vorgemischte Methanol-Acetat-Puffer. \*1 PSI = 6894,76 Pa.

Zur Verwendung kam ein binäres Eluentensystem mit Methanol-Acetat (0,05 M)-Puffern. Die Elutionspuffer wurden mit einer Flußrate nach den in Tabelle 2 beschriebenen Mischungsverhältnissen in das Fluoreszenz-HPLC-System eingespeist. Die von der Gradientenpumpe erzeugte Flußrate betrug  $1 \text{ ml} \times \text{min}^{-1}$ , der aufgrund dieser Flußrate im System entstehende Arbeitsdruck, je nach Puffer-Mischungsverhältnis, zwischen 2900 und 3500 PSI. Die zur Fluoreszenzdetektion primärer Aminosäuren verwendete Anregungswellenlänge betrug 330 nm, die Emissionswellenlänge 450 nm.

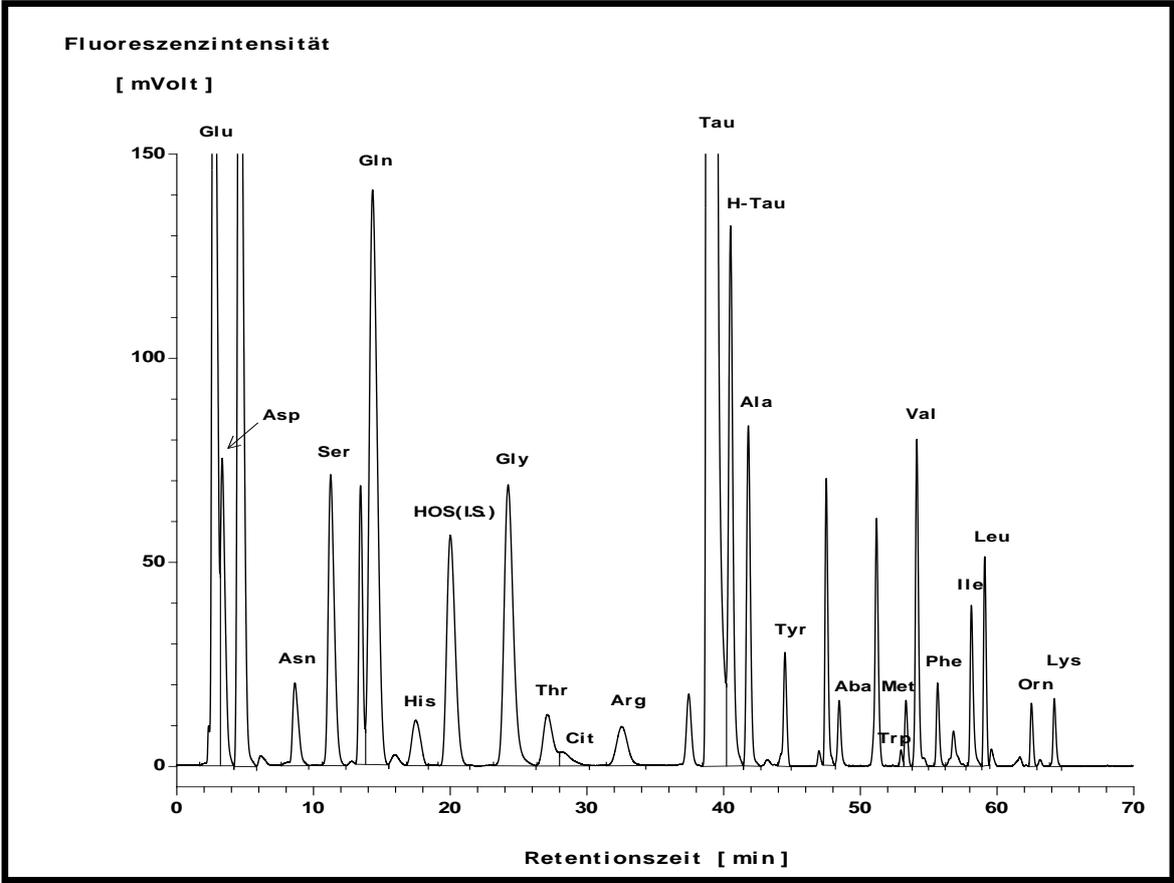


Abb. 4: Typisches Elutionsprofil einer mittels OPA vorsäulenderivatisierten PMN-Probe.

## 2.3 Bestimmung plasmatischer und freier intrazellulärer $\alpha$ -Ketosäuren in PMN mittels hochauflösender f-HPLC

Wie in den Zielsetzungen der Arbeit angesprochen, wurde neben der exakten Quantifizierung des intrazellulären Gehalts primärer Aminosäuren in menschlichen polymorphkernigen Granulozyten zum ersten Mal eine exakte Analytik zur Bestimmung von stoffwechselrelevanten intragranulozytären  $\alpha$ -Ketosäuren neu entwickelt, präzise standardisiert, validiert und die eingangs gesetzten Fragestellungen untersucht. Die Analytik erlaubt ebenfalls erstmals eine genaue Quantifizierung des intragranulozytären  $\alpha$ -Ketosäuregehaltes bis auf Einzelzellniveau. Die hier neu entwickelte Methodik ist eine signifikante Weiterentwicklung der von Farshidfar (1990) und Riedel et al. (1989; 1992) bei plasmatischen  $\alpha$ -Ketosäuren beschriebenen Analytikverfahren.

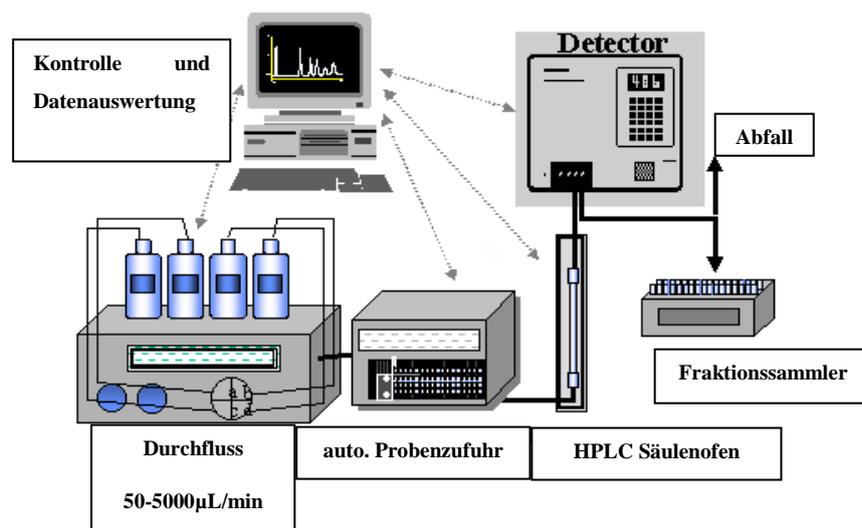


Abb. 5: Versuchsaufbau einer HPLC/Quelle: Shula Levin's Internetseite von HPLC und LC-MS

## 2.3.1 Puffer, Lösungen und Reagenzien zur Probenvorbereitung und Fluoreszenz Derivatisierung

### 2.3.1.1 Standardextraktionspuffer für die $\alpha$ -Ketosäureanalytik (SEP-KS)

Als interner Standard wurde die in physiologischen Gemischen nicht vorkommende  $\alpha$ -Ketosäure  $\alpha$ -Ketovalerianat (Sigma, Deisenhofen) verwendet. Zunächst wurde das in flüssiger Form hochkonzentriert vorliegende  $\alpha$ -Ketovalerianat (116  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) mittels  $\text{H}_2\text{O}$  für HPLC weiterverdünnt und 200  $\mu\text{l}$  dieser verdünnten Lösung ( $\alpha$ -Ketovalerianatkonzentration: 2,322  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) mit 3,8 ml Methanol versetzt und vermischt. Die gefriergetrockneten  $\alpha$ -Ketosäurestandard-, Plasma- wie aber auch die PMN-Proben wurden mittels 250  $\mu\text{l}$  dieses Standardextraktionspuffers resuspendiert.

### 2.3.1.2 Externe $\alpha$ -Ketosäurestandardproben

Zur externen Standardisierung und Kalibrierung der  $\alpha$ -Ketosäureanalytik kamen eigene  $\alpha$ -Ketosäurestandardproben in physiologischer NaCl-Konzentration unter Verwendung analysereiner Reagenzien und Lösungen zur Anwendung (Sigma, Deisenhofen). Den Standardproben wurde zusätzlich humanes Serumalbumin (4%; Merck, Darmstadt) zugemischt. Folgende Einwaagen wurden in jeweils 20 ml NaCl für die HPLC vorgenommen:

**Lösung 1:** 20 mg:  $\alpha$ -Ketoglutarat (KG)

**Lösung 2:** je 20 mg: Pyruvat (PYR),  $\alpha$ -Ketobutytrat (KB)

**Lösung 3:** je 20 mg:  $\alpha$ -Ketoisovalerianat (KIV),  $\alpha$ -Ketoisocapronat (KIC), Phenylpyruvat (PhePYR),  $\alpha$ -Keto- $\beta$ -methylvalerianat (KMV)

240  $\mu\text{l}$  der Lösung 1 und je 120  $\mu\text{l}$  der Lösungen 2 und 50  $\mu\text{l}$  der Lösung 3 wurden mit 19,59 ml NaCl vereinigt ( $\Sigma = 20$  ml) und 800 mg humanes Serumalbumin (Merck, Darmstadt) dazugegeben und gelöst. Anschließend wurden jeweils 50  $\mu\text{l}$  dieser Stammlösung in Eppendorfgefäße gefüllt und zunächst bei  $-20^\circ\text{C}$  eingefroren. Direkt im Anschluß wurden die bei  $-20^\circ\text{C}$  eingefrorenen Standardproben bei  $-80^\circ\text{C}$  tiefgefroren und am nächsten Tag einer Lyophilisierung unterzogen und wiederum bei  $-80^\circ\text{C}$  eingelagert (Lagerzeit: < 4 Wochen).

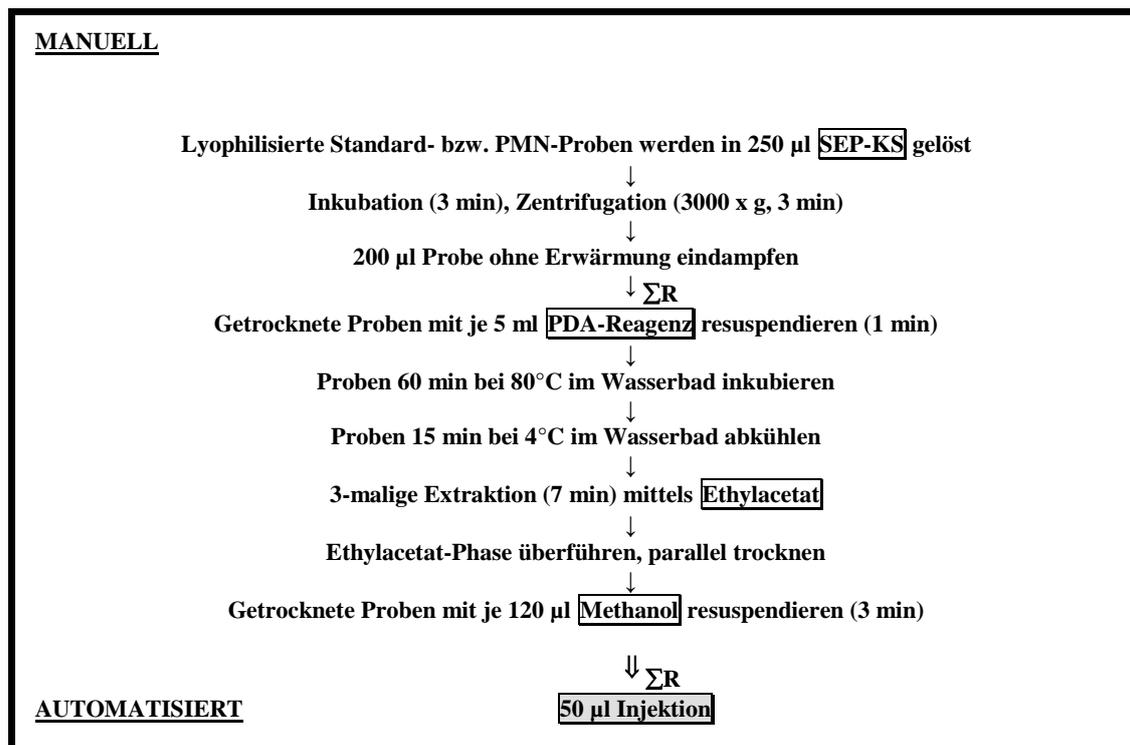
### 2.3.1.3 o-Phenyldiaminreagenz (PDA)

Zur Fluoreszenzmarkierung der  $\alpha$ -Ketosäuren wurde das sehr oxidations-empfindliche o-Phenyldiamin (Sigma, Deisenhofen) verwendet. Da oxidative Veränderungen dieses Moleküls als Verunreinigungen die Analytik erheblich beeinträchtigen können (Fluoreszenzstöktivität im zu untersuchenden Spektrum), musste das käuflich erworbene o-Phenyldiamin, welches selbst analysenrein nur in brauner (= oxidiertes) Kristallform vorlag, zunächst umkristallisiert werden. Diese chemische Umwandlung wurde im Institut für Organische Chemie der Justus-Liebig-Universität vorgenommen. Die Umkristallisation erfolgte nach Lösen von o-Phenyldiamin in Heptan bei 100-120°C (Ölbad, Merck, Darmstadt) und anschließendem Verdampfen des Moleküls in einem Rotationsverdampfer (Merck, Darmstadt). Das so umkristallisierte und anschließend getrocknete o-Phenyldiamin (weiße Kristalle) wurde nun unter Stickstoffbegasung (Messer, Griesheim) luftdicht verpackt und war so bei 4°C und unter Lichtabschluß mehrere Monate chemisch stabil. Unmittelbar vor der Probenaufbereitung erfolgte die Herstellung des o-Phenyldiaminreagenz. Hierzu wurden pro zu untersuchender Meßprobe 5 mg o-Phenyldiamin in 5 ml 3 M HCl (Sigma, Deisenhofen) gelöst und anschließend 10  $\mu$ l 2-Mercaptoethanol (Sigma, Deisenhofen) hinzupipettiert. Diese Lösung war lichtgeschützt bei Raumtemperatur bis zu 6 Stunden stabil lagerbar.

### 2.3.2 Pipettierschema der PDA-Reagenz-vermittelten halbautomatischen $\alpha$ -Ketosäure-derivatisierung

Wie aus dem nachfolgend dargestellten Pipettierschema zu ersehen ist (Tabelle 3), wurden zur Probenvorbereitung vor der Fluoreszenz-HPLC-Analytik die lyophilisierten Proben (Standard- bzw. PMN-Proben) in 250  $\mu$ l Standardextraktionspuffer für  $\alpha$ -Ketosäureanalytik (SEP-KS) resuspendiert. Nach 3-minütiger Inkubation (Rüttelmixer, Eppendorf, Hamburg) und 3-minütiger Zentrifugation (3000 x g, Rotixa KS<sup>®</sup>, Tuttlingen) wurden von jeder Probe 200  $\mu$ l Überstand abpipettiert und in Glasgefäße (10 ml, Knauer, Berlin) überführt. Anschließend erfolgte ein Eindampfen des Methanols unter Stickstoff (Messer, Griesheim), bis die Probe vollständig getrocknet war und sich ein weißer Niederschlag bildete. Dies erfolgte bei den PMN-Proben im Durchschnitt nach ca.  $8 \pm 2$  Minuten. Jede getrocknete Probe wurde anschließend mit je 5 ml PDA-Reagenz resuspendiert (Ika-Vibrax<sup>®</sup>, Merck) und danach 60 Minuten bei 80°C in einem Wasserbad mit prozessorgesteuerter Temperaturkontrolle (Sigma,

Deisenhofen) inkubiert. Nach der Inkubation erfolgte eine 15-minütige Abkühlung der Proben bei 4°C. Danach wurden alle Proben einem 3-maligen Extraktionsverfahren mittels Essigsäureethylester (Ethylacetat, Merck, Darmstadt) unterzogen (7 Minuten, Überkopfmischer, Merck, Darmstadt), die Essigsäureethylester-Phasen danach abpipettiert und unter Stickstoffzufuhr (Messer, Griesheim) eingedampft und damit vollständig getrocknet. Mit dem Eindampfen des Essigsäureethylester bzw. dem Trocknen der Probe wurde direkt nach der 1. Essigsäureethylesterextraktion begonnen. Das zweite Trocknungsverfahren benötigte im Durchschnitt ca.  $43 \pm 7$  Minuten, um alle 3 Essigsäureethylesterphasen vollständig aus der Probe zu entfernen.



**Tabelle 3:** Pipettierschema der manuellen o-Phenyldiamin-2-Mercaptoethanol-Fluoreszenz-Vorsäulenderivatisierung (R= Verwerfen;  = als vorbereitetes Analysereagenz bereitstellen).

Nach vollzogener Probentrocknung wurden diese mittels 120 µl Methanol resuspendiert und anschließend bis zur weiteren Aufbereitung in der Fluoreszenz-HPLC-Analytik bei -20°C gelagert (<1 h). Jeweils 50 µl methanolischer Extrakt einer Probe wurden der Fluoreszenz-HPLC-Analytik zugeführt.

### 2.3.3 Gradienten

Nach sorgfältiger Äquilibration der Analytik ( $\geq 4$  h) erfolgte die Gradientenelution wie in Tabelle 4 beschrieben. Zur Verwendung kam, analog zu der Analytik freier Aminosäuren, ein binäres Eluentensystem mit Methanol-Acetatpuffern. Die verwendeten Acetatpuffer bzw. Spüllösungen waren mit denen unter 2.2.1.6 und 2.2.1.7 beschriebenen kongruent. Die hier dargestellte Fluoreszenz-HPLC-Analytik entspricht hinsichtlich der Geräteanforderungen der im Methodikteil unter 2.2.2 beschriebenen Konfiguration. Wie bei den primären Aminosäuren gelangte ebenfalls eine Nova-Pak®-Säule zur Anwendung (RP-C-18; 300 x 3,9 mm I.D.; 60 Å, 4 µm; Waters, U.S.A.). Die von der Gradientenpumpe erzeugte Flußrate betrug 1 ml/min. Der aufgrund dieser Flußrate im System entstehende Arbeitsdruck lag, je nach Puffer-Mischungsverhältnis, zwischen 3100 und 3500 PSI. Die zur Fluoreszenzdetektion verwendete Anregungswellenlänge betrug 360 nm, die Emissionswellenlänge 415 nm.

Gradientenzeitverläufe ( $\alpha$ -Ketosäuren)		
Zeit [min]	Puffer A	Puffer B
0	80	20
1	53	47
16	33	67
26	33	67
30	80	20

**Puffer A:** 19% Methanol/ 81% 0,05 M Acetat, pH 7,2  
**Puffer B:** 75% Methanol/ 25% 0,05 M Acetat, pH 7,2  
**Flußrate:** 1 ml/min  
**Druck:** 3100 PSI\*  $\pm$  150 PSI\* (A: 80%/ B: 20%)  
**Fluoreszenzdetektion:** Anregungswellenlänge: 360 nm  
 Emissionswellenlänge: 415 nm

**Tabelle 4:** Elutionsbedingungen des binären Gradientenelutionssystems zur Analyse freier intragranulozytärer  $\alpha$ -Ketosäuren. Zur Verwendung kamen 2 vorgemischte Methanol-Acetat-Puffer. \*1 PSI = 6894,76 Pa.

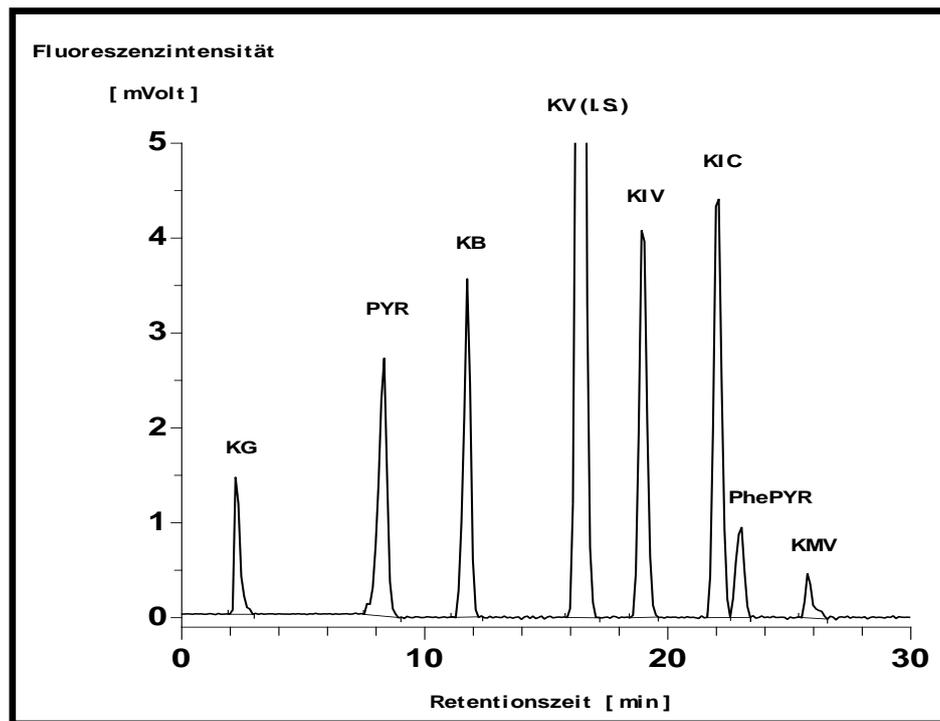


Abb. 6: Typisches Elutionsprofil einer mittels PDA vorsäulenderivatisierten PMN-Probe.

## 2.4 Bestimmung der granulozytären Superoxidation- ( $O_2^-$ ) und Wasserstoffperoxidbildung ( $H_2O_2$ ) sowie der Aktivität der von PMN freigesetzten Myeloperoxidase (MPO)

Die verwendeten Methodiken zur Bestimmung der granulozytären Superoxidation- und Wasserstoffperoxidbildung sowie die Quantifizierung der von PMN freigesetzten Myeloperoxidaseaktivität vitaler PMN waren Weiterentwicklungen der von Weening et al. (1975), Stangel et al. (1986), Pick und Keisari (Pick et al. 1980), Schmitt et al. (1986) sowie Krumholz und Mitarbeitern (Krumholz et al. 1991; 1993; 1995) beschriebenen Analytikverfahren. Um auszuschließen, dass es bei den photometrischen Immunfunktionsmethodiken nicht zu einer die Messungen verfälschenden Reaktion zwischen den zu untersuchenden Testsubstanzen und den erforderlichen Nachweisreagenzien kam, wurden Vorversuche mit zellfreien Ansätzen durchgeführt. Hierbei waren bei keiner der untersuchten Substanzen deletäre Effekte nachweisbar.

#### **2.4.1 Bestimmung der granulozytären Superoxidationbildung nach hochselektiver Separation von PMN aus menschlichem Vollblut**

Diese Methodik beruht im Wesentlichen auf der Reduktion von Cytochrom C durch Superoxidation. Zu diesem Zweck wurden vorbereitend 100 mg Cytochrom C (Typ IV; Sigma, Deisenhofen) in 30 ml PBS<sup>®</sup>-Puffer (Phosphate buffered saline; Gibco, Karlsruhe) gelöst und nach Portionierung (250 µl) bei einer Temperatur von -20°C eingefroren. Zur Stimulation der Granulozyten diente voropsoniertes Zymosan (Sigma, Deisenhofen), welches wir nach Inkubation (37°C, 30 min, Schüttelwasserbad) von 100 mg Zymosan mit 6 ml gepooltem AB-Serum gewannen. Nach 2-maligem Waschen in 0,9%-iger NaCl-Lösung und anschließender Zentrifugation (350 x g, 10 min) wurde das opsonierte Zymosan in 10 ml PBS<sup>®</sup>-Puffer resuspendiert, portioniert (500 µl) und bei -20°C eingefroren. Nach Inkubation der Vollblutproben mit den zu untersuchenden Testsubstanzen (siehe Methodikteil unter 2.5) wurden die PMN mittels einer Modifikation des unter 2.1 beschriebenen PMN-Separationsverfahrens isoliert. Im Anschluß an die Überschichtung des vorbereiteten Percoll-Gradienten (55%/70%) und schrittweisen Zentrifugationen (15 und 5 min; 20°C, 350 x g) wurden die in der Probe verbliebenen Erythrozyten mittels 2 ml Aqua destillata in der eingangs beschriebenen Weise hämolysiert, mittels 2,7%-iger NaCl-Lösung reisoniert und mittels PBS<sup>®</sup>-Puffer auf 10 ml resuspendiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen und die PMN-Suspension, wie oben beschrieben, homogenisiert (Rüttelmixer). Nach Entnahme von Aliquots zur Kontrolle von Zellzahl, Reinheit und Vitalität erfolgte die Einstellung der PMN-Konzentration ( $0,8 \times 10^6$  PMN/ml) mittels eines Glukose-PBS<sup>®</sup>-Puffers (9,9 g Glukose pro Liter PBS<sup>®</sup>). 500 µl dieser PMN-Probe ( $0,4 \times 10^6$  PMN) wurden nun 500 µl Zymosan, 150 µl AB-Serum, 250 µl Cytochrom C zugesetzt und unter erneuter Zugabe der zu untersuchenden Testsubstanz in der entsprechenden Dosierung 15 Minuten bei 37 °C inkubiert (Schüttelwasserbad). Als Nullwert diente ein Ansatz, der statt Zymosan 500 µl Glukose-PBS<sup>®</sup>-Puffer enthielt. Direkt im Anschluß an das Inkubationsverfahren wurde die Reaktion durch Einbringen der Probe in Eiswasser abgestoppt. Nach 3-minütiger Zentrifugation (350 x g, 4°C) wurde der Probenüberstand gewonnen und die Extinktion bei 546 nm in einem Digitalphotometer (Digitalphotometer 6114 S<sup>®</sup>; Eppendorf, Hamburg) gegen den Nullwert ermittelt. Die gebildete Superoxidationmenge berechnete sich aus der Extinktion, der Schichtdicke und dem Extinktionskoeffizienten des Cytochrom C [(21/(mMol x cm))] unter Berücksichtigung des Probenvolumens nach dem Gesetz von Lambert & Beer (Rick 1977; Suleiman et al. 1993). Simultan zu

den Meßproben wurden stets auch testsubstanzfreie Ansätze mituntersucht. Die gebildete Superoxidanionmenge ist in den Ergebnissen in fMol/(PMN x min) angegeben.

#### **2.4.2 Bestimmung der granulozytären Wasserstoffperoxidbildung nach hochselektiver Separation von PMN aus menschlichem Vollblut**

Auch die in der vorliegenden Untersuchung angewendeten Methodiken zur Bestimmung der Wasserstoffperoxidproduktion von PMN basierten auf signifikanten Weiterentwicklungen der von Pick und Keisari (Pick et al. 1980), Stangel et al. (1986) sowie Krumholz und Mitarbeitern (Krumholz et al. 1991; 1993; 1995) beschriebenen Analytikverfahren. Das angewendete Meßprinzip beruht hierbei im wesentlichen auf der durch Meerrettich-Peroxidase vermittelten Oxidation von Phenolrot durch Wasserstoffperoxid. Versuchsvorbereitend wurden Phenolrot (10 mg/ml; Sigma, Deisenhofen) in Aqua destillata (Merck, Darmstadt) sowie Meerrettich-Peroxidase (5 mg/ml; Typ II, Sigma, Deisenhofen) in Glukose-PBS<sup>®</sup>-Puffer (Ansatz siehe oben) gelöst. Nach Inkubation des Vollblutes mit der zu untersuchenden Testsubstanz sowie nach erfolgter PMN-Isolation (Isolationsverfahren wie oben beschrieben), wurden die PMN mittels voropsoniertem Zymosan (Vorbereitung siehe Superoxidanionbestimmung) stimuliert. Der endgültige Versuchsansatz bestand aus 500 µl PMN-Suspension ( $2 \times 10^6$  PMN/ml), 500 µl voropsoniertem Zymosan, 125 µl AB-Serum, 12,5 µl Meerrettich-Peroxidase-Lösung, 12,5 µl Phenolrotlösung, 12,5 µl Natriumazidlösung (200 mM; Merck, Darmstadt) sowie aus der zu untersuchenden Testsubstanz in der entsprechenden Dosierung. Dieser Testansatz wurde nun über einen Zeitraum von 15 Minuten bei 37°C im Schüttelwasserbad inkubiert und im direkten Anschluß daran 3 Minuten bei 350 x g zentrifugiert. Nach Zusatz von 25 µl NaOH-Lösung (1N, Merck, Darmstadt) erfolgte die photometrische Extinktionsbestimmung des Überstandes bei 623 nm gegen einen unstimulierten Nullwert. Die Wasserstoffperoxidkonzentration wurde an Hand von in regelmäßigen Intervallen durchgeführten Eichmessungen ermittelt. Die Wasserstoffperoxidbildung ist in den Ergebnissen in fMol/(PMN x min) angegeben.

### **2.4.3 Bestimmung der Aktivität der von PMN freigesetzten Myeloperoxidase nach hochselektiver Separation aus menschlichem Vollblut**

Zur Quantifizierung der Aktivität der von PMN freigesetzten Myeloperoxidase wendeten wir eine Weiterentwicklung der primär von Schmitt et al. (1986) und Krumholz und Mitarbeitern (Krumholz et al. 1991; 1993; 1995) entwickelten Analytikverfahren. Vorbereitend wurde zunächst 1 mM 2,2'-Azino-di(3-ethylbenzthiazolin)-Sulfonsäure (ABTS, Sigma, Deisenhofen) in 0,1 M Zitratpuffer (Behring, Marburg) gelöst. Das Vollblutinkubationsverfahren wie auch die nachfolgende PMN-Isolation erfolgte wie beschrieben. 100 µl PMN-Suspension ( $2 \times 10^6$  PMN/ml) wurden nun mit 0,5 µg Cytochalasin B (Sigma, Deisenhofen) und unter erneuter Zugabe der zu untersuchenden Testsubstanz 5 Minuten im Schüttelwasserbad bei einer Temperatur von 37°C inkubiert. Nach Hinzufügen von 100 µl voropsoniertem Zymosan, welches wie oben beschrieben hergestellt wurde, und erneuter Ergänzung der zu untersuchenden Testsubstanz wurde abermals inkubiert (10 min; 37°C) und anschließend 1 ml ABTS-Lösung beigelegt. Nach 3-minütiger Zentrifugation (700 x g, 20°C) wurde 1 ml des Überstandes abpipettiert und mit 30%-iger Wasserstoffperoxidlösung versetzt (Merck, Darmstadt). Nach kurzer Homogenisierung (Rüttelmixer) wurde die Extinktion bei 405 nm photometrisch bestimmt. Die Aktivität der freigesetzten Myeloperoxidase wurde nachfolgend anhand von in regelmäßigen Intervallen unter Verwendung bekannter Meerrettich-Peroxidasekonzentrationen erstellten linearen Eichkurven errechnet. Die Aktivitäten sind in den Ergebnissen in Units/l Überstand angegeben.

### **2.5 Inkubationen mit Taurin und β-Alanin**

Für die Standardisierung der Methodiken wie auch für die nachfolgenden Versuche wurde heparinisiertes venöses Vollblut (10 I.E. Heparin-Natrium/ml, Sigma, Deisenhofen) verwandt. Das Blut stammte von freiwilligen weiblichen und männlichen Spendern (Alter:  $29 \pm 6$  Jahre; Körpergröße  $1,79 \pm 0,09$  m; Körpergewicht:  $73 \pm 11$  kg). Bei Probanden mit metabolischen, kardiopulmonalen, neurologischen oder allergischen Erkrankungen sowie bei Medikamenteneinnahme in der Anamnese wurde von einer Blutentnahme abgesehen. Die Blutentnahmen selbst erfolgten nach 8 bis 10-stündiger Nüchternheit morgens zwischen 08:00 und 10:00 Uhr. Im unmittelbaren Anschluß an die Blutentnahme wurden die heparinisierten Vollblutproben portioniert, in spezielle Inkubationsröhrchen (Merck, Darmstadt) überführt

und nach Zusatz der zu untersuchenden Testsubstanzen im Schüttelwasserbad bei 37°C inkubiert. Hierbei wurde 1 ml Vollblut jeweils mit 25 µl der entsprechenden Testsubstanz versetzt. Die Testsubstanzen selbst wurden mit Hank's balanced salt solution (HBSS<sup>®</sup>, Sigma, Deisenhofen) vorbereitet und in die jeweilig zu untersuchenden Konzentrationsbereiche dilutiert (pH 7,4). Zu allen Meßzeitpunkten der nachfolgend dargestellten Untersuchungen erfolgte eine parallele Prüfung mit testsubstanzfreien Versuchsansätzen (Kontrolluntersuchungen). Die Volumendifferenzen bei den Kontrollproben wurden mit HBSS<sup>®</sup> ausgeglichen. Die Standardinkubationszeiten betragen 10 und 120 Minuten. Bei den weiterführenden Untersuchungen (Kombinationstestungen) orientierten sich die Dosierungen und Inkubationszeiten an den signifikanten Stoffwechsel- und Immunfunktionsbefunden der vorher durchgeführten und ausgewerteten Einzeluntersuchungen. Auf längere Inkubationszeiten wurde in der vorliegenden Arbeit aus folgenden Gründen verzichtet: In Voruntersuchungen hatte sich gezeigt, dass höhere Inkubationszeiten (>2½ Stunden) unter den vorgegebenen *in vitro* Bedingungen auch bei den Kontrolluntersuchungen selbst zu unspezifischen und nicht reproduzierbaren Veränderungen des intrazellulären Aminosäure- und  $\alpha$ -Ketosäurepools wie auch der granulozytären Immunfunktionen führen. Außerdem ließ sich eine präzise PMN-Zellseparation bzw. eine exakte Zellzahlbestimmung bei Inkubationszeiten über 2½-3 Stunden ebenfalls nicht mehr einwandfrei gewährleisten. Die ausgewählten Konzentrationsbereiche orientierten sich ausschließlich an den Angaben und Ergebnissen früherer Untersuchungen (die Literaturangaben hierzu befinden sich an den entsprechenden Positionen im Diskussionsteil).

### 2.5.1 Taurin

Um den grundsätzlichen Einfluß von Taurin (Sigma, Deisenhofer) auf die untersuchten Parameter evaluieren zu können, erfolgte zunächst eine Testung in 5 differenten Konzentrationen. Die gewählten Konzentrationsbereiche entsprachen dem ½-, 1-, 2-, 5- sowie 10-fachen der physiologischen Plasmakonzentrationen von L-Taurin. [Die unterstrichenen Konzentrationsbereiche beziehen sich auf die  $\alpha$ -Ketosäurebestimmungen: L-Taurin: 0,05; 0,1; 0,2; 0,5 und 1 mM]. Um die Dynamik der maximalen Effekte näher präzisieren zu können, erfolgte für die Aminosäure L-Taurin auch eine nähere Prüfung auf Zeitabhängigkeit der beobachteten Veränderungen (Inkubationszeiten: 10, 30, 60 und 120 Minuten).

### 2.5.2 $\beta$ -Alanin

Die erforderlichen Konzentrationen wurden analog zu früheren Untersuchungen, in denen eine signifikante Beeinflussung der jeweilig relevanten zellulären Stoffwechselwege beschrieben worden waren (siehe Diskussionsteil) gewählt. Darüber hinaus erfolgte für den untersuchten Stoffwechselmodulator in den beschriebenen Konzentrationsbereichen auch eine Prüfung auf eine mögliche Zeitabhängigkeit potentieller Effekte. In dieser Arbeit wurde folgender Stoffwechselmodulator näher untersucht:

$\beta$ -Alanin [10 mM,  $\beta$ -Ala, Sigma, Deisenhofen (L-Taurin-Analogon, Stoffwechselkorrelat des transmembranösen Taurintransports, Korrelat aller taurinabhängigen Enzyme)]

## 2.6 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte in enger Zusammenarbeit mit dem Institut für Medizinische Informatik der Justus-Liebig-Universität Gießen (Leiter: Prof. Dr. J. Dudeck).

Für die mittels der oben beschriebenen Analytiken bestimmten freien Amino- und  $\alpha$ -Ketosäuren wurde nach detaillierter Sichtung der ermittelten Meßwerte prinzipiell Normalverteilung vorausgesetzt. Die Darstellung der berechneten Ergebnisse erfolgte deshalb -getrennt nach Dosierung, Inkubationszeit sowie hinsichtlich der gewählten Inkubationsansätze- unter Zuhilfenahme von Mittelwerts- und Standardabweichungsberechnungen. Zur Beurteilung der Effekte durch die beschriebenen Einflußgrößen wurden ein- bzw. zweifaktorielle Varianzanalysen mit Meßwiederholungen herangezogen, welche -falls Haupteffekte nachweisbar waren- durch einen Paarvergleich nach Bonferoni ergänzt wurden. Es ist anzumerken, dass die Analyse der Amino- und  $\alpha$ -Ketosäuredaten explorativen Charakter hatte, bei der eine Vielzahl von Hypothesen getestet wurden. Kriterien für die Annahme bzw. Beibehaltung der Hypothesen war daher die errechnete Wahrscheinlichkeit für den Fehler der 1. Art  $p$ , der im Ergebnisteil reduziert auf ein Signifikanzniveau von  $p \leq 0,05$  angegeben wird.

Die im Rahmen der Immunfunktionsuntersuchungen ermittelten Meßwerte wurden zunächst unter Zuhilfenahme des Kolmogoroff-Smirnoff-Anpassungstests hinsichtlich ihrer Normalverteilung geprüft. Außerdem erfolgte mittels des Bartlett-Tests eine Prüfung aller Meßresultate auf ihre Varianzhomogenität ( $p < 0,1$ ). Waren diese Voraussetzungen erfüllt, erfolgte eine ein- bzw. zweifaktorielle Varianzanalyse mit Meßwiederholungen, welche -falls Haupteffekte nachweisbar waren- ebenfalls durch einen Paarvergleich nach Bonferoni ergänzt wurde. Waren die Vorbedingungen für eine Varianzanalyse jedoch nicht erfüllt, so erfolgte die Anwendung des Friedman-Tests. Als Folgeverfahren diente hier der Miller-Test. Das Signifikanzniveau für alle angewendeten statistischen Verfahren wurde hier mit  $p \leq 0,05$  angesetzt.

---

## 3 ERGEBNISSE

### 3.1 Hochselektive Separation von PMN aus Vollblut

Die Probenentnahme bei den nüchternen Probanden erfolgte grundsätzlich zwischen 08:00 und 10:00 Uhr morgens. Die durchschnittliche Vollblutentnahmezeit bei allen Untersuchungen lag bei 09:17 Uhr ( $\pm 24$  min). Pro 4 ml entnommener Vollblutprobe konnten durchschnittlich  $3,26 \times 10^6 \pm 1,27 \times 10^6$  PMN-Zellen separiert werden. Die prozentuale Abweichung der Zellzahl bei zweimaliger Zellzählung betrug  $4,1 \pm 1,8$  %. Die methodischen Nachweisgrenzen hinsichtlich einer ausreichenden Sensitivität liegen bei den dargestellten Methoden mit etwa  $>10^5$  PMN/Probe für die intrazelluläre Standardaminosäurequantifizierung bzw. mit etwa  $>10^6$  PMN/Probe für die  $\alpha$ -Ketosäurebestimmungen weit unterhalb der von uns pro Einzelprobe separierten PMN-Zahlen. Die Reinheit der separierten PMN-Zellen betrug durchschnittlich  $98,3\% \pm 0,9\%$ , die Vitalität  $99,0\% \pm 0,9\%$  (Zellproben mit  $< 96\%$  vitalen PMN-Zellen sowie einer PMN-Zellreinheit  $< 96\%$  wurden verworfen). Die Dauer der PMN-Zellseparation konnte, verglichen mit bisher beschriebenen Methodiken (Eggleton et al. 1989; Krumholz 1991), insgesamt deutlich verkürzt werden und erforderte durchschnittlich  $33 \pm 5$  Minuten. Die mittlere prozentuale Abweichung der ermittelten Aminosäurekonzentrationen bei Vergleich der Lyophilisierung mit einem standardisierten PMN-Zellyseverfahren betrug zwischen 2,6 % (Asparagin) und 8,1 % (Arginin).

### 3.2 Bestimmung plasmatischer und freier intrazellulärer Aminosäuren in PMN mittels f-HPLC

Um die Reproduzierbarkeit und die Qualität der Meßergebnisse im Rahmen der Hochdruck-Fluoreszenz-Flüssigkeits-chromatographischen Quantifizierung von primären Aminosäuren konstant gewährleisten zu können, wurde die Analytik kontinuierlich mittels externer sowie interner Standardisierungsverfahren überwacht.

### **3.2.1 Ergebnisse der Standardisierungs- und Validierungsverfahren im Rahmen der Quantifizierung von Aminosäurestandardproben**

Die Variationskoeffizienten für die Reproduzierbarkeit der Methodik (Variationskoeffizienten der Flächen) bei Reihenanalysen von Standardproben primärer Aminosäuren im Durchschnitt zwischen 0,92% (Methionin) und 2,44% (Leucin) sowie bei Tag-zu-Tag-Analysen zwischen 1,82% (Glycin) und 4,52% (Lysin). Die Reproduzierbarkeit der Retentionszeiten bei Reihenanalysen lagen im Mittel zwischen 0,02% (Lysin) und 0,24% (Citrullin) und bei Tag-zu-Tag-Analysen zwischen 0,04% (Lysin) und 0,83% (Threonin). Wie die Ergebnisse der Reihen- aber auch der Tag-zu-Tag-Untersuchungen zeigen, gewährleistete der verwendete Standardextraktionspuffer (80%/20% Methanol-H<sub>2</sub>O-Gemisch) wie die nachfolgenden Analytikschritte im Rahmen der automatisierten Vorsäulenderivatisierung die kurzfristige Lagerfähigkeit (< 60 h), so dass es auch nach Resuspendierung der lyophilisierten Standardaminosäureproben zu keiner weiteren chemischen Umwandlung bzw. zum Verlust an Fluoreszenzaktivität kam. Die Wiederfindungsrate betrug sowohl bei den Aminosäurestandardproben wie bei den PMN- und Plasmaproben für alle hier untersuchten Standardaminosäuren 100%.

### **3.3 Bestimmung plasmatischer und freier $\alpha$ -Ketosäuren in PMN mittels F-HPLC**

Die Reproduzierbarkeit und die Qualität der Analytik und der damit ermittelten Meßergebnisse im Rahmen der fluoreszenzchromatographischen Analytik von  $\alpha$ -Ketosäuren wurde fortlaufend mittels kontinuierlich durchgeführten internen sowie intermittierend vorgenommenen externen (4-wöchentlichen) Standardisierungsverfahren überwacht.

#### **3.3.1 Ergebnisse der Standardisierungs- und Validierungsverfahren im Rahmen der Quantifizierung von $\alpha$ -Ketosäurestandardproben**

Die Variationskoeffizienten für die Reproduzierbarkeit der Methodik (Variationskoeffizienten der Flächen) bei Reihenanalysen von  $\alpha$ -Ketosäurestandardproben im Durchschnitt zwischen 1,89% (Pyruvat) und 3,85% ( $\alpha$ -Ketoisovalerianat); bei Tag-zu-Tag-Analysen zwischen 3,92%

( $\alpha$ -Ketoisocapronat) und 5,49% ( $\alpha$ -Ketoisovalerianat). Die Reproduzierbarkeit der Retentionszeiten bei Reihenanalysen lag im Mittel zwischen 0,18% (Pyruvat) und 0,24% ( $\alpha$ -Keto- $\beta$ -methylvalerianat) und bei Tag-zu-Tag-Analysen zwischen 0,47% ( $\alpha$ -Ketoglutarat) und 0,91% ( $\alpha$ -Keto- $\beta$ -methylvalerianat).

Hinsichtlich der Ergebnisse der Reihen- und der Tag-zu-Tag-Untersuchungen ergaben sich keine Hinweise, dass es auch nach Resuspendierung der lyophilisierten  $\alpha$ -Ketosäurestandardproben und ebenso im Rahmen der weiteren Probenvorbereitung zu einer weiteren chemischen Umsetzung der untersuchten  $\alpha$ -Ketosäuren und damit zum Verlust von Fluoreszenzaktivität kam. Die Wiederfindungsrate betrug sowohl bei den  $\alpha$ -Ketosäurestandard- als auch bei den PMN- und Plasmaproben für alle untersuchten  $\alpha$ -Ketosäuren 100%.

### **3.4 Einfluß der immunonutritiven Aminosäure Taurin und dem Stoffwechselmodulator $\beta$ -Alanin auf die freien Amino- und $\alpha$ -Ketosäurepools in PMN sowie auf ausgesuchte granulozytäre Immunfunktionen**

#### **3.4.1 Immunonutritive Aminosäure**

##### **3.4.1.1 Einfluß von Taurin auf den intragranulozytären Pool primärer Aminosäuren**

Eine Inkubation mit Taurin führte zu signifikanten dosis ( $\geq 0,2$  mM) und inkubationszeitabhängigen ( $\geq 10$  Minuten bei 1 mM) Veränderungen folgender freier intragranulozytärer Aminosäuren: Taurin, Hypotaurin, Serin, Glycin, Threonin, Alanin und  $\alpha$ -Aminobutyrat. Erst bei sehr hohen Taurinkonzentrationen (1 mM) und Inkubationszeiten von 60 Minuten zeigte sich ein beginnender signifikanter intragranulozytärer Anstieg des freien Taurins (ca. +30%). Verbunden mit der intragranulozytären Taurinerhöhung konnte eine parallele Reduktion von Hypotaurin (-54%) und den neutralen Aminosäuren (-31 bis 70%) beobachtet werden. Die mit einer Taurininkubation induzierten molaren Konzentrationsverminderungen der genannten Aminosäuren kompensierten allerdings nur ca. 39% der quantitativen Taurinerhöhung (Tabellen 7, 8, 13 und 14 des Anhangs).

### **3.4.1.2 Einfluß von Taurin auf den intragranulozytären $\alpha$ -Ketosäurenpool**

Taurin führte zu signifikanten dosis- und inkubationszeitabhängigen Reduktionen der intragranulozytären Pyruvat- und  $\alpha$ -Ketobutyryratspiegel (Tabelle 16 des Anhangs).

### **3.4.1.3 Einfluß von Taurin auf granulozytäre Immunfunktionsmarker (Superoxidationbildung, Wasserstoffperoxidproduktion, Myeloperoxidaseaktivität)**

Bei Betrachtung der hier untersuchten Immunfunktionsparameter induzierte Taurin signifikante Reduktion der Superoxidationbildung und der Wasserstoffperoxidproduktion. Gleichzeitig kam es zu einem Anstieg der Myeloperoxidaseaktivität ( $\geq 0,2$  mM;  $\geq 30$  Minuten bei 1 mM; Tabellen 10 und 17 des Anhangs).

## **3.4.2 Stoffwechselmodulator $\beta$ -Alanin**

### **3.4.2.1 Einfluß von $\beta$ -Alanin auf den intragranulozytären Pool primärer Aminosäuren**

Bei der Untersuchung des Taurinanalogen  $\beta$ -Alanin zeigten sich signifikante inkubationszeitabhängige ( $\geq 60$  Minuten) Änderungen des granulozytären Taurin- (-37 %) und Hypotaurinspiegels (+43 %) (Tabelle 20 des Anhangs).

Weiterhin kam es parallel zu einem deutlichen Anstieg der freien Aminosäurepools neutraler Aminosäuren [Serin (+89 %), Glycin (+102 %), Threonin (+96 %), Alanin (+36 %),  $\alpha$ -Aminobutyrat (+58 %)] (Tabelle 21 des Anhangs).

### **3.4.2.2 Einfluß von $\beta$ -Alanin auf den intragranulozytären $\alpha$ -Ketosäurenpool**

$\beta$ -Alanin bewirkte signifikante Zunahmen des intragranulozytären Pyruvats (+23 %) sowie des mit Threonin korrespondierenden  $\alpha$ -Ketobutyryrats (+29 %) (Tabelle 23 des Anhangs).

### **3.4.2.3 Einfluß von $\beta$ -Alanin auf granulozytäre Immunfunktionsparameter (Superoxidationbildung, Wasserstoffperoxidproduktion, Myeloperoxidaseaktivität)**

Auch bei den oben genannten Immunfunktionsmarkern induzierte der getestete Stoffwechselmodulator qualitativ und quantitativ sehr unterschiedliche Effekte (Tabelle 24 des Anhangs). Bei Inkubation mit  $\beta$ -Alanin kam es zu einem Anstieg der reaktiven Sauerstoffmetabolite ( $O_2^-$ : +47 %;  $H_2O_2$ : +61 %), ferner kam es jedoch zu einer bedeutenden Reduktion der Myeloperoxidaseaktivität (-28 %).

### **3.4.3 Immunonutritive Aminosäure + Stoffwechselmodulator $\beta$ -Alanin**

#### **3.4.3.1 Einfluß von Taurin kombiniert mit $\beta$ -Alanin auf den intragranulozytären Pool primärer Aminosäuren**

Die kombinierte Inkubation von Taurin mit  $\beta$ -Alanin induzierte, betrachtet man die Ergebnisse der alleinigen Applikation dieses Stoffwechselmodulators, ebenfalls signifikante Veränderungen des primären Aminosäurepools im polymorphkernigen Granulozyten (Tabellen 18-22 sowie 25 und 26 des Anhangs). Weiterhin besaß diese Kombination positiven Einfluß auf die freien Taurin-, Hypotaurin- und neutralen Aminosäurespiegel.

#### **3.4.3.2 Einfluß von Taurin kombiniert mit $\beta$ -Alanin auf den intragranulozytären $\alpha$ -Ketosäurepool**

Taurin in Kombination mit  $\beta$ -Alanin führte bei Untersuchung der in dieser Arbeit bereits vorgestellten  $\alpha$ -Ketosäuren zu ähnlichen Ergebnissen wie bei der Taurin-Einzelkombination, nämlich ausschließlich eine Änderung des freien Pyruvat- (-32 %) und  $\alpha$ -Ketobutyrat-spiegels (-28 %) (Tabelle 30 des Anhangs).

#### **3.4.3.3 Einfluß von Taurin kombiniert mit $\beta$ -Alanin auf granulozytäre Immun-funktionsparameter (Superoxidanionbildung, Wasserstoffperoxidproduktion, Myeloperoxidaseaktivität)**

Bei Versuchen mit den oben genannten Stoffwechselmodulatoren ergaben sich keine additiven Effekte. In Kombination mit Taurin und  $\beta$ -Alanin blieb die granulozytäre Superoxidanionenproduktion unter den Kontrollwerten (-28 %). Vergleichbares bei der Wasserstoffperoxidbildung, auch hier blieb das Ergebnis unter den Kontrollwerten (-17 %). Bei Betrachtung der Myeloperoxidaseaktivität kam es, verglichen mit den Einzeltestungen von Taurin und  $\beta$ -Alanin, zu einer signifikanten Aufhebung dieser Effekte (Tabelle 31 des Anhangs).

---

## 4 DISKUSSION

### 4.1 Diskussion der verwendeten Methoden und Messverfahren

#### 4.1.1 Quantitative Aminosäurebestimmung in menschlichen polymorphkernigen Granulozyten

In Hinblick auf die Fragestellung musste zuerst eine PMN-Zellseparation sowie eine PMN-Lyse entwickelt werden, die den Stoffwechselstatus der neutrophilen Granulozyten direkt zum Zeitpunkt der Blutentnahme wiedergibt und weitere Stoffwechselprozesse verhindert. Dadurch ist es gewährleistet, pathophysiologische Veränderungen der Stoffwechselaktivität, z. B. während schwerer oder chronischer Erkrankungen oder medikamentöser Therapieverfahren zu erfassen (Davis et al. 2009; Fürst et al. 1980; 1987; Law 1998; Metcoff 1986; Metcoff et al. 1978; Roth et al. 1987). Ziel einer PMN-Aufbereitung aus Vollblut muß also die rasche und stoffwechselneutrale PMN-Separation mit vollständigem Erhalt aller Zellfunktionen ohne vorzeitige Zerstörung der Zellintegrität bei gleichzeitig hoher Zellreinheit der Probe sein. Um mit möglichst geringen Vollblutmengen eine hohe Zellzahl bei hoher Zellreinheit (> 97% PMN pro Probe) zu erlangen, entwickelten wir die Methodik der Granulozytenseparation nach Eggleton et al. (1989) bzw. Krumholz et al. (1995) weiter. Dazu verwendeten wir 4 ml Vollblut für die Standardaminosäureanalytik bzw. 8 ml für die  $\alpha$ -Ketosäureanalytik. Dabei sind nur 0,5 ml (Standardaminosäuren) bzw. 2 ml ( $\alpha$ -Ketosäuren) Vollblut für eine ausreichende Granulozytenseparation für die weitere HPLC-Analytik nötig. Die Methodik wird nicht durch Kühlung der Vollblutprobe und des Gradienten auf 4°C beeinflusst. Ferner zeigten die lichtmikroskopischen Kontrollen jeder PMN-Probe, bei denen die Zellzählungen durchgeführt wurden (Abweichung bei zweimahliger Zählung < 4%), dass die Zellvitalität und die Zellintegrität gewährleistet bleiben. Es gelang uns im Gegensatz zu bisherigen Methoden wie die zum Beispiel von Fürst et al. (1987) die Probenvorbereitungs- und Separationszeiten trotz Voraussetzung der Stoffwechselneutralität mit durchschnittlich 34 Minuten pro Probe mehr als zu halbieren. Dabei wurden, wie schon oben beschrieben alle Separationsschritte bei einer gleichbleibenden Temperatur von 4°C und nicht wie üblich bei Raumtemperatur oder sogar Körpertemperatur (Al Sawaf et al. 1993; Fürst et al. 1987; Learn et al. 1990; Metcoff 1986) durchgeführt. Bei den älteren Lysetechniken werden die Granulozyten aufwendig und teilweise langwierig

immer wieder gefroren und aufgetaut wie zum Beispiel bei Carrea et al. (1993) oder die Zelllyse wird mittels Ultraschall induziert. Bei anderen Methoden wurden die PMN-Proben zur Lyse der noch verbliebenen Erythrozyten erwärmt (teilweise bis auf 100°C wie bei Learn et al. 1990) oder es wurden sehr aggressive chemische Lyseverfahren mit HCl oder KOH verwendet (Al Sawaf et al 1993; Carrea et al. 1993; Metcoff et al. 1978). Dadurch sind die Anforderungen einer präzisen Aminosäureanalytik wie Stabilität vor stoffwechselaktiver bzw. chemischer Umwandlung (Abbau, Umformung etc.) nicht gewährleistet (Al Sawaf et al. 1993; Canepa et al 1989; Davis et al. 2009; Fürst et al. 1987; Metcoff 1987). Um weitere Aminosäureveränderungen während der Probenvorbereitung durch die PMN-Lyse der gefrorenen Probe zu verhindern, wurde im Anschluß der PMN-Separation eine Tiefgefriertrocknung, das heißt Lyophilisierung bei -80°C (Fuchs 1990) durchgeführt. Dies erlaubt eine rasche und vollständige Lyse der bei -80°C zunächst kurzfristig gelagerten Granulozyten ohne Zusatz möglicherweise proteolytisch aktiver Reagenzien und ohne Weidererwärmung der Probe mit der Gefahr einer erneuten Zellaktivität. Darüber hinaus ermöglicht dies eine längerfristige (bis zu 6 Monate) und stabile Lagerung der Proben vor der nachfolgenden HPLC-Analytik ohne Qualitätsverluste durch raschen Zerfall wichtiger Aminosäuren (Fuchs et al. 1994; 1998; Riedel et al. 1989; 1992). Ein weiterer Vorteil sind die erzielten analogen Ergebnisse bei den Standardamino-säuren ohne die Gefahr einer nicht kontrollierbaren chemischen Umwandlung oder Bindung, da das methanolische Extraktionsmittel (80% Methanol / 20% H<sub>2</sub>O) die Protein-Liganden-Bindung effektiver als eine Liquid-Liquid-Extraktion löst und außerdem für die meisten Liganden ein optimales Lösungsmittel darstellt. Ferner beinhaltet es gleichzeitig den internen Standard und extrahiert aus biologischen Proben kein Protein (Fuchs et al. 1990; 1994; 1998). Auch wird dadurch die Gefahr der bakteriellen Kontamination unterbunden.

In unserer Arbeitsgruppe bezog sich wie bei nur wenig anderen Untersuchern die intrazelluläre Aminosäurekonzentration auf das Einzelzellniveau (Learn et al. 1990). Meist wurde ein Konzentrationsbezug auf das parallel gemessene Intrazellulärwasser (ICW) nach der Methodik von Baron et al. (1969) in µMol/ml oder in µmol/kg ICW gewählt. Die Bezugsgröße ist hierbei entweder das ermittelte Feucht- (wet weight) oder Trockengewicht (dry weight) der jeweiligen Probe, teilweise korrigiert unter Zuhilfenahme der residuellen <sup>14</sup>C- Inulin-Retentionsmethodik (Fürst et al. 1987; Metcoff et al. 1986; 1978). Ein weiterer Bezugspunkt war unter anderem der intrazelluläre Protein- oder DNA-Gehalt wie bei z.B. Canepa et al. (1989). Hier wird schnell klar, dass es durch diese unterschiedlichen Methoden

nicht möglich ist eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu erreichen, da auch bei den Arbeitsgemeinschaften die den gleichen Konzentrationsbezug wählten (z. B. ICW), Differenzen auftraten, wie bei der Probenvorbereitung, Zellseparation, Lyse und auch der benutzten HPLC-Methodik. Dabei sind es gerade die physikalischen Eigenschaften des Wassers die die Verwendung des mittleren ICW-Gehaltes zur Aminosäurendarstellung in Frage stellen. Wasser kann zur Gewährleistung einer ausgeglichenen physiologischen intra- und extrazellulären Osmolalität frei durch die Zellmembranen permeieren und wird so durch pathophysiologische Veränderungen wie Bilanz- und Verteilungsstörungen beeinflusst (Law 1994; 1998). Neben separaten Veränderungen des Wassergehaltes (Hypo-, Hypervolämie), des osmotischen Druckes und der Osmolalität (vor allem der Natriumkonzentration) sind es vor allem komplexe pathophysiologische Veränderungen (hypotone De-/Hyperhydratation bzw. hypertone De-/Hyperhydratation), die teils zu ausgeprägten Störungen des intrazellulären Volumens vieler Körperzellen führen können (Law 1994; 1998). Ferner gibt es noch weitere nicht meß- und beobachtbare Faktoren, die Einfluß auf den intrazellulären Wasserhaushalt der Granulozyten nehmen können, sowie auch osmoregulatorische Aminosäuren wie Taurin, dessen Einwirkungen später noch näher beschrieben werden (Law et al. 1994; 1998).

Wie anfangs erwähnt, können Medikamente sowie langwierige Erkrankungen den Aminosäurestoffwechsel verändern, indem der intrazelluläre Proteingehalt (intracellular protein mass) durch z. B. Sepsis, Leberzirrhose, Nephrotisches Syndrom etc. empfindlich gestört wird (Kaufmann et al. 2006; Khoshnoodi et al. 2001; Kurtzman 2001; Patel 2000; Syeed 2000; Teran 1999). So wird schnell klar, dass auch dieser Wert nicht als Aminosäurekonzentrationsbezug herangezogen werden kann (Biolo et al. 1997; Haussinger et al. 1993; Tamarappoo et al. 1993).

In Anlehnung der Ergebnisse von Fuchs und seinen Mitarbeitern (Fuchs et al. 1990) nutzten wir bei der von unserer Arbeitsgruppe durchgeführten Umkehrphasen-HPLC-Analytik (reversed-phase high-performance-liquid-chromatography) o-Phtaldialdehyd (OPA) als Fluorophor und als Derivatisierungsreagenz. Die Bildung der Isonidol-Derivate (pH 9,5 – 10 in 0,5mBorat) erfolgt bei Raumtemperatur innerhalb kürzester Zeit vollständig und reproduzierbar. Dabei zeigt sich bei diesem Modell der OPA-Vorsäulen-Derivatisierung freier Aminosäuren durch die günstige Größenrelation zwischen Fluorophor-Teil und Aminosäuren die höchste Selektivität und Sensitivität. Wegen der geringen Molekülgröße der Derivate sind

optimale Trennungseigenschaften gewährleistet (Meyer 1986). Desweiteren zeigt OPA keine störenden Eigenfluoreszenzen oder Bildung stark fluoreszierender Nebenprodukte im Chromatogramm wie bei der sonst durchgeführten Vorsäulenderivatisierung mittels 9-Fluorenylmethyl-chloroformat (FMOC-Cl), so dass zur deren Entfernung kein Pentan zugefügt werden muß (Einarsson et al. 1983). Ferner traten immer wieder Probleme bei der Derivatisierung intrazellulärer Aminosäuren aufgrund geringer Pufferkapazitäten des Reaktionsumsatzes auf. Im Vergleich zu den anderen Derivatisierungsmethoden zeigt sich jedoch eine geringere Stabilität der OPA-Derivate, dies Problem kann aber durch eine zeitliche Standardisierung der Reaktion gelöst werden. Zur optimalen Trennung des komplexen Aminosäurederivatgemisches ist zusätzlich ein Laufpuffergradient erforderlich. Fuchs und seine Mitarbeiter empfehlen als Ersatz des sonst zum Einsatz kommenden Acetonitrils zur optimalen Gradientenelution intrazellulärer Aminosäuregemische Methanol als organische Phase (Fuchs et al. 1990). Im Vergleich von Acetonitril und Methanol zeigt sich bei ähnlichen Polaritätindizes (Acetonitril: 3,2; Methanol: 2,6) trotz geringerer Viskosität des Acetonitrils (Acetonitril: 0,37; Methanol: 0,6) eine nur begrenzte Stabilität sowie Entstehung gesundheitsschädlicher Abfallprodukte (Feisetzung von Blausäure). Methanol-Acetonitril-Puffer sowie Methanol-Phosphat-Puffer führen im Gegensatz zu Methanol-Acetat-Puffern (gute Löslichkeit) häufig zu Kristallbildungen und erschweren so eine reproduzierbare Elutionseigenschaften. Für eine möglich kurze Elutionszeit und Analysendauer wird laut Literatur eine Acetationenkonzentration von 50 mMol empfohlen (Farshidfar 1990) und zusammen mit den von unserer Arbeitsgruppe genutzten Trennsäulen kann die Selektivität noch weiter verbessert werden.

#### **4.1.2 Quantitative $\alpha$ -Ketosäurenbestimmung in menschlichen polymorphkernen neutrophilen Granulozyten**

Wie im ersten Teil der Diskussion erläutert, wählten wir während unserer Versuchsreihen das Einzelzellniveau als Bezugsgröße zur Analytik stoffwechselphysiologisch relevanter  $\alpha$ -Ketosäuren in menschlichen PMN.

Die hydrophobe Wechselwirkung zwischen den funktionellen hydrophoben Gruppen der Probenmoleküle und der hydrophoben unpolaren stationären Phase ist die Basis der chromatographischen Trennung mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) an Umkehrphasen (reversed phase, RP-HPLC) (Meyer 1986). Im Gegensatz zur konventionellen

Absorptionschromatographie nutzen wir mobile Phasen aus binären oder ternären Gemischen (H<sub>2</sub>O / schwach polares organisches Lösungsmittel) zur Elution der Probenmoleküle. Die stationäre Phase besitzt stark unpolare Eigenschaften, so dass bei isokratischer Elution -d. h. die Zusammensetzung des Eluenten und die Fließmittelstärke bleibt während des Trennvorgangs konstant- unpolare Moleküle langsamer eluiert werden als polare (Engelhardt 1986). Durch eben diese physikalischen Gesetzmäßigkeiten besteht eine Abhängigkeit bei der Trennung der  $\alpha$ -Ketosäurederivate von dem Verhältnis zwischen der Größe der hydrophoben Seitenketten und den hydrophilen Gruppen der Derivate. Da  $\alpha$ -Ketosäuren stark polare Eigenschaften besitzen, sind die Wechselwirkungen mit der hydrophoben stationären Phase zu schwach und so kann eine effektive Trennung von  $\alpha$ -Ketosäuregemischen an Umkehr-Phase-Säulen nur mit vorheriger Derivatisierung durchgeführt werden (Fuchs 1998). Damit erhöht sich die Adsorption an der stationären Phase und ermöglicht die effektive Elution der Derivate durch Variation der Polarität der Eluenten (Henschen et al. 1989). Vorrausgegangene Untersuchungen mit der Vorsäulen-HPLC-Derivatisierungstechnik zeigten, dass die Verwendung von 2,4-Dinitrophenylhydrazin (DNP) als Derivatisierungsreagenz zu einer störenden Stereoisomerenbildung (syn- und anti-Isomere) führt und somit komplexe  $\alpha$ -Ketosäuregemische nicht mehr effizient genug getrennt werden können (Farshidfar 1990; Katrukha et al. 1986). Die entstehenden DNP-Derivate werden hierbei als Doppelpeaks charakterisiert, bei denen die Peakgröße von dem quantitativen Verhältnis der beiden Isomere zueinander abhängig ist (Farshidfar 1990). Auch durch Variation der Eluentenkonzentrationen und -gradienten konnte die daraus entstandene Überlappung der Peaks und die resultierenden identischen Retentionszeiten nicht ausreichend verhindert werden, so dass die RP-HPLC-gestützte chromatographische Trennung von  $\alpha$ -Ketosäuregemischen nach Vorsäulenderivatisierung unter Verwendung von DNP keine reproduzierbare und effiziente  $\alpha$ -Ketosäureanalytik bietet (Fuchs et al. 1994, 1998). Die Verwendung von DNP in gaschromatographischen Verfahren ohne einen zweiten Derivatisierungsschritt der DNP- $\alpha$ -Ketosäure-Derivate führte zu ähnlichen Problemen, da durch die noch vorhandene OH-Gruppe die günstige chromatographische Flüchtigkeit des Derivateproduktes noch nicht erreicht werden kann (Kallio et al. 1972; Farshidfar 1990). Die Polarität der 2,4-Dinitrophenylhydrazon-Derivate kann jedoch durch Silylierung der freien OH-Gruppe mittels Trimethylalaninhydroxid (TMAH) ausreichend herabgesetzt werden. Allerdings wie schon bei der DNP-RP-HPLC-Methodik kommt es hier ebenfalls zu einer syn- und anti-Isomerenbildung und damit zu den nicht differenzierbaren Doppelpeaks, ferner kann

der zweite Derivatisierungsschritt (Methylesterbildung mit TMAH) nicht direkt chemisch-analytisch kontrolliert werden, da dieser erst im Gaschromatographeneinlaß stattfindet (Farshidfar 1990; Fuchs 1998). Auch ein Fehlen der Doppelpeaks (sowohl bei der RP-HPLC- als auch bei der gaschromatographisch gestützten DNP-Derivatisierung) ist kein Garant für eine effiziente Ergebnisse dieses Derivatisierungsverfahren, es liegt oftmals nur an einem fehlenden Auflösungsvermögen der HPLC-Säule (Fuchs 1998). Ein großer Nachteil aller Methoden, die eine DNP-Derivatisierung verwenden, ist vor allem die im nMol-Bereich liegende niedrige Nachweisgrenze, die um den Faktor  $10^2 - 10^3$  über der, für eine exakte intrazelluläre  $\alpha$ -Ketosäureanalytik nötige Nachweisgrenze liegt (Gerlach et al. 1996).

Auf der Basis vorrausgegangener Untersuchungen, den Schwächen der DNP-unterstützten Verfahren und der These, dass freie intrazelluläre  $\alpha$ -Ketosäuren in polymorphkernigen Granulozyten nur in sehr geringen Mengen enthalten sind, entschieden wir uns für eine RP-HPLC gestützte  $\alpha$ -Ketosäurentrennung mit o-Phenyldiamin (PDA) als Derivatisierungsreagenz (Fashidfar 1990; Fuchs 1998; Riedel et al. 1989, 1992, 2000). Dass dies für die Analytik eine gute Wahl ist, konnte durch Studien an extrazellulären Kompartimenten wie z. B. Plasma und Urin bestätigt werden (Koike et al. 1984, Hayashi et al. 1982, 1983). In Zusammenschau mit den uns vorliegenden Ergebnissen der vorrausgegangenen Studien und den Anforderungen der exakten und quantitativen intrazellulären  $\alpha$ -Ketosäureanalytik in neutrophilen Granulozyten wurde in unserer Arbeitsgruppe ein Elutionssystem entwickelt, dass die bei der chromatographischen Trennung mittels PDA als Derivatisierungshilfe entstehenden Chinoxalinol-Derivate nutzt. Chinoxalinol-Derivate besitzen eine intensive Fluoreszenz, die qualitativ und quantitativ sehr präzise erfaßt werden kann und daneben keine störenden Stereoisomerieeffekte entstehen. Durch Anwendung von Säulematerial mit geringem Korndurchmesser (z.B. 3,9 mm) und hoher Belegungsdichte der Silicageloberfläche als stationäre Phase ( z.B. C18-Silane) kann die Trennleistung der Säule zusätzlich vergrößert werden und gewährleistet - bei gleichzeitig erwünschter Verkürzung der Analysezeit – eine hohe Elutionsauflösung. Voraussetzung für eine hochwertige Analytik bezüglich einer maximalen, schnellen und damit quantitativen Umsetzung ist die Herstellung der Chinoxalinol-Derivate mit einem möglichst hohen Überschuß um das 100- bis 1000-fache an PDA (Wolf et al. 1982, Kieber et al. 1983). Dabei muß auch auf eine strikte Einhaltung der gewählten Derivatisierungszeit sowie der Derivatisierungstemperatur geachtet werden. Optimal erwiesen sich bei Arbeiten mit Humanplasma eine Temperatur von 80°C und eine Reaktionszeit von 60 Minuten (Farshidfar 1990).

Neben den schon beschriebenen Vorteilen von PDA als Derivatisierungsreagenz, sollen natürlich auch die methodischen Probleme nicht außer Acht gelassen werden. O-Phenyldiamin ist extrem licht- und oxidationsempfindlich und kann bei der Oxidation fluoreszierende Nebenprodukte erzeugen, die die Analytik aufgrund ähnlicher Retentionszeiten stören. Um dies Problem zu beseitigen, muß PDA zuvor zum Beispiel mit Heptan umkristallisiert und für die wiederholte Analytik bei Licht- und Luftausschluß (unter N<sub>2</sub>) bei 2-8°C aufbewahrt werden (Katrukha et al. 1986). Ferner hat sich die Zumischung von 2-Mercaptoethanol im Reaktionsansatz als erforderlich bewiesen, da somit die Entstehung weiterer fluoreszierender Reaktions- und Nebenprodukte vermieden werden kann. Da bei einer gaschromatographisch gestützten Trennung der Chinoxalinol-Derivate wie auch bei der DNP-Derivatisierung von  $\alpha$ -Ketosäuren ein zweiter Derivatisierungsschritt benötigt wird, wurde in unserer Arbeit darauf verzichtet (Woolf et al. 1982, Early et al. 1984, Frigerio et al. 1973). Zwar kann eine gaschromatographische Trennung durch eine zusätzliche Derivatisierung der OH-Gruppe mittels Silylierung von 3-Alkylchinoxalinol zu o-Trimethylsilyl-3-Alkylchinoxalinol durchgeführt werden, die entstehenden unpolaren Silylierungsprodukte sind jedoch wegen Konformationsänderungen im Molekül nicht hinreichend stabil. Dadurch kommt es schon nach ca. 20 Minuten zu einer Dekomposition (Tautomerierungsformation) von o-Trimethylsilylchinoxalinol in N-Trimethylsilylchinoxalinol und macht somit reproduzierbare Reihenuntersuchungen verschiedener Proben unmöglich (Frigerio et al. 1973). Auch die von Farshidfar beschriebene gaschromatographische Methodik, die eine qualitativ befriedigende Trennung der Chinoxalinol-Derivate ohne vorherige Silylierung gewährleistet (Farshidfar 1990), ist sowohl für Plasmaproben und vor allem für intrazelluläre Messungen nicht geeignet, da auch hier die erforderliche quantitative Genauigkeit und Sensitivität in den erforderlichen Konzentrationsbereichen nicht gewährleistet ist (Frigerio et al. 1973).

#### **4.1.3 Analytikverfahren zur Quantifizierung der Superoxidation- und Wasserstoff- peroxidbildung sowie der Aktivität der von neutrophilen Granulozyten freigesetzte Myeloperoxidase**

In unserer Arbeitsgruppe wurden neben den vorgegebenen und beschriebenen Untersuchungsbedingungen sowohl die Quantifizierung der freien intrazellulären Aminosäure- wie  $\alpha$ -Ketosäurepools, als auch essentielle granulozytäre Immunfunktionsparameter untersucht. Zur besseren Vergleichbarkeit der Ergebnisse mit früheren Befunden und aktueller

Forschungstätigkeit, wählten wir als Grundlage unserer Untersuchungen bereits etablierte und gängige Analytikverfahren. Die von uns verwendeten Methodiken zur Bestimmung der granulozytären Superoxidanion- und Wasserstoffperoxidbildung sowie die Quantifizierung der von PMN freigesetzten Myeloperoxidaseaktivität vitaler PMN waren hierbei Weiterentwicklungen der von Weening et al., Stangel et al., Pick und Keisari, Schmitt et al. sowie von Krumholz und Mitarbeitern entwickelte und beschriebene Analytikverfahren (Krumholz et al. 1991, 1993, 1995; Pick et al. 1980; Schmitt et al. 1986; Stangel et al. 1986; Weening et al. 1975).

Zur Bestimmung der Superoxidanionbildung wird die von einer definierten Granulozyten-Konzentration extrazellulär freigesetzte Superoxidaniongesamtmenge genutzt, die unter Berücksichtigung eines optimalen Verhältnisses zwischen in der Probe befindlichem Cytochrom C und der eingesetzten PMN-Anzahl ( $0,8 \times 10^6$  PMN/ml) reproduzierbar quantifiziert werden kann. Dabei geht die Superoxidanionbildung durch die Reduktion von im Versuchsansatz befindlichem Cytochrom C durch das generierte Superoxidanion hervor (Ciesla et al. 2000, 2001; Daher et al. 1997; Gonzalez et al. 2001; Ohmori et al. 2000; Patrick et al. 1999, 2000; Ratasirayakorn et al. 1999). Bei Vergleichen verschiedenster Methodiken und theoretischer Effizienzberechnungen kamen wir zu dem Ergebnis, dass der photometrische Nachweis mittels Cytochrom C, verglichen mit alternativen Analytikverfahren, wie z. B. Elektronenspinresonanz-Spintrapping mittels 5,5-Dimethylpyrrolin-N-Oxid (DMPO) oder Serum-PMN-Elastasebestimmung, eine zuverlässige quantitative Aussage über die Superoxidaniongenerierung durch PMN zuläßt (Britigan et al. 1987; Kuwabara et al. 2000). Bei Verwendung durchflußzytometrischer Verfahren, z.B. mittels Dihydrorhodamin 123 sowie Luciginin- oder Luminol-Chemilumineszenzmethodiken zur Bestimmung des respiratory burst kann es zu hohen inter- und intraindividuellen sowie inter-assayabhängigen Schwankungen kommen. Ferner kann durch Bindung und Aufnahme der Prüfsubstanzen an Zellen wie z. B. Monozyten und zelleigene Metabolik nicht exakt berechnet werden, welche radikalen Sauerstoffmetabolite und insbesondere ihre potentiellen Reaktionsprodukte (z. B. HOCl, Peroxynitrit, reaktive Aldehyde) für die beobachteten Effekte sowie die Oxidation der verwendeten Substrate und die daraus erzielte Fluoreszenzaktivität verantwortlich sind (Azadniv et al. 2001; Bednar et al. 1996; Carreras et al. 1993; Hazen et al. 1998; Miller et al. 1997; Tse et al. 2001; Van Pelt et al. 1996). Zur reproduzierbaren photometrischen Bestimmung des von einer definierten Gesamtmenge neutrophiler Granulozyten extrazellulär freigesetzten Wasserstoffperoxid nutzten wir das Meßverfahren

mittels Phenolrot im Gegensatz zu alternativen Meßmethodiken wie z. B. mittels Cytochrom C-Reduktion oder dem bereits erwähnten Elektronenspinresonanz-Spintrapping mittels 5,5-Dimethylpyrrolin-N-Oxid (Britigan et al. 1987, 1992; Dahlgren et al. 1999; Kettle et al. 1994). Dabei wird die durch Meerettich-Peroxidase vermittelte Oxidation von Phenolrot durch Wasserstoffperoxyd genutzt (Chen et al. 1993; Kettle et al. 1994; Maslen et al. 1987). Auch bezüglich der Bestimmung der extrazellulären Aktivität von Granulozyten exozytierter Myeloperoxidase wird die Stimulation einer definierten PMN-Zahl genutzt, um mittels der katalytischen Oxidation eines Chromogens (ABTS) die extrazellulär sezernierte Myeloperoxidaseaktivität reproduzierbar photometrisch bei 405 nm quantifizieren zu können (Barr et al. 1993; Oliveira-Silva et al. 2000; Szutowicz et al. 1984; Trevani et al. 1999). Um eine größtmögliche Vergleichbarkeit der Immunfunktionsbefunde mit den Ergebnissen der intragranulozytären Amino- bzw.  $\alpha$ -Ketosäurebestimmung zu ermöglichen, wurden die von den oben beschriebenen Inkubationsverfahren anderer Arbeitsgruppen allerdings modifiziert. Alle Inkubationsansätze – sowohl bei der Aminosäuren- bzw.  $\alpha$ -Ketosäureuntersuchung – mit denen die Quantifizierung der bereits erwähnten Immunfunktionsparameter gelang, wurden im Vollblut durchgeführt. Dadurch waren wir nicht gezwungen, die Inkubationen mit denen von uns gewählten variablen Inkubationszeiten an isolierten Granulozyten vornehmen zu müssen. So gelang es, alle nachfolgenden PMN-Separations- und PMN-Stimulationsverfahren auf ein für die Analytik notwendiges zeitliches Minimum zu reduzieren.

Aufgrund der Problematik durchgeführter Untersuchungen anderer Arbeitsgemeinschaften, die Sucrose-haltige Dichtegradienten (z. B. Ficoll) verwendet hatten, nutzten wir für die Aminosäure- und  $\alpha$ -Ketosäurebestimmung nötige PMN-Separation einen Sucrose-freien Gradienten, nämlich einen Percoll-Gradienten (Dooley et al. 1982; Koistinen 1987; Ulmer et al. 1984). Hierdurch konnte ausgeschlossen werden, dass adverse Effekte, wie z. B. spontane Formveränderungen der Granulozyten, eine erhöhte PMN-Zelladhäsion an Glas- oder Kunststoffoberflächen (z. B. Polyethylen) eine verminderte Chemotaxis sowie eine vermehrte Expression von Komplementrezeptoren, die eine PMN-Aktivierung auslösen oder vermindern können, auftreten (Bernard et al. 2005; Rebecchi et al. 2000). Zur Vermeidung einer PMN-Aktivierung oder einer Modulation der Granulozyten-Funktion durch mechanische Manipulation sowie wechselnde Temperaturen, wurden alle Probenvorbereitungsverfahren zeitlich und hinsichtlich des chemisch-analytischen Ablaufs optimiert. Trotz aller Vorsichtsmaßnahmen konnte eine Aktivierung der PMN während der Zellseparation durch eine mikro- und makroskopisch sichtbare Granulozyten-Aggregation, die an einer

gesteigerten extrazellulären Myeloperoxidaseaktivität gemessen werden kann, nicht ausgeschlossen werden (Rebecchi et al. 2000). Ferner ist laut Literatur bei solchen Phänomenen eine erhöhte Interleukin-8-Transkription beschrieben (Welters 2002). Aus diesen Gründen wurden diese gut erkennbaren Zellsuspensionen der weiteren Analytik und Auswertung entzogen. Als Chemokin zur Stimulation der von uns untersuchten PMN wurde in der vorliegenden Untersuchung voropsoniertes Zymosan, eine Präparation aus der Zellwand von *Saccharomyces cerevisiae* (griechisch für Zuckerpilz; Knospungs-Hefe, die wie der Prokaryont *Escherichia coli* aufgrund der Verwandtschaft der internen Zellstruktur zu anderen eukaryonten Zellen in der Pflanzen- und Tierwelt ein Modellorganismus in der molekularen Forschung dient) verwendet. Erfahrungen mit vergleichenden Untersuchungen mit alternativen Stimulationsagentien, wie z. B. Tumornekrosefaktor- $\alpha$ , sowie die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigten, dass Zymosan eine qualitativ und quantitativ adäquate sowie reproduzierbare Beurteilung der zellulären Antwort auf proinflammatorische Reize gewährleistet (Albrecht et al. 1993; Bochsler et al. 1992; Cash et al. 2009; Clapperton et al. 1997; Dekaris et al. 1998; Galligan et al. 2000; Kettle et al. 1991; King et al. 1997; Kopprasch et al. 1997; Minczykowski et al. 2001; Miyasaki et al. 1991; Oliveira-Silva et al. 2000; Pyne et al. 2000; Rebecchi et al. 2000; Singh et al. 1997; Ushijima et al. 1997; Wanten et al. 1999).

Wie bei den pathophysiologischen Grundlagen angesprochen, resultiert die immunologische Antwort von neutrophilen Granulozyten aus den Interaktionen dieser Zellen mit Endothelzellen und natürlich den zellulären und immunologischen Prozessen und Wechselwirkungen im Entzündungsgebiet selbst. Eine abschließende Bewertung dieser besonderen immunologischen Gegebenheiten sowie die vielfältigen Wechselwirkungen von Stimulantien und PMN ist durch die Untersuchungen an isolierten Zellpopulationen und auch im Vollblut-Assay nicht möglich, da endotheliale Oberflächen sowie die pathophysiologisch relevanten Faktoren der Entzündungsregion fehlen. Somit kann die Aussagekraft der in unserer Arbeitsgemeinschaft untersuchten granulozytären Immunfunktionen nur begrenzt angesehen werden (Benard 2000; Witko-Sarsat et al. 2000).

## 4.2 Diskussion der pathophysiologischen Bedeutung von Taurin sowie taurinabhängiger Stoffwechselprozesse für PMN-Zellen

Wie zuvor schon erwähnt, beinhalten PMN mit 400 fMol pro Granulozyt eine sehr hohe Taurinkonzentration. Der zelluläre Taurinbestand liegt somit um den Faktor 7-10 höher als der freie Glutamatgehalt. Verglichen mit Taurin ist Hypotaurin mit etwa 14 fMol pro Granulozyt erheblich niedriger konzentriert und damit beträgt der intragranulozytäre Taurin-Hypotaurin Konzentrationsquotient etwa 30:1. Dabei ist zu Beachten, dass Hypotaurin wie auch Taurin, vergleicht man die freien Plasmakonzentrationen, intragranulozytär sehr stark angereichert werden. Nach unseren Ergebnissen betragen die intra- versus extrazellulären Konzentrationsgradienten für Taurin nahezu 100:1 und für Hypotaurin etwa 200:1. Die Erklärung für diesen überaus hohen intragranulozytären Taurin- und Hypotauringehalt im Gegensatz zu anderen Körperzellen findet man einerseits in einer direkten intrazellulären Synthese, andererseits auch in einer sowohl aktiven wie passiven Aufnahme dieser Aminosäuren aus dem Extrazellulärraum (Jacobson et al. 1986; Learn et al. 1990; Stapelton et al. 1998; Tallan et al. 1983). Dabei gibt es verschiedene Möglichkeiten für eine intragranulozytäre Neusynthese von Taurin und Hypotaurin. So können z.B. die Aminosäuren über Decarboxylierung von Methionin und Cystein unter  $\text{CO}_2$ -Abspaltung über Cysteinsulfinsäure bzw. Cysteinsäure bzw. unter  $\text{O}_2$ -Abgabe nach Oxidation von Hypotaurin selbst entstehen (Jacobson et al. 1986; Stapleton et al. 1998). Die Säuregruppen beider Aminosäuren werden, verglichen mit allen anderen physiologischen Aminosäuren, somit nicht von einer  $\text{COOH}$ -Gruppe, sondern von  $\text{SO}_3\text{H}$ - (Taurin) bzw.  $\text{SO}_2\text{H}$ -Gruppen (Hypotaurin) gebildet. Bei Forschungen anderer Arbeitsgruppen mit PMN zeigte sich jedoch, dass die aktive Taurinsequestration aus den extrazellulären Kompartimenten die intrazelluläre Neusynthese um ein Vielfaches, nämlich etwa 9:1, übersteigt (Learn et al. 1990; Porter et al. 1991; Tallan et al. 1983). Dabei können Taurin und Hypotaurin zu ca. 10% direkt durch transmembranöse Diffusion in die Granulozyten gelangen, der Großteil jedoch konkuriert um ein aktives, temperatur- und natriumabhängiges und sättigbares  $\beta$ -Aminosäuretransport- system (Fugelli et al. 1995; Satsu et al. 1999; Thoroed et al. 1994, 1995). Es konnte jedoch auch festgestellt werden, dass sich der aktive Taurintransport qualitativ nicht wesentlich von den Taurin- und Hypotaurin-Aufnahmemechanismen anderer untersuchter Körperzellen unterscheidet (Fugelli et al. 1990; Thoroed et al. 1994, 1995). In Übereinstimmung mit früheren Ergebnissen können

diese Transportmechanismen sowie auch andere essentielle Stoffwechselfunktionen, wie z. B. die oxidative Phosphorylierung zur zellulären Energiegewinnung, pharmakologisch beeinflusst bzw. kompetitiv inhibiert werden, so dass es zu einer intrazellulären Taurin- und Hypotaurindepletion kommt (Ballatori et al. 1992; Banks et al. 1989, 1990). Beispielsweise kann die Sättigung des Taurin-Hypotaurin-Aminosäuretransportsystems mit hohen  $\beta$ -Alanindosen zu signifikanten Verminderungen der intragranulozytären Taurin- und Hypotaurinbestände führen (Stapleton et al. 1998; Tallan et al. 1983; Thoroed et al. 1994, 1995). Ferner konnte in unserer Arbeitsgruppe festgestellt werden, dass nicht nur die mit einer Anaesthetikainkubation verbundene Modulation granulozytärer Stoffwechselprozesse, sondern auch die direkte Beeinflussung des intrazellulären Glutaminmetabolismus eine direkte Abnahme des intrazellulären Taurin- und Hypotauringehalts induziert (Mühling et al. 2007). Dabei kann dieser Effekt durch die Kombination eines medikamentösen Einflusses mit einer Blockade des Aminosäuretransportsystems zu bedeutenden, über die Einzeleffekte hinausgehende Befunde führen. Bei Vorinkubation mittels eines Benzodiazepinrezeptorantagonisten konnten dosisabhängige Aktivierungen von sogenannten peripheren granulozytären Benzodiazepinrezeptoren identifiziert werden, die sich auf die granulozytären Taurin- und Hypotaurinkonzentration auswirken (Cosentino et al. 2000; Finnerty et al. 1991; Marino et al. 2001; Shain et al. 1984). Wir konnten mittels Kombination eines Benzodiazepinrezeptoragonisten mit Methohexital belegen, dass die Aktivierung peripherer Benzodiazepinrezeptoren jedoch nicht die einzige Möglichkeit der granulozytären Signalübertragung bzw. der medikamentösen Einflußnahme ist, sondern auch z. B. die mittels Rezeptorantagonisten aufhebbare Aktivierung von  $\alpha$ - oder  $\beta$ -adrenerger Rezeptoren, wie ebenso die Gabe von Kortikoiden, können meßbare Veränderungen des intrazellulären Tauringehalts induzieren (O'Flaherty et al. 1997; Rylance et al. 1971; Shain et al. 1984; Thoroed et al. 1994, 1995). Wie auch schon in früheren Untersuchungen an unterschiedlichen Zellarten belegen, führt im Gegensatz dazu eine Taurinsupplementierung, trotz hoher intravertus extrazellulärer Gradienten und verbunden mit Abnahme der Hypotaurinkonzentration, zu einer weiteren Anhebung des intragranulozytären Tauringehalts (Jacobson et al. 1986; Kopple et al. 1990; Laidlaw et al. 1987). Die erforderlichen Taurinkonzentrationen sind jedoch hoch und liegen mit  $> 0,5$  mMol sehr deutlich über den physiologischen Plasmakonzentrationen. Dabei ist es möglich diese Effekte pharmakologisch zu beeinflussen, z. B. durch Modulation des zellulären Glutaminstoffwechsels sowie durch Inkubation mit NO-Donoren bzw. eine völlige Umkehr durch Blockade des Aminosäure-

transportsystems mittels  $\beta$ -Alanin (Bridges et al. 2001; Chen et al. 1996; Hada et al. 2000; Saransaari et al. 1998, 1999). Betrachtet man die pathophysiologischen Aufgaben für die eine hohe intrazelluläre Taurin- und Hypotaurinkonzentration benötigt werden, wie z. B. Membranstabilisierung, zelluläre Calciumhomöostase, Stimulation von Glykolyse und Glykogenolyse, Modulation des Zellwachstums sowie Modulation des Sehvorgangs, so scheint dies für Granulozyten vor allem für zelluläre Volumenregulationsmechanismen sowie die Aufrechterhaltung der zellulären Osmoregulation sowie für spezielle metabolische Funktionen im Rahmen der granulozytären Immunreaktion, über die später noch diskutiert wird, essentiell zu sein (Manopolous et al. 1997; Nusetti et al. 2009; Olson et al. 1998; Pasantes et al. 1994, 1997; Schaffer et al. 2000). Diese These bezüglich einer möglichen Beteiligung von Taurin und Hypotaurin an der granulozytären Osmoregulation bzw. zellulären Volumenhomöostase konnte durch die zusätzliche Betrachtung neutraler Aminosäuren und den mit ihnen metabolisch assoziierten  $\alpha$ -Ketosäuren untermauert werden. Ferner war es möglich durch pharmakologisch induzierte Veränderungen des intrazellulären Zellvolumens - speziell der intrazellulären Osmolarität - Konzentrationen weiterer osmoregulatorisch aktiver Metaboliten aufgrund eines erhöhten transmembranösen Taurin-influx bzw. -efflux sowie den intrazellulären Taurinbestand für die Osmose wirksam zu verändern (Jesus et al. 1991; Law RO 1994, 1998; Pasantes et al. 1991). Umgekehrt führen aber auch jede signifikante pharmakologisch-, stoffwechselmodulatorisch- und nutritiv-induzierte Veränderungen der Taurinkonzentrationen zu einer direkten Veränderung der zellulären Volumenhomöostase, was nicht verwunderlich ist, betrachtet man den Taurinanteil von etwa 30% an diesen Volumenregulationsmechanismen (Fugelli et al. 1986, 1990, 1995; Jesus et al. 1991; Thoroed et al. 1994, 1995). Um bei einer taurininduzierten Störung der Zellvolumenhömostase das Zellvolumen ausgleichen zu können, muß die Zelle auf den transmembranösen Flux weiterer osmoregulatorisch aktiver Substanzen zurückgreifen. Dabei sind laut Literatur vor allem die neutralen Aminosäuren Glycin, Serin, Threonin,  $\alpha$ -Aminobutyrat und Alanin bedeutende organische Osmolyte (Chen et al. 1994, 1995; Horio et al. 1997; Pasantes et al. 1994, 1997; Roy G 1994), die über ein aktives energie- und natriumabhängiges Taurintransportsystem (System A) schon früh nach Veränderung der intra- wie extrazellulären Tonizität intrazellulär akkumuliert werden und dann in den Extrazellulärraum sezerniert werden (Kovacs et al. 1989; Lerner J 1987; Mendz et al. 1989). Der Anteil der neutralen Aminosäuren am Gesamtanteil der transmembranös transportierten freien Aminosäuren beträgt dabei je nach Zellart bis zu 80% (Horio et al. 1999; Jesus et al.

1991; Pasantes-Morales et al. 1991). Ebenso kann der Gehalt einzelner neutraler Aminosäuren bei intrazellulärer Akkumulation um das Zwei- bis sogar Zehnfache ansteigen (Horio et al. 1997, 1999). Bei unseren Untersuchungen konnten wir feststellen, dass exogene Modifikationen des intragranulozytären Tauringehaltes direkt konträre Veränderungen der neutralen Aminosäurekonzentration sowie der metabolisch von den neutralen Aminosäuren abgeleiteten  $\alpha$ -Ketosäuren induzieren. Wie auch schon bei früheren Versuchen ist Alanin an diesen Regulationsmechanismen beteiligt. Deutlich wird dies bei einer Taurinsupplementation sowie einer kompetitiven Blockade des Taurintransportsystems mit  $\beta$ -Alanin; beide Mechanismen führen zu parallelen und gegenläufigen Bestandsveränderungen von Serin, Glycin, Threonin und  $\alpha$ -Ketobutyrat. Dabei kompensieren neutrale Aminosäuren die intragranulozytären Taurinveränderungen in den Granulozyten jedoch nicht vollständig, sondern ihr maximaler Anteil an diesen Homöostaseprozessen liegt nur bei 30–40%. Auch bei medikamentös induzierten Taurinveränderungen konnte dieser enge Zusammenhang bestätigt werden (O'Flaherty et al. 1997; Rylance et al. 1971; Shain et al. 1984). Im Hinblick auf den intrazellulären Alaninspiegel sowie die mit neutralen Aminosäurestoffwechsel physiologisch eng verbundenen  $\alpha$ -Ketosäuren, kommt es zu einer Entkopplung dieser Bindung, wobei eine zusätzliche und nur sekundär osmotisch begründete Beeinflussung anderer wichtiger (z. B. glutaminabhängige) zellulärer Stoffwechselprozesse vermutlich ursächlich sind. Diese Effekte sind ebenso wie die Taurinveränderungen selbst benzodiazepinrezeptorvermittelt. Weitere bedeutende Befunde zeigt auch die hohe Abhängigkeit der zuvor beschriebenen Effekte von einer pathophysiologisch nicht beeinträchtigten Stoffwechsellage bzw. einem ausgewogenen Verhältnis an inter- und intrazellulären Signalmolekülen bzw. Botenstoffen. Eine signifikante Beeinflussung der intrazellulären Taurinkonzentration der PMN, sowie eine fast vollständige Aufhebung der engen Beziehung zwischen Taurin bzw. Hypotaurin und den neutralen Aminosäuren, wie auch ihren metabolisch verbundenen  $\alpha$ -Ketosäuren kann durch eine spezifische Einflußnahme auf granulozytäre glutamin-, NO- und ornithinvermittelte Zellstoffwechselprozesse induziert werden (Ballatori et al. 1992; Banks et al. 1989, 1990; Chen et al. 1996; Ohkuma et al. 1996; Porter et al. 1992). Obwohl Taurin bzw. Hypotaurin weder in der zellulären Proteinsynthese, noch als Stoffwechselsubstrat wichtiger Aminosäurestoffwechselzyklen dient, werden die Vermutungen einer bedeutenden stoffwechselmodulatorischen Funktion in den letzten 10 Jahren immer lauter (Aruoma et al. 1988; Cassol et al. 2009; Green et al. 1991; Stapleton et al. 1997). Tatsächlich finden sich hohe intrazelluläre Taurinkonzentrationen vorwiegend in Geweben bzw. Zellen, die entweder

selbst bakterizide, fungizide oder viruzide Metabolite produzieren oder solche, die pathophysiologischerweise häufig einen direkten Kontakt zu inflammatorischen Geschehen besitzen (Stapleton et al. 1996, 1998). Zur Fragestellung einer möglichen Beteiligung Taurins an sogenannten zell-, granula-, vakuolen- bzw. phagolysosom-membranisierenden Prozessen bei PMN gibt es ein pathophysiologisch bedeutendes Erklärungsmodell (Masuda et al. 1984, 1986): Taurin könnte für ROS-sezernierende Zellen sowie für die extragranulozytäre inflammatorische Matrix und den dort befindlichen Gewebe- und Organzellen als Radikal- und Substratfänger fungieren, der Zell- und Membranbausteine bzw. zelluläre Stoffwechselprodukte vor den aggressiven reaktiven Sauerstoffradikalen sowie anderen Sezernierungs- und Degranulationsprodukten schützt, die parallel zur Vernichtung pathogener Agentien auftreten (Marcinkiewicz et al. 1995, 1998; Thomas et al. 1985). Unter diesem Aspekt hätten Veränderungen des intra- und extrazellulären Taurinbestandes direkte Auswirkungen auf das inflammatorische Geschehen selbst bzw. auf intra- sowie auch extrazellulär sezernierte Immunfunktionsparameter (Grisham et al. 1984; Kim et al. 1996; Masuda et al. 1984; Nakajima et al. 2009; Stapleton et al. 1998). Diese Thesen werden durch die Ergebnisse der hier vorliegenden Forschungsarbeit unterstützt. Wie die Ergebnisse zeigen, besteht eine hohe Abhängigkeit der hier untersuchten und in die extrazelluläre Matrix sezernierten Immunfunktionsparametern, z. B. führt die mit einer Taurinsupplementierung verbundene Erhöhung (> 0,2 mMol) des intrazellulären Taurinspiegels zu dosis- und inkubationszeitabhängigen Abnahmen von granulozytär sezerniertem Superoxidanion und Wasserstoffperoxid. Ferner kommt es zu einer parallelen Anhebung in der Enzymaktivität der von neutrophilen Granulozyten extrazellulär sezernierten Myeloperoxidase. Im Gegensatz zu  $\beta$ -Alanin induziert eine reduzierte intrazelluläre Taurinkonzentration durch kompetitive Hemmung des transmembranösen Taurintransports zu gegensätzlichen Befunden (Park et al. 1997; Zhang et al. 1998). Auch die parallel medikamentös, stoffwechselmodulatorisch bzw. nutritiv bedingte Modifikation des intragranulozytären Taurinspiegels bestätigen die Abhängigkeit extragranulozytär sezernierter Immunfunktionsparameter von intrazellulären Taurinveränderungen. Diese immunologischen Befunde lassen sich in verschiedenen sowohl in vitro als auch in vivo Untersuchungen wiederholen, jedoch finden sich bislang keine effizienten Ursachen sowie Symptome einer modifizierten Immunantwort der Granulozyten durch Taurin bzw. Hypotaurin in der Literatur. So konnten in vitro Untersuchungen verschiedener Arbeitsgruppen nachweisen, dass eine Taurinsupplementierung bei Granulozyten zu einer signifikanten Reduktion der zymosan- bzw. luminolabhängigen

Chemilumineszenz sowie zu einem Anstieg der Myeloperoxidasereaktivität im Kulturmedium führt (Bednar et al. 1996; McLoughlin et al. 1991; Raschke et al. 1995; Shimizu et al. 2009). Anderen gelang es, eine granulozytär vermittelte Erythrozytenlyse bzw. Abtötung eines ubiquitär vorkommenden Hefepilzes (*Candida albicans pseudohyphae*) fast komplett zu verhindern, indem nach vorrausgegangener Zymosanaktivierung Taurin in das verwendete microtiter plate killing assay gegeben wurde (Dallegrì et al. 1987; Wagner et al. 1986). Ferner induzierten diätetische Veränderungen des körperl- und zelleigenen Taurinbestandes – wie im Tierversuch mit Ratten und Katzen, die mit taurinangereicherter und taurinfreier Nahrung gefüttert wurden – Veränderungen in der von polymorphkernigen Granulozyten generierten ROS-Produktion sowie der Phagozytose pathogener Keime wie *Staphylococcus epidermidis* – ein grampositives, plasmakoagulase-negatives saprogenes Bakterium, das die menschliche Haut und Schleimhaut besiedelt – (Schuller-Lewis et al. 1990, 1994, 1995). Daraus kann eine durch eine Taurindepletion induzierte Aktivierung der Leukozyten sowie umgekehrt durch eine Taurinsupplementation eine Reduktion immunologischer Funktionen der PMN abgeleitet werden (Schuller-Levis et al. 1992). Eine Erklärung der Aktivierung findet sich hier in der reduzierten ROS-Radikalfängerfunktion, induziert durch die intra- bzw. extrazelluläre Taurindepletion. Die in unserer Arbeitsgemeinschaft erarbeiteten Befunde sowie auch die in früheren Arbeiten beobachteten Befunde stützen somit bisher veröffentlichte Daten und die daraus getroffene Hypothese, dass sowohl intrazellulär akkumuliertes und im Rahmen der Granulozyten-Aktivierung womöglich auch nach extrazellulär sezerniertes Taurin, ebenso wie eine diätetische Erhöhung der extrazellulären Taurinbestände selbst, antioxidative Funktionen besitzt, indem es mittels Myeloperoxidase aus  $H_2O_2$  (superoxiddismutasevermittelt aus  $O_2^-$  und  $Cl^-$ ) gebildetes HOCL in Form von Taurinchloramin ( $Cl-NH_2-CH_2-CH-SO_3H$ ) komplexiert und dass die intrazelluläre und die nach extrazellulär sezernierte Myeloperoxidaseaktivität sehr eng mit den intra- und perigranulozytären Taurinbeständen verbunden ist (Bozeman et al. 1992; Masuda et al. 1984; Redmond et al. 1998; Schuller et al. 1994; Weiss et al. 1982). Bei dieser Reaktion könnte Taurin im Zuge einer ausgeprägten Aktivierung der Granulozyten sowohl die Aufrechterhaltung der Enzymaktivität sowie auch den Schutz der extrazellulären Matrix und der PMN selbst vor einem schädlichen Angriff toxischer Metabolite gewährleisten (Cunningham et al. 1998; Grisham et al. 1984; Stapleton et al. 1998; Thomas et al. 1985). Eine Inhibierung der in der extrazellulären Matrix gemessenen Myeloperoxidaseaktivität kann hauptsächlich durch HOCL erfolgen (Bozeman et al. 1992; Coble et al. 1984). Dies wiederum kann durch hohe Gaben von Taurin als Antidot aufgehoben werden und zeigt so auch eine

protektive Funktion für die Aufrechterhaltung der Myeloperoxidaseaktivität (Marcinkiewicz et al. 1995, 1998; Marquez et al. 1994; Schuller et al. 1994; Stapleton et al. 1998). Die Granulozyten besitzen jedoch einen Kontrollmechanismus der taurininduzierte Erhöhungen der Myeloperoxidaseaktivität, indem eine progrediente Taurinchloraminbildung die gemessene Enzymaktivität inhibiert (Marcinkiewicz et al. 1995, 1998; Naskalski et al. 1977; Stapleton et al. 1998). Bei Betrachtung der vielseitigen immunologischen Funktionen des  $O_2^-$  / $H_2O_2$ /MPO/ $Cl^-$  Systems der PMN - wie z. B. Bekämpfung pathogener Agentien - zeigt sich jedoch auch eine negative Seite (Coble et al. 1984; Marcinkiewicz et al. 1995, 1998; Redmond et al. 1998; Weiss et al. 1982; Witko-Sarsat et al. 2000). Gerade das aus der Myeloperoxidasereaktion via  $H_2O_2$  gebildete HOCl besitzt nicht nur die Fähigkeit Bakterien zu vernichten, sondern auch fast alle zell- und gewebeeigenen Bestandteile zu oxidieren sowie als Substrat zur Entstehung weiterer reaktiver Metabolite bzw. auch als proinflammatorischer Mediator im Rahmen der Aktivierung von Komplement oder Makrophagen zu fungieren (Anderson et al. 1997; Hazen et al. 1998; Podrez et al. 2000; Redmond et al. 1998; Schmitt et al. 1999; Vogt et al. 1994, 1996). Wie zuvor erwähnt, ist die mit HOCl verbundene Toxizität nicht nur auf bakterielle, virale oder tumoreigene Membranen bzw. Stoffwechselprodukte beschränkt, sondern kann sich auch gegen körpereigene Bausteine richten (Stapleton et al. 1998; Weiss et al. 1982). Bei einer gestörten Funktion der notwendigen Schutzmechanismen und Antioxidantienfunktion – wie z. B. Katalase, Vitamin A, C und E, Glutathion-Peroxidase oder auch  $\beta$ -Karotin – kann es durch das übermäßig produzierte ROS der aktivierten Granulozyten zu einer Schädigung körpereigener Gewebe und Zellen kommen (Grimble 1995, 1996, 1999, 2000). Hier könnte nun Taurin im Rahmen seiner immunologischen Funktionen als bedeutender intra- und extrazellulärer Radikalfänger eingesetzt werden, vor allem bei spezifischen Erkrankungen, bei denen es zu einer erhöhten ROS-Produktion kommt (Ahn et al. 2001; Marquez et al. 1994; Park et al. 1998, 2002; Son et al. 1996; Stapleton et al. 1997, 1998). Bei Betrachtung schwerer, akuter oder auch chronisch andauernder Entzündungen sowie Erkrankungen zeigt sich ein niedriger intra- und extrazellulärer Tauringehalt, der durch eine erhöhte Taurinsequestration immunologisch aktivierter Zellen erklärt werden könnte (Masuda et al. 1984, 1986; Neary et al. 1997; Schuller-Levis et al. 1995; Schuller et al. 1994; Stapleton et al. 1996). Forschungsergebnisse mit diätetischer Taurindepletion weisen auf eine mögliche pathophysiologische Taurinunentbehrlichkeit körpereigener Zellen und Gewebe bei entzündlichen Geschehen hin (Cassol et al. 2009; Coëffier et al. 2009; Schuller-Levis et al. 1995; Schuller et al. 1994;

Shimizu et al. 2009; Vinton et al. 1986, 1987). So z. B. ist es im Tierversuch durch eine nutritive Reduktion des intra- und extrazellulären Taurinbestandes unter zur Hilfe nahme entzündungsbegünstigender Mediatoren – wie NO<sub>2</sub>, Tumornekrosefaktor- $\alpha$  und Nitrit – ein Zusammenhang mit dem Auftreten von Lungenödemen und interstitiellen Lungenfibrosen festzustellen (Bhavasara et al. 2009; Gordon et al. 1998; Schuller-Levis et al. 1995, 2009; Schuller et al. 1994; Xu et al. 2008). Dabei konnte bewiesen werden, dass derartige Effekte durch die Gabe von Taurin teils wieder reversibel sind bzw. nach vorheriger Taurinsubstitution nur abgeschwächt oder sogar gar nicht induzierbar sind (Gordon et al. 1986, 1992, 1998; Schuller-Levis et al. 1995, 2009). Ferner scheint bei Betrachtung des ischämischen Erkrankungskreises wie im Experiment mit Ratten myokardial induzierter Reperfusionsschäden und Epithelzellnekrosen, medikamentös durch z. B. dem Antibiotikum Bleomycin oder dem Klasse II Betablocker Amiodaron sowie pro-inflammatorisch durch Interferon oder Lipopolysaccharide vermittelte Entzündungsreaktion mit Kollagendeposition- und Lipidperoxidationssyndromen Taurin eine protektive und immun- bzw. stoffwechselmodulatorische Funktionen zu besitzen (Kendler 1989; McCarty et al. 1999; Raschke et al. 1995; Simmonds et al. 1992; Son et al. 1996; Suleiman et al. 1993, 1994; Venturini et al. 2009; Wójcik et al. 2009; Xu et al. 2008). Allerdings konnten diese ersten Ergebnisse noch nicht bei allen bis jetzt untersuchten Erkrankungsformen ausreichend verifiziert werden (Barry et al. 1997; Niessen et al. 1998; Stapleton et al. 1997). D. h., obwohl neben den eigenen Ergebnissen auch unterschiedliche wissenschaftliche Ansätze sowie bereits Ergebnisse über eine therapeutische Nutzung von Taurin – wie eine taurinreduzierte Diät - existieren, kann eine abschließende Beurteilung über den medizinischen Einsatz bei mit intra- und extrazellulären Taurinveränderungen assoziierten Erkrankungen noch nicht getroffen werden. Desweiteren gibt es zu diesem Zeitpunkt keine effizienten Befunde betreffend der exakten stoffwechselphysiologischen Bedeutung Taurins sowie der intrazellulären Metabolisierung in Körperzellen, Geweben und Organen. Um diese Fragen hinsichtlich eines möglichen therapeutischen Einsatzes ausreichend unter Berücksichtigung der exakten metabolischen und stoffwechselregulatorischen Eigenschaften von Taurin und Hypotaurin sowie der mit ihnen assoziierten Stoffwechselfunktionen zu beantworten, müssen noch weitere Forschungen betrieben werden.

---

## 5 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

Die von uns genutzten Untersuchungsverfahren durch Verbesserung bereits bestehender Methodiken erstmals eine quantitative, hochexakte und reproduzierbare Aminosäureanalytik freier intrazellulärer Aminosäuren und  $\alpha$ -Ketosäuren in neutrophilen Granulozyten. Bei Betrachtung einer möglichst geringen erforderlichen Probenmenge, der schonenden PMN-Separation, der Probenvorbereitung und einer möglichst langen Probenhaltbarkeit sowie der genutzten Fluoreszenz-Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie-Verfahren erfüllen diese den erforderlichen Anforderungen einer sehr sensitiven und vollwertigen intrazellulären Aminosäuren- und  $\alpha$ -Ketosäurebestimmung. Im Rahmen des in dieser Arbeit untersuchten Taurins bzw. Hypotaurins zeigt sich hier eine verstärkte intragranulozytäre Akkumulation sowie bei einem Vergleich mit ihren plasmatischen Vorkommen einen hohen Konzentrationsgradienten. Ferner weisen weiterführende Untersuchungen auf eine hohe stoffwechselphysiologische Bedeutung - d. h. relevante metabolische und nutritive Funktionen – Taurins hin, vor allem im Rahmen der Aufrechterhaltung einer intrazellulären Aminosäure- und  $\alpha$ -Ketosäuresubstrathomöostase sowie für die besonderen Stoffwechselanforderungen und pathophysiologischen Erfordernisse von Granulozyten. Obwohl hier ein direkter Zusammenhang bei den gemessenen immunologischen Veränderungen nur vermutet werden kann und Modulationen der freien Taurin- und Hypotaurinkonzentration nicht zwangsläufig die Beeinflussung spezifischer pathophysiologischer Stoffwechselwege der PMN wiedergeben müssen, kann jedoch bei Betrachtung der bis jetzt erlangten Forschungsergebnisse angenommen werden, dass diätetisch sowie pharmakologisch oder auch stoffwechselmodulatorisch induzierte Konzentrationsveränderungen von freiem Taurin und Hypotaurin innerhalb der PMN-Zellen bedeutende stoffwechselphysiologische Determinanten darzustellen scheinen, die die Intensität und Qualität der granulozytären Immunantwort positiv, aber auch negativ verändern können.

Für die klinisch-therapeutische Nutzung im Rahmen erwähnter Erkrankungsformen, wie z.B. Leberzirrhose, Nephrotischem Syndrom, Lungenfibrose oder Sepsis im Allgemeinen, könnten diese Ergebnisse von großer Bedeutung sein. So kann gerade bei Patienten mit bereits bestehenden krankheitsbedingten Veränderungen intrazellulärer Stoffwechselreaktionen sowie des systemischen und intrazellulären Substrathaushaltes die Störung zellulärer Aminosäurestoffwechselprozesse in Kombination mit dem Verlust einer suffizienten Amino-

und  $\alpha$ -Ketosäuresubstrathomöostase induziert durch eine medikamentöse Therapie weitere pathologische Veränderungen der granulozytären Integrität und Funktion verursachen. Hier können nun mit einer Substitution spezieller Aminosäuren (wie in dieser Arbeit das beschriebene Taurin und Hypotaurin) im Rahmen der unterschiedlichen Aufgabenbereiche der Granulozyten bedeutende stoffwechselphysiologische und immunfunktionelle Veränderungen induziert werden. Jedoch müssen die therapiebedingten metabolischen und stoffwechselphysiologischen Auswirkungen auf den intragranulozytären Amino- und  $\alpha$ -Ketosäurestoffwechsel noch weiter erforscht werden, da die bislang verfügbaren Daten eine abschließende Bewertung über einen grundsätzlichen therapeutischen Einsatz von Taurin und Hypotaurin noch nicht zulassen. Gerade vor dem Hintergrund der immunologischen Funktionen migrationsfähiger Zellen wie Granulozyten muß beachtet werden, dass die Aktivierung der Funktionen der PMN-Zellen nicht nur einen positiven Effekt auf die inflammatorische Situation haben kann, sondern auch eine zusätzliche Schädigung körpereigener Zellen und Gewebe induzieren kann. Dies ist dann von besonderer therapeutischer Relevanz, wenn zelluläre sowie matrixabhängige Abwehrmechanismen nicht ausreichend wirken bzw. durch die Entzündung selbst pathologisch verändert sind. Weitere Forschungstätigkeit wird erforderlich sein, um alle hier angesprochenen Fragen auch vor dem Hintergrund einer Rechtfertigung zusätzlicher Therapiekosten hinreichend klären zu können.

## 6 SUMMARY

Aim of the study was to improve already existing methods for quantitatively high - accurate and reproducible amino acid analytics of free intracellular amino acids and alpha-keto acids in neutrophils (PMN). Here as small sample quantity as possible, a careful PMN-separation as well as sample-preparation and as long a sample durability as possible to be ensured. We will support based on the results of Fuchs and his staff (Fuchs et al., 1990), a reversed-phase high-performance-liquid chromatography with o-Phthalaldehyde (OPA) for free as Fluorophor and derivating test. Furthermore the objective of this study was the determination of the alterations in PMN free intracellular alpha-keto acid profiles and immune function induced by taurine and the required dose as well as duration of exposure dependent taurine. Incubation with taurine resulted in lower intracellular pyruvate and alpha-ketobutyrate levels, decreased  $O_2^-$  and  $H_2O_2$ -formation and a concomitant significantly increased MPO activity. For that reason we believe that considerable changes in neutrophil free-alpha-keto-acid profiles, induced by taurine, may be one of the determinants in cell nutrition that considerably modulates the immunological competence of PMN.

The results would be very important for treatment of some disease (lungfibrosis, nephrotic syndrom), concerning disease depending errors of metabolic reactions. It's possible that patients with already existing dysfunction in their aminoacid metabolism develop accessory changes of the granulocytic functions. The substitution of specific aminoacids may induce positive effects in this concern, but an additional analysis is necessary.

---

## 7 LITERATUR

- Ahn BO, Kim KH, Lee G, Lee HS, Kim CD, Kim YS. Effects of taurine on cerulein-induced acute pancreatitis in the rat. *Pharmacology* 2001; 63(1):1-7.
- Akgul C, Moulding DA, Edwards SW. Molecular control of neutrophil apoptosis. *FEBS Lett* 2001; 487(3):318-322.
- Al-Sawaf HA, al-Ghamdi MA, al-Bekairi AM, Tawfik AF, Abu-Jayyab AR. Changes in free amino acids in peripheral blood (PB) lymphocytes and polymorphonuclear (PMN) leukocytes after treatment with diazepam. *Int J Immunopharmacol.* 1993 Apr;15(3):455-62.
- Albrecht D, Jungi TW. Luminol-enhanced chemiluminescence induced in peripheral blood-derived human phagocytes: obligatory requirement of myeloperoxidase exocytosis by monocytes. *J Leukoc Biol* 1993; 54(4):300-306.
- Anderson MM, Hazen SL, Hsu FF, Heinecke JW. Human neutrophils employ the myeloperoxidase-hydrogen peroxide-chloride system to convert hydroxy-amino acids into glycolaldehyde, 2-hydroxypropanal and acrolein. A mechanism for the generation of highly reactive alpha-hydroxy and alpha, beta-unsaturated aldehydes by phagocytes at sites of inflammation. *J Clin Invest* 1997; 99(3):424-432.
- Aruoma OI, Halliwell B, Hoey BM, Butler J. The antioxidant action of taurine, hypotaurine and their metabolic precursors. *Biochem J* 1988; 256(1):251-255.
- Azadniv M, Torres A, Boscia J, Speers DM, Frasier LM, Utell MJ. Neutrophils in lung inflammation: Which reactive oxygen species are being measured? *Inhal Toxicol* 2001; 13(6):485-495.
- Babior BM. Phagocytes and oxidative stress. *Am J Med* 2000; 109(1):33-44.
- Ballatori N, Boyer JL. Taurine transport in skate hepatocytes. II. Volume activation, energy and sulfhydryl dependence. *Am J Physiol* 1992; 262(3 Pt 1):G451-G460.
- Ballatori N, Boyer JL. Taurine transport in skate hepatocytes. I. Uptake and efflux. *Am J Physiol* 1992; 262(3 Pt 1):G445-G450.
- Banks MA, Martin WG, Pailes WH, Castranova V. Taurine uptake by isolated alveolar macrophages and type II cells. *J Appl Physiol* 1989; 66(3):1079-1086.
- Banks MA, Porter DW, Martin WG, Castranova V. Effects of in vitro ozone exposure on peroxidative damage, membrane leakage and taurine content of rat alveolar macrophages. *Toxicol Appl Pharmacol* 1990; 105(1):55-65.
- Barr DP, Aust SD. On the mechanism of peroxidase-catalyzed oxygen production. *Arch Biochem Biophys* 1993; 303(2):377-382.
- Barry MC, Kelly CJ, Abdih H, Watson RW, Stapleton P, Sheehan SJ. Differential effects of lower limb revascularisation on organ injury and the role of the amino acid taurine. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 1997; 13(2):193-201.
- Baron DN, Ahmed SA. Intracellular concentration of water and of the principal electrolytes determined by analysis of isolated human leucocytes. *Clin Sci* 1969;37(1):205-219.
- Bednar MM, Balazy M, Murphy m, Booth C, Fuller SP, Barton A. Peroxynitrite augments fMLP-stimulated chemiluminescence by neutrophils in human whole blood. *J Leukoc Biol* 1996; 60(5):619-624.
- Benard S. Chemisches Signal und Biologische Antwort. Modulation der Generierung reaktiver Sauerstoffverbindungen aus neutrophilen Granulozyten. Akademische Verlagsanstalt Engelsdorf, Leipzig, 2000.
- Benbarek H, Grulke S, Deby-Dupont G, Deby C, Mathy-Hartert M, Caudron I. Cytotoxicity of stimulated equine neutrophils on equine endothelial cells in culture. *Equine Vet J* 2000; 32(4):327-333.
- Bender DA. Amino acid metabolism. Second Edition ed. Chichester, New York, Brisbane, Toronto, Singapore: 1985
- Bernard L, Vaudaux P, Merle C, Stern R, Huggler E, Lew D, Hoffmeyer P. The inhibition of neutrophil antibacterial activity by ultrahigh molecular weight polyethylene particles. *Biomaterials.* 2005 Sep;26(27):5552-7.
-

- 
- Bhavsar TM, Cantor JO, Patel SN, Lau-Cam CA. Attenuating effect of taurine on lipopolysaccharide-induced acute lung injury in hamsters. *Pharmacol Res.* 2009 Nov; 60(5):418-28.
- Biolo G, Toigo G, Ciocchi B, Situlin R, Iscra F, Gullo A. Metabolic response to injury and sepsis: changes in protein metabolism. *Nutrition* 1997; 13(9 Suppl):52S-57S.
- Bochsler PN, Slauson DO, Neilsen NR. Secretory activity of equine polymorphonuclear leukocytes: stimulus specificity and priming effects of bacterial lipopolysaccharide. *Vet Immunol Innumopathol* 1992; 31(3-4):241-253.
- Borhani M, Helton WS. Antioxidants in critical illness. In: Pichard C, Kudsk KA, editors. *From nutrition support to pharmacologic nutrition in the ICU*. Berlin, Heidelberg, New York: Springer Verlag, 2000:80-91.
- Borregaard N, Theilgaard-Monch K, Sorensen OE, Cowland JB. Regulation of human neutrophil granule protein expression. *Curr Opin Hematol* 2001; 8(1):23-27.
- Borregaard N, Cowland JB. Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. *Blood* 1997; 89(10):3503-3521.
- Borregaard N, Kjeldsen L, Lollike K, Sengelov H. Granules and vesicles of human neutrophils. The role of endomembranes as source of plasma membrane proteins. *Eur J Haematol* 1993; 51(5):318-322.
- Borregaard N, Lollike K, Kjeldsen L, Sengelov H, Bastholm L, Nielsen MH. Human neutrophil granules and secretory vesicles. *Eur J Haematol* 1993; 51(4):187-198.
- Bozeman PM, Learn DB, Thomas EL. Inhibition of the human leukocyte enzyme myeloperoxidase and eosinophil peroxidase by dapsone. *Biochem Pharmacol* 1992; 44(3):553-563.
- Bridges CC, Ola MS, Prasad PD, El Sherbeny A, Ganapathy V, Smith SB. Regulation of taurine transporter expression by NO in cultured human retinal pigment epithelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001; 281(6):C1825-C1836.
- Britigan BE, Roeder TL, Shasby DM. Insight into the nature and site of oxygen-centered free radical generation by endothelial cell monolayers using a novel spin trapping technique. *Blood* 1992; 79(3):699-707.
- Britigan BE, Cohen MS, Rosen GM. Detection of the production of oxygen-centered free radicals by human neutrophils using spin trapping techniques: a critical perspective. *J Leukoc Biol* 1987; 41(4):349-362.
- Bulger EM, Helton WS. Nutrient antioxidants in gastrointestinal diseases. *Gastroenterol Clin North Am.* 1998 Jun;27(2):403-19.
- Burg ND, Pillinger MH. The neutrophil: function and regulation in innate and humoral immunity. *Clin Immunol.* 2001 Apr;99(1):7-17.
- Canepa A, Perfumo F, Carrea A, Sanguineti A, Piccardo MT, Gusmano R. Measurement of free amino acids in polymorphonuclear leukocytes by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr* 1989; 491(1):200-208.
- Carrea A, Canepa A, Perfumo F, Ancarani P, Verrina E, Gusmano R. Proteolytic activity and free amino acid concentrations in polymorphonuclear leukocytes. *Ann Clin Biochem.* 1993 Nov;30 (Pt 6):559-64.
- Carreras MC, Pargament GA, Catz SD, Poderoso JJ, Boveris A. Kinetics of nitric oxide and hydrogen peroxide production and formation of peroxynitrite during the respiratory burst of human neutrophils. *FEBS Lett* 1994; 341(1):65-68.
- Cash JL, White GE, Greaves DR. Chapter 17. Zymosan-induced peritonitis as a simple experimental system for the study of inflammation. *Methods Enzymol.* 2009; 461:379-96.
- Cassol OJ Jr, Rezin GT, Petronilho FC, Scaini G, Gonçalves CL, Ferreira GK, Roessler R, Schwartzmann G, Dal-Pizzol F, Streck EL. Effects of N-Acetylcystein/Deferoxamine, Taurine and RC-3095 on Respiratory Chain Complexes and Creatine Kinase Activities in Rat. *Neurochem Res.* 2009 Nov 13.
- Chen DZ, Ohkuma S, Kuriyama K. Characteristics of oxide-evoked [3H] taurine release from cerebral cortical neurons. *Neurochem Int* 1996; 28(5-6):601-607.
- Chen JG, Kempson SA. Osmoregulation of neutral amino acid transport. *Proc Soc Exp Biol Med* 1995; 210(1):1-6.
- Chen JG, Klus LR; Steenbergen DK, Kempson SA. Hypertonic upregulation of amino acid transport system A in vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol* 1994; 267(2Pt 1):C529-C536.
-

- 
- Chen TP, Roberts RL, Wu KG, Ank BJ, Stiehm ER. Decreased superoxide anion and hydrogen peroxide production by neutrophils and monocytes in human immunodeficiency virus-infected children and adults. *Pediatr Res* 1993; 34(4):544-550.
- Ciesla DJ, Moore EE, Musters RJ, Biffl WL, Silliman CA. Hypertonic saline alteration of the PMN cytoskeleton: implications for signal transduction and the cytotoxic response: *J Trauma* 2001; 50(2):206-212.
- Ciesla DJ, Moore EE, Gonzalez RJ, Biffl WL, Silliman CC. Hypertonic saline inhibits neutrophil (PMN) priming via attenuation of p38 MAPK signaling. *Shock* 2000; 14(3):265-269.
- Ciesla DJ, Moore EE, Zallen G, Biffl WL, Silliman CC. Hypertonic saline attenuation of polymorphonuclear neutrophil cytotoxicity: timing is everything. *J Trauma* 2000; 48(3):388-395.
- Clapperton M, Rolando N, Sandoval L, Davies E, Williams R. Neutrophil superoxide and hydrogen peroxide production in patients with acute liver failure. *Eur J Clin Invest* 1997; 27(2):164-168.
- Clark RA. Activation of the neutrophil respiratory burst oxidase. *J Infect Dis* 1999; 179 Suppl 2S309-17.
- Coble BI, Dahlgren C, Hed J, Stendahl O. Myeloperoxidase reduces the opsonizing activity of immunoglobulin G and complement C3b. *Biochem Biophys Acta* 1984; 802(3):501-505.
- Coëffier M, Marion-Letellier R, Déchelotte P. Potential for amino acids supplementation during inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel dis.* 2009 Jul 1.
- Cosentino M, Marino F, Cattaneo S, Di Grazia L, Francioli C, Fietta AM. Diazepam-binding inhibitor-derived peptides induce intracellular calcium changes and modulate human neutrophil function. *J Leukoc Biol* 2000; 67(5):637-643.
- Cramer EB. Cell biology of phagocyte migration from bone marrow, out of the bloodstream and across organ epithelia. In: Galin JI, Goldstein IM, Snyderman R, editors. *Inflammation: Basic principle and clinical correlates*, second edition. New York: Raven Press, 1994:341-351.
- Cunningham C, Tipton KF, Dixon HB. Conversion of taurine into N-chlorotaurine (taurine chloramine) and sulphoacetaldehyde in response to oxidative stress. *Biochem J* 1998; 330(Pt 2):939-945.
- Curi R, Newsholme P, Pithon-Curi TC, Pires-de-Medo M, Garcia C, Homem-de-Bittencourt Junior PI. Metabolic fate of glutamine in lymphocytes, macrophages and neutrophils. *Braz J Med Biol Res* 1999; 32(1):15-21.
- Daher AH, Fortenberry JD, Owens ML, Brown LA. Effects of exogenous nitric oxide on neutrophil oxidative function and viability. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1997; 16(4):407-412.
- Dahlgren C, Karlsson A. Respiratory burst in human neutrophils. *J Immunol Methods* 1999; 232(1-2):3-14.
- Dallegri F, Ottonello L. Tissue injury in neutrophilic inflammation. *Inflamm Res* 1997; 46(10):382-391.
- Dallegri F, Ballestrero A, Frumento G, Patrone F. Augmentation of neutrophil-mediated erythrocyte lysis by cells derived in vitro from human monocytes. *Blood* 1987; 70(6):1743-1749.
- Dallegri F, Frumento G, Ballestrero A, Gorreti R, Patrone F. Relationship between antibody-dependent tumour cell lysis and primary granule exocytosis by human neutrophils. *Clin Exp Immunol* 1987, 70(2):479-483.
- Davis JS, Darcy CJ, Piera K, McNeil YR, Woodberry T, Anstey NM. Ex-vivo changes in amino acid concentrations from blood stored at room temperature or on ice: implications for arginine and taurine measurements. *BMC Clin Pathol.* 2009 Nov 27; 9:10.
- Dekaris I, Marotti T, Sprong RC, van Oirschot JF, van Asbeck BS. Hydrogen peroxide modulation of the superoxide anion production by stimulated neutrophils. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 1998; 20(1):103-117.
- Dooley DC, Simpson JF, Meryman HT. Isolation of large numbers of fully viable human neutrophils: a preparative technique using percoll density gradient centrifugation. *Exp Hematol* 1982; 10(7):591-599.
- Early RJ, James R, Thompson R. Branched-chain alpha-ketoacid analysis in biologic fluids. *J Chromatogr* 1984; 310:1-10.
- Edwards SW. *Biochemistry and physiology of the neutrophil.* Cambridge University Press, Cambridge, 1995.
- Edwards SW, Watson F. The cell biology of phagocytes. *Immunol Today.* 1995 Nov;16(11):508-10.
- Eggleton P, Gargan R, Fisher D. Rapid method for the isolation of neutrophils in high yield without the use of dextran or density gradient polymers. *J Immunol Methods* 1989; 121(1):105-113.
-

- Einarsson S, Josefsson B, Lagerkvist S. Determination of amino acids with 9-Fluorenylmethylchlorformate and RP-HPLC. *J Chromatogr* 1983; 282:609-618.
- Engelhardt H. *Praxis der Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie*. Verlag Springer, Heidelberg, 1. Auflage, 1986.
- Evans TJ, Buttery LD, Carpenter A, Springall DR, Polak JM, Cohen J. Cytokine-treated human neutrophils contain inducible nitric oxide synthase that produces nitration of ingested bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93(18):9553-9558.
- Faldt J, Dahlgren C, Ridell M, Karlsson A. Priming of human neutrophils by mycobacterial lipoarabinomannans: role of granule mobilisation. *Microbes Infect* 2001; 3(13):1101-1109.
- Farshidfar G. *Vergleichende Untersuchungen zur Bestimmung von alpha-Ketosäuren mittels GLC und HPLC*. Diplomarbeit im Fach Biochemie an der Freien Universität Berlin. 1990.
- Finnerty M, Marczynski TJ, Amirault HJ, Urbancic M, Andersen BR. Benzodiazepines inhibit neutrophil chemotaxis and superoxide production in a stimulus dependent manner; PK-11195 antagonizes these effects. *Immunopharmacology* 1991; 22(3):185-193.
- Folin O, Denis W. Tyrosine in proteins as determined by a new calorimetric method. *J Biol Chem* 1912;12:245-251.
- Frei J, Prod'holm LS, Fornerod-Brandenberger M. Leucocyte energy metabolism. V. Glycolytic and hexose monophosphate shunt enzymes in leucocytes from adults and newborn infants. *Enzyme*. 1975;19(2):71-84.
- Frei J, Aellig A, Nessi P. Enzyme system and coenzymes involved in the energy metabolism of leukocytes. Function and metabolism of polymorphonuclear neutrophils. *Ann Biol Clin (Paris)*. 1975;33(6):459-64.
- Fuchs M. *Entwicklung einer vollautomatischen quantitativen Aminosäurenbestimmung mittels hochauflösender Liquidchromatographie nach Fluoreszenzderivatisierung*. Diplomarbeit im Fach Biochemie an der Freien Universität Berlin 1998.
- Fuchs M. *Untersuchungen zur Regulation der Homöostase im Aminosäuren- und alpha-Ketosäurenstoffwechsel von Hepatocyten im Perfusionsmodell*. Inaugural Dissertation im Fach Biochemie an der Freien Universität Berlin 1998.
- Fuchs M, Gerlach J, Encke J, Unger J, Smith M, Neuhaus P, Riedel E. Amino acid metabolism by hepatocytes in a hybrid liver support bioreactor. *Int J Artif Organs*. 1994 Dec;17(12):663-9.
- Fuchs M, Gerlach J, Unger J, Ecke J, Smith M, Neuhaus P, Nundel M, Riedel E. Alpha-Keto acid metabolism by hepatocytes cultured in a hybrid liver support bioreactor. *Int J Artif Organs*. 1994 Oct;17(10):554-8.
- Fuchs M, Riedel E. *Quantitative Fluoreszenz-HPLC, Analytik von Aminosäuren und Polyaminen*. GIT Verlag, Darmstadt, 1994.
- Fürst P, Stehle P. What are the essential elements needed for the determination of amino acid requirements in humans? *J Nutr*. 2004 Jun;134(6 Suppl):1558S-1565S.
- Fürst P, Kuhn KS, Stehle P. New nitrogen-containing substrates in artificial nutrition. In: Pichard C, Kudsk KA, editors. *From nutrition support to pharmacologic nutrition in the ICU*. Berlin, Heidelberg, New York: Springer Verlag, 2000:441-460.
- Fürst P. Old and new substrates in clinical nutrition. *J Nutr*. 1998 May;128(5):789-96.
- Fürst P, Pollack L, Graser TA, Godel H, Stehle P. Appraisal of four pre-column derivatization methods for the high-performance liquid chromatographic determination of free amino acids in biological materials. *J Chromatogr* 1990; 499:557-69.
- Fürst P, Stehle P, Graser TA. Fortschritt in der Aminosäureanalytik unter besonderer Berücksichtigung der Ermittlung intrazellulärer Aminosäuremuster. *Infusionsther Klein Ernähr* 1987; 14(4):137-146.
- Fürst P, Alvesstrand A, Bergstrom J. Effects of nutrition and catabolic stress on intracellular amino acid pools in uremia. *Am J Clin Nutr* 1980; 33(7):1387-1395.
- Fugelli K, Kanli H, Terreros DA. Taurine efflux is a cell volume regulatory process in proximal renal tubules from the teleost *Carassius auratus*. *Acta Physiol Scand* 1995; 155(2):223-232.
- Fugelli K, Thoroed SM. Taurine and volume regulation in fish cells. *Prog Clin Biol Res* 1990; 351:481-488.

- Fugelli K, Thoroed SM. Taurine transport associated with cell volume regulation in flounder erythrocytes under anisotonic conditions. *J Physiol* 1986; 374:245-261.
- Gabrilovich D. *The neutrophils: new outlook for old cells*. London: Imperial college press, 1999.
- Galban Rodriguez CJ. Nutrition support of the septic patient. In: Pichard C, Kudsk KA, editors: *From nutrition support to pharmacologic nutrition in the ICU*. Berlin, Heidelberg, New York: Springer Verlag, 2000: 348-360.
- Galligan CL, Coomber BL. Effects of human IL-8 isoforms on bovine neutrophil function in vitro. *Vet Immunol Immunopathol* 2000; 74(1-2):71-85.
- Gerlach JC, Fuchs M, Smith MD, Bornemann R, Encke J, Neuhaus P. Is a clinical application of hybrid liver support systems limited by an initial disorder in cellular amino acid and alpha-keto acid metabolism, rather than by later gradual loss of primary hepatocyte function? *Transplantation* 1996; 62(2):224-228.
- Gitter A, Heilmeyer L, Brüschke G. *Taschenbuch klinischer Funktionsprüfungen*. 10. Auflage. Gustav Fischer, Stuttgart, New York. 1978.
- Gompertz S, Stockley RA. Inflammation- role of the neutrophil and eosinophil. *Semin Respir Infect* 2000 ; 15(1) :14-23.
- Gonzalez RJ, Morre EE, Ciesla DJ, Biffi WL, Offner PJ, Silliman CC. Phospholipase A(2)- derived neutral lipids from posthemorrhagic shock mesenteric lymph prime the neutrophil oxidative burst. *Surgery* 2001; 130(2):198-203.
- Goodman CA, Horvath D, Stathis C, Mori T, Croft K, Murphy RM, Hayes A. Taurine supplementation increases skeletal muscle force production and protects muscle function during and after high-frequency in vitro stimulation. *J Appl Physiol*. 2009 Jul; 107(1):144-54.
- Gordon RE, Park E, Laskin D, Schuller-Levis GB. Taurine protects rat bronchioles from acute ozone exposure: a freeze fracture and electron microscopic study. *Exp Lung Res* 1998; 24(5):659-674.
- Gordon RE, Heller RF. Taurine protection of lungs in hamster models of oxidant injury: a morphologic time study of paraquat and bleomycin treatment. *Adv Exp Med Biol* 1992; 315:319-328.
- Gordon RE, Shaked AA, Solano DF. Taurine protects hamsters bronchioles from acute NO<sub>2</sub>-induced alterations. A histologic, ultrastructural and freeze-fracture study. *Am J Pathol* 1986; 125(3):585-600.
- Green TR, Fellman JH, Eicher AL, Pratt KL. Antioxidant role and subcellular location of hypotaurine and taurine in human neutrophils. *Biochem Biophys Acta* 1991; 1073(1):91-97.
- Greiten H, Rister M, Steigleder GK. Myeloperoxidase of polymorphonuclear leukocytes in psoriasis vulgaris. *Arch Dermatol Res* 1987; 279 Suool:S63-S65.
- Griendling KK, Sorescu D, Ushio-Fukai M. NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res* 2000; 86(5):494-501.
- Griendling KK, Alexander RW. Oxidative stress and cardiovascular disease. *Circulation* 1997; 96(10):3264-3265.
- Griffiths RD, Andrews F. Effects of route and dose of immunonutrition compounds. In: Pichard C, Kudsk KA, editors. *From nutrition support to pharmacologic nutrition in the ICU*. Berlin, Heidelberg, New York: Springer Verlag, 2000:409-424.
- Grimble RF. Immunonutrition. *Curr Opin Gastroenterol*. 2005 Mar; 21(2):216-22.
- Grimble RF. Nutritional modulation of immune function. *Proc Nutr Soc*. 2001 Aug;60(3):389-97.
- Grimble RF. Nutritional influence on inflammation. *Nestle Nutr Workshop Ser Clin Perform Programme* 1999; 2:63-77.
- Grimble RF, Grimble GK. Immunonutrition: role of sulfur amino acids, related amino acids and polyamines. *Nutrition*. 1998 Jul-Aug;14(7-8):605-10.
- Grimble RF. Interaction between nutrients, pro-inflammatory cytokines and inflammation. *Clin Sci (Lond)* 1996; 91(2):121-130.
- Grimble RF. Interactions between nutrients and the immune system. *Nutr Health*. 1995;10(3):191-200.

- 
- Grimble RF. The maintenance of antioxidant defenses during inflammation. In: Wilmore DW, Carpentier YA, editors. *Metabolic support of the critically ill patient*. Berlin, Heidelberg, New York: Springer Verlag, 1995:347-363.
- Grimble RF. Malnutrition and the immune response. 2. Impact of nutrients on cytokine biology in infection. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1994 Nov-Dec; 88(6):615-9.
- Grimm H, Kraus A. Immunonutrition-supplementary amino acids and fatty acids ameliorate immune deficiency in critically ill patients. *Langenbecks Arch Surg*. 2001 Aug;386(5):369-76.
- Grisham MB, Jefferson MM, Melton DF, Thomas EL. Chlorination of endogenous amines by isolated neutrophils. Ammonia-dependent bactericidal, cytotoxic and cytolytic activities of the chloramines. *J Biol Chem* 1984; 259(16):10404-10413.
- Hada J, Kaku T, Jiang MH, Morimoto K, Hayashi Y, Nagai K. Sodium nitroprusside-induced seizure and taurine release from rat hippocampus. *Amino Acids* 2000; 19(3-4):547-559.
- Hampton MB, Kettle AJ, Winterbourn CC. Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase and bacterial killing. *Blood* 1998; 92(9):3007-3017.
- Hanke MT, Koessler KK. Studies on proteinogenous amines. IV. The quantitative calorimetric method for estimating imidazole derivatives. *J Biol Chem* 1920;43:527-542.
- Haussinger D, Roth E, Lang F, Gerok W. Cellular hydration state: an important determination of protein catabolism in health and disease. *Lancet* 1993; 341(8856):1330-1332.
- Hawkins CL, Davies MJ. Hypochlorite-induced damage to nucleosides : formation of chloramines and nitrogen-centered radicals. *Chem Res Toxicol* 2001; 14(8):1071-1081.
- Hayashi T, Tsuchiya H, Naruse H. High-performance liquid chromatographic determination of alpha-ketoacids in plasma with fluorometric detection. *J Chromatogr* 1983; 273(2):245-252.
- Hayashi T, Tsuchiya H. HPLC determination of alpha-ketoacids in urine and plasma. *Analyt Biochem* 1982; 122:173-179.
- Hazen SL, d'Avignon A, Anderson MM, Hsu FF, Heinecke JW. Human neutrophils employ the myeloperoxidase-hydrogen peroxide-chloride system to oxidize alpha-aminoacids to a family of reactive aldehydes. Mechanistic studies identifying labile intermediates along the reaction pathway. *J Biol Chem* 1998; 273(9):4997-5005.
- Hazen SL, Hsu FF, d'Avignon A, Heinecke JW. Human neutrophils employ myeloperoxidase to convert alpha-aminoacids to a battery of reactive aldehydes: a pathway for aldehyde generation at sites of inflammation. *Biochemistry* 1998; 37(19):6864-6873.
- Henschen A, Hupf KP, Lottspeich F. *High-performance-liquid-chromatography in biochemistry*. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, 1. Auflage, 1989.
- Hess C, Sadallah S, Hefte A, Landmann R, Schifferli JA. Ectosomes released by human neutrophils are specialized functional units. *J Immunol* 1999; 163(8):4564-4573.
- Heyland DK, Novak F, Drover JW, Jain M, Su X, Suchner U. Should immunonutrition become routine in critically ill patients? A systematic review of the evidence. *JAMA*. 2001 Aug 22;286(8):944-53.
- Himmelfarb J, McMonagle E. Manifestations of oxidant stress in uremia. *Blood Purif* 2001; 19:200-205.
- Hippenstiel S, Kratz T, Krull M, Seybold J, Eichel-Streiber C, Suttrop N. Rho protein inhibition blocks protein kinase C translocation and activation. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 245(3):830-834.
- Horio M, Yamauchi A, Matsuoka Y, Moriyama T, Fukunaga M, Imai E. Effects of hypertonic stress on amino acid levels and system A activity in rat peritoneal mesothelial cells. *Perit Dial Int* 1999; 19(2):124-130.
- Horio M, Yamauchi A, Moriyama T, Imai E, Orita Y. Osmotic regulation of amino acids and system A transport in Madin-Darby canine kidney cells. *Am J Physiol* 1997; 272(3 Pt 1):C804-C809.
- Hovarth CG, Preiss BA, Lipsky SR. Fast liquid chromatography: an investigation of operating parameters and the separation of nucleotides on pellicular ion exchangers. *Anal Chem*. 1967 Oct;39(12):1422-8.
- Huemer HP, Nagl M, Irschick EU. In vitro Prevention of Vaccinia and Herpesvirus Infection Spread in Explant Human Corneas by N-Chlorotaurine. *Ophthalmic Res*. 2009 Nov 2; 43(3):145-152.
-

- 
- Imlay JA, Linn S. Biomodal pattern of killing of DNA-repair-defective or anoxically grown *Escherichia coli* by hydrogen peroxide. *J Bacteriol* 1986; 166:519-527.
- Ito K, Arko M, Kawaguchi T, Kuwahara M, Tsubone H. The effect of subacute supplementation of taurine on spatial learning and memory. *Exp Anim*. 2009 Apr; 58(2):175-80.
- Jacobson E, Kurzwaski G, Tustanowski S. Synthesis and uptake of taurine by isolated human granulocytes. *Folia Histochem Cytobiol*. 1986;24(2):179-85.
- Janzen EG, Jandrisits LT, Barber DL. Studies on the origin of the hydroxyl spin adduct of DMPO produced from the stimulation of neutrophils by phorbol-12-myristate-13-acetate. *Free Radic Res Commun* 1987; 4(2):115-123.
- Jesus GJ, Sanchez OR, Pasantes-Morales H. Taurine release associated to volume regulation in rabbit lymphocytes. *J Cell Biochem* 1991; 45(2):207-212.
- Johnson C, Metcalf J. Relation of protein synthesis to plasma and cell amino acids in neonates. *Pediatr Res* 1986; 20(2):140-146.
- Kallio H, Linko RR. Gas-liquid chromatographic analysis of 2,4-dinitrophenylhydrazones of carbonyl compounds. *J Chromatogr* 1972; 65:355-360.
- Kapeller-Adler R. Über eine neue Methode zur quantitativen Histidinbestimmung und über deren Anwendbarkeit zur Untersuchung von biologischen Flüssigkeiten, insbesondere von Gravidenharnen. *Biochem Z* 1933;264:131-141.
- Katrakha SP, Kukes VG. Derivatization of endogenous and exogenous compounds in plasma for high-performance liquid chromatographic analysis. *J Chromatogr* 1986; 365:105-110.
- Kaufmann I, Hoelzl A, Schliephake F, Hummel T, Chouker A, Peter K, Thiel M. Polymorphonuclear leukocyte dysfunction syndrome in patients with increasing sepsis severity. *Shock*. 2006 Sep; 26(3):254-61.
- Kausalya S, Nath J. Interactive role of nitric oxide and superoxide anion in neutrophil-mediated endothelial cell injury. *J Leukoc Biol* 1998; 64(2):185-191.
- Kendler BS. Taurine: an overview of its role in preventive medicine. *Prev Med* 1989; 18(1):79-100.
- Kettle AJ, Carr AC, Winterbourn CC. Assays using horseradish peroxidase and phenolic substrates require superoxide dismutase for accurate determination of hydrogen peroxide production by neutrophils. *Free Radic Biol Biophys Acta* 1994; 17(2):161-164.
- Kettle AJ, Winterbourn CC. The influence of superoxide on the production of hypochlorous acid by human neutrophils. *Free Radic Res Commun* 1991; 12-13 Pt 1:47-52.
- Kettle AJ, Winterbourn CC. Superoxide enhances hypochlorous acid production by stimulated human neutrophils. *Biochem Biophys Acta* 1990; 1052(3):379-385.
- Kettle AJ, Winterbourn CC. Superoxide modulates the activity of myeloperoxidase and optimizes the production of hypochlorous acid. *Biochem J* 1988; 252(2):529-536.
- Kjeldahl J. Neue Methode zur Bestimmung des Stickstoffs in organisierten Körpern. *Z analyt Chem* 1883;22:366-382.
- Kirkland JJ. Ultrafast reversed-phase high-performance liquid chromatographic separations: an overview. *J Chromatogr Sci*. 2000 Dec;38(12):535-44.
- Kirkland J. High speed liquid-partition chromatographic with chemically bonded organic stationary phases. *J Chromatogr Sci* 1971;9:206-214.
- Koessler KK, Hanke MT. Studies on proteinogenous amines. II. A microchemical method for estimating imidazole derivatives. *J Biol Chem* 1919; 39:497-519.
- Khoshnoodi J, Tryggvason K. Congenital nephrotic syndromes. *Curr Opin Genet Dev* 2001; 11(3):322-327.
- Kieber DJ, Mopper K. RP-HPLC analysis of alpha-ketoacid quinoxalinol. *J Chromatogr* 1983; 281:135-144.
- Kim C, Park E, Quinn ME, Schuller LG. The production of superoxide anion and nitric oxide by cultured murine leukocytes and the accumulation of TNF-alpha in the conditioned media is inhibited by taurine chloramines. *Immunopharmacology* 1996; 34(2-3):89-95.
- King CC, Jefferson MM, Thomas EL. Secretion and inactivation of myeloperoxidase by isolated neutrophils. *J Leukoc Biol* 1997; 61(3):193-302.
-

- Kjeldsen L, Sengelov H, Lollike K, Borregaard N. Granules and secretory vesicles in human neonatal neutrophils. *Pediatr Res* 1996; 40(1):120-129.
- Kjeldsen L, Sengelov H, Lollike K, Nielsen MH, Borregaard N. Isolation and characterization of gelatinase granules from human neutrophils. *Blood* 1994; 83(6):1640-1649.
- Knight JA. Review: Free radicals, antioxidants and the immune system. *Ann Clin Lab Sci* 2000; 30(2):145-158.
- Kobayashi T, Tsunawaki S, Seguchi H. Evaluation of the process for superoxide production by NADPH oxidase in human neutrophils: evidence for cytoplasmic origin of superoxide. *Redox Rep* 2001; 6(1):27-36.
- Koike K, Koike M. Fluorescent analysis of alpha-ketoacids in serum and urine by HPLC. *Analyt Biochem* 1984; 141:481-487.
- Koistinen P. Human peripheral blood and bone marrow cell separation using density gradient centrifugation on Lymphoprep and Percoll in haematological diseases. *Scand J Clin Lab Invest.* 1987 Nov; 47(7):709-14.
- Kopple JD, Vinton NE, Laidlaw SA, Ament ME. Effect of intravenous taurine supplementation on plasma, blood cell and urine taurine concentrations in adults undergoing long-term parenteral nutrition. *Am J Clin Nutr* 1990; 52(5):846-853.
- Kopprasch S, Gatzweiler A, Graessler J, Schroder HE. Beta-adrenergic modulation of FMLP- and zymosan-induced intracellular and extracellular oxidant production by polymorphonuclear leukocytes. *Mol Cell Biochem* 1997; 168(1-2):133-139.
- Kovacs T, Szasa I, Sarkadi B, Brezanoczy F, Gordos G. Volume regulatory mechanism of human granulocytes in hypoosmotic media. *Acta Biochem Biophys Hung* 1989; 24(1-2):83-99.
- Krüll M, Klucken AC, Wuppermann FN, Fuhrmann O, Magerl C, Seybold J. Signal transduction pathways activated in endothelial cell following infection with *Chlamydia pneumoniae*. *J Immunol* 1999; 162(8):4834-4841.
- Krumholz W, Demel C, Jung S, Meuthen G, Knecht J, Hempelmann G. The effects of thiopentone, etomidate, ketamine and midazolam on several bactericidal functions of polymorphonuclear leukocytes in vitro. *Eur J Anaesthesiol* 1995; 12(2):141-146.
- Krumholz W, Endrass J, Hempelmann G. Inhibition of phagocytosis and killing of bacteria by anaesthetic agents in vitro. *Br J Anaesth* 1995; 75(1):66-70.
- Krumholz W, Demel C, Jung S, Meuthen G, Hempelmann G. The influence of fentanyl and alfentanil on functions of human polymorphonuclear leukocytes in vitro. *Acta Anaesthesiol Scand* 1993; 37(4):386-389.
- Krumholz W, Demel C, Jung S, Meuthen G, Kempelmann G. The influence of intravenous anaesthetics on polymorphonuclear leukocyte function. *Can J Anaesth* 1993; 40(8):770-774.
- Krumholz W. Der Einfluß ausgewählter intravenöser Anästhetiker auf verschiedene Funktionen polymorphkerniger neutrophiler Granulozyten. Gießen: Habilitationsschrift zur Erlangung der Venia legendi des Fachbereichs Humanmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen, 1991.
- Kurtzman NA. Nephritic edema. *Semin Nephrol* 2001; 21(3):257-261.
- Kuwabara M, Takahashi TA, Nagahata H, Inanami O. Spin-trapping detection of superoxides in polymorphonuclear leukocytes stimulated with serum-opsonized zymosan. *Jpn J Vet Res* 2000; 48(1):3-13.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227(259):680-685.
- Lanza F. Clinical manifestation of myeloperoxidase deficiency. *J Mol Med* 1998; 76(19):676-681.
- Law RO. Adaptation of cerebral volume-regulatory taurine transport to chronic disturbances of plasma osmolality. *Adv Exp Med Biol* 1998; 442:237-243.
- Law RO. Effects of extracellular bicarbonate ions and pH on volume-regulatory taurine efflux from rat cerebral cortical slices in vitro: evidence for separate neutral and anionic transport mechanisms. *Biochem Biophys Acta* 1994; 1224(3):377-383.
- Learn DB, Fried VA, Thomas EL. Taurine and hypotaurine content of human leukocytes. *J Leukoc Biol.* 1990 Aug;48(2):174-82.
- Lee WL, Downey GP. Neutrophil activation and acute lung injury. *Curr Opin Crit Care* 2001; 7(1):1-7.

- Lentsch AB, Miller FN, Edwards MJ. Mechanisms of leukocyte-mediated tissue injury induced by interleukin-2. *Cancer Immunol Immunother* 1999; 47(5):243-248.
- Lerner J. Acidic amino acid transport in animal cells and tissues. *Comp Biochem Physiol B* 1987; 87(3):443-457.
- Liszt F, Schnittker-Schulze K, Stuhlsatz HW, Greiling H. Composition of proteoglycan fragments from hyaline cartilage produced by granulocytes in a model of frustrated phagocytosis. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1991; 29(2):123-130.
- Manhart N, Stehle P. Nutritive amino acids-effective modulators of the immune response. *Forum Nutr.* 2003;56:151-4.
- Manolopoulos VG, Voets T, Declercq PE, Droogmans G, Nilius B. Swelling-activated efflux of taurine and other organic osmolytes in endothelial cells. *Am J Physiol* 1997; 237(1Pt 1):C214-222.
- Marcinkiewicz J. Taurine bromamine: a new therapeutic option in inflammatory skin diseases. *Pol Arch Med Wewn.* 2009 Oct; 119(19):673-6.
- Marcinkiewicz J, Grabowska A, Bereta J, Bryniarski K, Nowak B. Taurine chloramines down-regulates the generation of murine neutrophil inflammatory mediators. *Immunopharmacology* 1998; 40(1):27-38.
- Marcinkiewicz J, Grabowska A, Bereta J, Stelmaszynska T. Taurine chloramines, a product of activated neutrophils, inhibits in vitro the generation of nitric oxide and other macrophage inflammatory mediators. *J Leukoc Biol* 1995; 58(6):667-674.
- Marino F, Cattaneo S, Cosentino M, Rasini E, Di Grazia L, Fietta AM. Diazepam stimulates migration and phagocytosis of human neutrophils: possible contribution of peripheral-type benzodiazepine receptors and intracellular calcium. *Pharmacology* 2001; 63(1):42-49.
- Marquez LA, Dunford HB. Chlorination of taurine by myeloperoxidase. Kinetic evidence for an enzyme-bound intermediate. *J Biol Chem* 1994; 269(11):7950-7956.
- Martin AJP, Syne RLM. A new form of chromatogram employing two liquid phases. *Biochem J* 1941;35:1358-1368.
- Maslen C, Stevens TR, Hall ND. The generation of lipid peroxides by stimulated human neutrophils. Detection using phenol red oxidation. *J Immunol Methods* 1987;98(1):71-76.
- Masuda M, Horisaka K, Koeda T. Effects of taurine on neutrophil function in hyperlipidemic rats. *Jpn J Pharmacol* 1986; 40(3):478-480.
- Masuda M, Horisaka K, Koeda T. Role of taurine in neutrophil function. *Nippon Yakurigaku Zasshi.* 1984 Sep;84(3):283-92.
- Masuda M, Horisaka K, Koeda T. Influences of taurine on functions of rat neutrophils. *Jpn J Pharmacol* 1984; 34(1):116-118.
- McCarty MF. The reported clinical utility of taurine in ischemic disorders may reflect a down-regulation of neutrophil activation and adhesion. *Med Hypotheses* 1999; 53(4):290-299.
- McLoughlin DM, Stapleton PP, Bloomfield FJ. Influence of taurine and a substituted taurine on the respiratory burst pathway in the inflammatory response. *Biochem Soc Trans* 1991; 19(1):73-78.
- Mendz GL, McCall MN, Kuchel PW. Characterization of leukocyte enzyme involved in the release of amino acids in incubated blood cell lysates. *J Biol Chem* 1989; 264(4):2108-2117.
- Metcoff J, Pederson J, Gable J III, Llach F. Protein synthesis, cellular amino acids and energy levels in CAPD patients. *Kidney Int Suppl.* 1987 Oct;22:S136-44.
- Metcoff J. Intracellular amino acid levels as predictors of protein synthesis. *J Am Coll Nutr.* 1986;5(2):107-20.
- Metcoff J, Lindemann R, Baxter D, Pederson J. Cell metabolism in uremia. *Am J Clin Nutr* 1978;31(9):1627-1634.
- Meyer V. *Praxis der HPLC.* Verlag Diesterweg-Salle-Sauerländer. Frankfurt am Main, 1986.
- Miller RA, Britigan BE. Role of oxidants in microbial pathophysiology. *Clin Microbiol Rev* 1997; 10(1):1-18.

- 
- Minczykowski A, Woszczyk M, Szczepanik A, Lewandowski L, Wysocki H. Hydrogen peroxide and superoxide anion production by polymorphonuclear neutrophils in patients with chronic periapical granuloma, before and after surgical treatment. *Clin Oral Investig* 2001; 5(1):6-10.
- Miyasaki KT, Song JP, Murthy RK. Secretion of myeloperoxidase isoforms by human neutrophils. *Anal Biochem* 1991; 193(1):38-44.
- Moore S, Stein WH. Chromatography of amino acids on sulfonated polystyrene resins. *J Biol Chem* 1952;192:663-681.
- Moore S, Stein WH. Chromatography of amino acids on starch columns. Solvent mixtures for the fractionation of protein hydrolysates. *J Biol Chem* 1948;178:53-77.
- Moore S, Stein WH. Photometric ninhydrin method for use in the chromatography with starch. *J Biol Chem* 1948;176:367-388.
- Moshfegh A, Hallden G, Lundahl J. Methods for simultaneous quantitative analysis of eosinophil and neutrophil adhesion and transmigration. *Scan J Immunol* 1999; 50(3):262-269.
- Mühling J, Burchert D, Langefeld TW, Matejec R, Harbach H, Engel J, Wolff M, Welters ID, Fuchs M, Menges T, Krüll M, Hempelmann G. Pathways involved in alanyl-glutamin-induced changes in neutrophil amino- and alpha-keto acid homeostasis or immunocompetence. *Amino Acids*. 2007 Sep;33(3):511-24.
- Mühling J, Nickolaus KA, Matejec R, Langefeld TW, Harbach H, Engel J, Wolff M, Weismüller K, Fuchs M, Welters ID, Krüll M, Heidt MC, Hempelmann G. Which mechanisms are involved in taurine-dependent granulocytic immune response or amino- and alpha-keto acid homeostasis? *Amino Acids*. 2007 Mar 2.
- Mühling J, Nickolaus KA, Halabi M, Fuchs M, Krüll M, Engel J, Wolff M, Matejec R, Langefeld TW, Welters ID, Menges T, Dehne MG, Sablotzki A, Hempelmann G. Alterations in neutrophil (PMN) free intracellular alpha-keto acid profiles and immune functions induced by L-alanyl-L-glutamine, arginine or taurine. *Amino Acids*. 2005 Nov;29(3):289-300.
- Mühling J, Fuchs M, Campos ME, Gonter J, Engel JM, Sablotzki A, Menges T, Weiss S, Dehne MG, Krüll M, Hempelmann G. Quantitative determination of free intracellular alpha-keto acids in neutrophils. *J Chromatogr B Analyt Technol Biom Med Life Sci*. 2003 Jun 15;789(2):383-92.
- Mühling J, Fuchs M, Fleck C, Sablotzki A, Krüll M, Dehne MG, Gonter J, Weiss S, Engel J, Hempelmann G. Effects of arginine, L-alanyl-L-glutamine or taurine on neutrophil (PMN) free amino acid profiles and immune functions in vitro. *Amino Acids*. 2002;22(1):39-53.
- Mühling J, Campos ME, Sablotzki A, Krüll M, Dehne MG, Gonter J, Weiss S, Fuchs M, Hempelmann G. Effects of propofol and taurine on intracellular free amino acid profiles and immune function markers in neutrophils in vitro. *Clin Chem Lab Med*. 2002 Feb;40(2):111-21.
- Mühling J, Dehne MG, Fuchs M, Sablotzki A, Weiss S, Spatz J, Hempelmann G. Conscientious metabolic monitoring on a patient with hyperornithinemia-hyperammonemia-homocitrullinuria (HHH) syndrome undergoing anaesthesia. *Amino Acids* 2001; 21(3):303-318.
- Mühling J, Fuchs M, Dehne MG, Sablotzki A, Menges T, Weber B, Hempelmann G. Quantitative determination of free intracellular amino acids in single human polymorphonuclear leucocytes. Recent developments in sample preparation and high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*. 1999 May 28;728(2):157-66
- Muscaritoli M, Grieco G, Capria S, Iori AP, Fanelli FR. Nutritional and metabolic support in patients undergoing bone marrow transplantation. *Am J Clin Nutr* 2002; 75(2):183-190.
- Nakajima Y, Osuka K, Seki Y, Gupta RC, Hara M, Takayasu M, Wakabayashi T. Taurine reduces inflammatory responses after spinal cord injury. *J Neurotrauma*. 2009 Oct 15.
- Nakano M. Detection of active oxygen species in biological systems. *Cell Mol Neurobiol* 1998; 18(6):565-579.
- Naskalski JW. Myeloperoxidase inactivation in the course of catalysis of chlorination of taurine. *Biochem Biophys Acta* 1977; 485(2):291-300.
- Nauseef WM. The NADPH-dependent oxidase of phagocytes. *Proc Assoc Am Physicians* 1999; 111(5):373-382.
- Neary P, Stapleton P, Condron C, Redmond HP, Bouchier-Hayes DJ. Surgical stress induces neutrophils plasma taurine sequestration indicating its essential role in the maintenance of proinflammatory cell homeostasis. 4<sup>th</sup> international congress on the Immune consequences of trauma, shock and sepsis. 1997:407-411.
-

- Newsholme P, Brennan L, Rubi B, Maechler P. New insights into amino acid metabolism, beta-cell function and diabetes. *Clin Sci (Lond)*. 1995 Mar;108(3):185-94.
- Newsholme P. Nutrition of some cells of the immune system and its importance in the response to trauma. In: Wilmore DW, Carpentier YA, editors. *Metabolic support of the critically ill patient*. Berlin, Heidelberg, New York: Springer Verlag, 1995:198-214.
- Niessen F, Isselhard W, Minor T. No beneficial effects of taurine application on oxygen free radical production after hemorrhagic shock in rats. *Adv Exp Med Biol* 1998; 442:193-200.
- Nitenberg B, Antoun S, Raynard B. Enteral immunonutrition in the intensive care unit. A critical approach. In: Pichard C, Kudsk KA, editors. *From nutrition support to pharmacologic nutrition in the ICU*. Berlin, Heidelberg, New York: Springer Verlag, 2000:384-408.
- Nusetti S, Urbina M, Obregón F, Quintal M, Benzo Z, Lima L. Effects of zinc ex vivo and intracellular zinc chelator in vivo on taurine uptake in goldfish retina. *Amino acids*, 2009 Sept 27.
- Nussler AK, Wittel UA, Nussler NC, Berger HG. Leukocytes, the Janus cells in inflammatory disease. *Langenbecks Arch Surg* 1999; 384(2):222-232.
- O'Flaherty L, Stapleton PP, Redmond HP, Bouchier HD. Dexamethasone and lipopolysaccharide regulation of taurine transport in Caco-2 cells. *J Surg Res* 1997; 69(2):331-336.
- Ohkuma S, Katsura M, Chen KZ, Kuriyama K. Nitric oxide-evoked [3H] taurine release is mediated by reversal of the Na(+)-dependent carrier-mediated taurine transport system. *Adv Exp Med Biol* 1996; 403:417-425.
- Ohmori M, Kitho Y, Harada K, Sugimoto K, Fujimura A. Polymorphonuclear leukocytes (PMNs) function in SHR, L-NAME- and DOCA/Salt-induced hypertensive rats. *J Hypertens* 2000; 18(6):703-707
- Oliveira-Silvia S, Ximenes VF, Catalani LH, Campa A. Myeloperoxidase-catalyzed oxidation of melatonin by activated neutrophils. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 279(2):657-662.
- Olson JE, Putnam RW, Evers JA, Munoz N. Taurine efflux and intracellular pH during astrocyte volume regulation. *Adv Exp Med Biol* 1998; 442:229-35.
- Park E, Jia J, Quinn MR, Schuller-Levis G. Taurine chloramine inhibits lymphocyte proliferation and decreases cytokine production in activated human leukocytes. *Clin Immunol*. 2002 Feb;102(2):179-84.
- Park E, Alberti J, Quinn MR, Schuller-Levis G. Taurine chloramine inhibits the production of superoxide anion, IL-6 and IL-8 in activated human polymorphonuclear leukocytes. *Adv Exp Med Biol* 1998; 442:177-182.
- Park E, Schuller-Levis G, Jia JH, Quinn MR. Preactivation exposure of RAW 264.7 cells to taurine chloramines attenuates subsequent production of nitric oxide and expression of iNOS mRNA. *J Leukoc Biol* 1997; 61(2):161-166.
- Pasantes-Morales H, Garcia JJ, Sanchez OR. Hyposmolarity-sensitive release of taurine and free amino acids from human lymphocytes. *Biochem Pharmacol* 1991; 41(2):303-307.
- Pasantes-Morales H, Sanchez OR, Miranda D, Moran J. Volume regulation in NIH/3T3 cells not expressing P-glycoprotein. I. Regulatory volume decrease. *Am J Physiol* 1997; 272(6 Pt1): C1798-C1803.
- Pasantes MH, Murray RA, Sanchez OR, Moran J. Regulatory volume decrease in cultured astrocytes. II. Permeability pathway to amino acids and polyols. *Am J Physiol* 1994; 266(1 PT 1):C172-C178.
- Patrick DA, Moore EE, Offner PF, Meldrum DR, Tamura DY, Johnson JL. Maximal human neutrophil priming for superoxide production and elastase release requires p38 mitogen-activated protein kinase activation. *Arch Surg* 2000; 135(2):219-225.
- Patrick DA, Moore EE, Fullerton DA, Barnett CC, Jr., Meldrum DR, Silliman CC. Cardiopulmonary bypass renders patients at risk for multiple organ failure via early neutrophil priming and late neutrophil disability. *J Surg Res* 1999; 86(1):42-49.
- Patel T. Apoptosis in hepatic pathophysiology. *Clin Liver Dis* 2000; 4(2):295-317.
- Petridis P. Blut. In: Löffler G, Petridis P, editors. *Biochemie and Pathobiochemie*. Berlin, Heidelberg, New York: Springer Verlag, 1997:878-887.
- Pick E, Keisari Y. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. *J Immunol Methods* 1980;38:161-169.

- Podrez EA, Abu-Soud HM, Hazen SL. Myeloperoxidase-generated oxidants and atherosclerosis. *Free Radic Biol Med* 2000; 28(12):1717-1725.
- Porter DW, Martin WG. Taurine uptake into chick B cells. *Proc Soc Exp Biol Med* 1992; 199(2):243-248.
- Porter DW, Walker SA, Martin WG, Lee P, Kaczmarczyk W. Taurine uptake in chicken leukocytes and erythrocytes. *Comp Biochem Physiol A* 1991; 98(2):305-309.
- Pyne DB, Smith JA, Baker MS, Telford RD, Weidemann MJ. Neutrophil oxidative activity is differentially affected by exercise intensity and type. *J Sci Med Sport* 2000; 3(1):44-54.
- Raschke P, Massoudy P, Becker BF. Taurine protects the heart from neutrophil-induced reperfusion injury. *Free Radic Biol Med* 1995; 19(4):461-471.
- Ratasirayakorn W, Leone P, Leblebcioglu B, Walters JD. Polyamines found in the inflamed periodontium inhibit priming and apoptosis in human polymorphonuclear leukocytes. *J Periodontol* 1999; 70(2):179-184.
- Rebecchi IM, Ferreira-Novo N, Julian Y, Campa a. Oxidative metabolism and release of myeloperoxidase from polymorphonuclear leukocytes obtained from blood sedimentation in a Ficoll-Hypaque gradient. *Cell Biochem Funct* 2000; 18(2):127-132.
- Redmond HP, Stapleton PP, Neary P, Bouchier-Hayes D. Immunonutrition: the role of taurine. *Nutrition*. 1998 Jul-Aug;14(7-8):599-604.
- Rick W. *Klinische Chemie und Mikroskopie*. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 1977.
- Riedel E, Nündel M, Wendel G, Hampl H. Amino acid and alpha-keto acid metabolism depends on oxygen availability in chronic hemodialysis patients. *Clin Nephrol*. 2000 Feb;53(1 Suppl):S56-60.
- Riedel E, Hampl H, Nündel M, Busche D, Fuchs H. Severity of anaemia influences pattern of amino acids and alpha-keto acids in haemodialysis patients. *Contrib Nephrol* 1992; 98:98-104.
- Riedel E, Hampl H, Nündel M, Farshidfar G. Essential branched-chain amino acids and alpha-ketoanalogues in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant*. 1992;7(2):117-20.
- Riedel E, Hampl H, Scigalla P, Nündel M, Kessel M. Correction of amino acid metabolism by recombinant human erythropoietin therapy in hemodialysis patients. *Kidney Int Suppl* 1989; 27S216-21.
- Riedel E, Nündel M, Algermissen B, Hampl H, Scigalla P, Stabell U. Changes in the concentrations of hydroxyproline, glycine and serine in the plasma of haemodialysis patients undergoing erythropoietin therapy. *J Clin Chem Clin Biochem* 1989; 27(11):851-856.
- Rosales C, Brown EJ. Neutrophil receptors and modulation of immune response. In: Abrahamson JS, Weehler JG, editors. *The neutrophil (The natural immune system)*. New York: Oxford University Press, 1996:23-62.
- Rossi F, Patriarca P, Romeo D, Zabucchi G. The mechanism of control of phagocytic metabolism. *Adv Exp Med Biol*. 1976;73 PT-A:205-23.
- Roth E, Karner J. Intrazelluläre Aminosäurekonzentrationen bei verschiedenen Krankheitszuständen. *Infusionsther Klin Ernähr* 1987; 14(4):147-150.
- Roy G. Channels for amino acids and metabolic activated by cell volume regulation. *Jpn J Physiol* 1994; 44 Suppl 2:S37-S42.
- Rylance HJ, Myhal DR. Taurine excretion and the influence of drugs. *Clin Chem Acta* 1971; 35(1):159-164.
- Sampson AP. The role of eosinophils and neutrophils in inflammation. *Clin Exp Allergy* 2000; 30 Suppl 1:22-27.
- Saransaari P, Oja SS. Taurine release modified by nitric oxide-generating compounds in the developing and adult mouse hippocampus. *Neuroscience* 1999; 89(4):1103-1111.
- Saransaari P, Oja SS. Effects of NO-generating compounds on the uptake and release of taurine in the mouse brain. *Adv Exp Med Biol* 1998; 442:355-362.
- Satsu H, Miyamoto Y, Shimizu M. Hypertonicity stimulates taurine uptake and transporter gene expression in Caco-2 cells. *Biochem Biophys Acta* 1999; 1419(1):89-96.
- Sayed MM. Signaling mechanisms of altered cellular responses in trauma, burn and sepsis: role of Ca<sup>2+</sup>. *Arch Surg* 2000; 135(12):1432-1442.

- Scapini P, Lapinet-Vera JA, Gasperini S, Calzetti F, Bazzoni F, Cassatella MA. The neutrophils as a cellular source of chemokines. *Immunol Rev* 2000; 177:195-203.
- Schaffer S, Takahashi K, Azuma J. Role of osmoregulation in the actions of taurine. *Amino Acids* 2000; 19(3-4):527-546.
- Schlag G, Redl H. Mediators of injury and inflammation. *World J Surg* 1996; 20(4): 406-410.
- Schmitt D, Shen Z, Zhang R, Colles SM, Wu W, Salomon RG. Leucocytes utilize myeloperoxidase-generated nitrating intermediates as physiological catalysts for the generation of biologically active oxidized lipids and sterols in serum. *Biochemistry* 1999; 38(51):16904-16915.
- Schmitt M, Keller HU, Cottier H. Qualitative and quantitative assesment of human polymorphonuclear leukocyte (PMNL) functions. *Beitr Infusionsther Klin Ernähr* 1986; 15:196-203.
- Schuller-Levis G, Gordon RE, Wang C, Park SY, Park E. Protection of bleomycin-induced fibrosis and inflammation by taurine. *Int Immunopharmacol*. 2009 Jul; 9(7-8):971-7.
- Schuller-Levis GB. & Park E. Taurine and its chloramine: modulators of immunity. *Neurochem Res*. 2004; 29:117-126.
- Schuller-Levis GB, Gordon RE, Park E, Pendino KJ, Laskin DL. Taurine protects rat bronchioles from acute ozone-induced lung inflammation and hyperplasia. *Exp Lung Res* 1995; 21(6):877-888.
- Schuller-Levis GB, Sturman JA. „Activation“ of alveolar leukocytes isolates from cats fed taurine-free diets. *Adv Exp Med Biol* 1992; 315:83-90.
- Schuller-Levis G, Mehta PD, Rudelli R, Sturman J. Immunologic consequences of taurine deficiency in cats. *J Leukoc Biol* 1990; 47(4):321-331.
- Schuller-Levis GB, Sturman JA. Evaluation of immunity in taurine-deficient cats. *Prog Clin Biol Res* 1990; 351:431-438.
- Schuller LG, Quinn MR, Wright C, Park E. Taurine protects against oxidant-induced lung injury: possible mechanism(s) of action. *Adv Exp Med Biol* 1994; 359:31-39.
- Sengelov H. Secretory vesicles of human neutrophils. *Eur J Haematol Suppl* 1996; 58:1-24.
- Sengelov H. Complement receptors in neutrophils. *Crit Rev Immunol* 1995; 15(2):107-131.
- Sengelov H, Follin P, Kjeldsen L, Lollike K, Dahlgren C, Borregaard N. Mobilization of granules and secretory vesicles during in vivo exudation of human neutrophils. *J Immunol* 1995; 154(8):4157-4165.
- Shain WG, Martin DL. Aktivation of beta-adrenergic receptors stimulates taurine release from glial cells. *Cell Mol Neurobiol* 1984; 4(2):191-196.
- Shimizu M, Zhao Z, Ishimoto Y, Satsu . Dietary taurine attenuates dextran sulfate sodium (DSS)-induced experimental colitis in mice. *Adv Exp Med Biol*. 2009; 643:265-71.
- Simmonds NJ, Allen RE, Stevens TR, Van Someren RN, Blake DR, Rampton DS. Chemiluminescence assay of mucosal reactive oxygen metabolites in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1992; 103(1):186-196.
- Singh VK, More T, Singh S. The effect of activation of granulocytes on enzyme release and hydrogen peroxide and superoxide production in buffaloes. *Vet Res Commun* 1997; 21(4):241-247.
- Son M, Ko JI, Kim WB, Kank HK, Kim BK. Taurine can ameliorate inflammatory bowel disease in rats. *Adv Exp Med Biol* 1998 ; 442 :291-298.
- Son M, Kim WB, Yang J, Kim BK. Protective effect of taurine on indomethacine-induced gastric mucosal injury. *Adv Exp Med Biol* 1996 ; 403:147-155.
- Spackmann DH, Stein WH, Moore S. Automatic recording apparatus for use in the chromatography of amino acids. *Analyt Chem* 1958; 30:1190-1206.
- Stangel W, Seidel J, Mirkani J. Granulozytenfunktionen in gelagerten Blutkonserven. *Beitr Infusionster Kin Ernähr* 1986; 15:231-241.
- Stapleton PP, Redmond HP, Bouchier-Hayes DJ. Myeloperoxidase (MPO) may mediate neutrophil adherence to the endothelium through upregulation of CD 11 B expression – an effect downregulated by taurine. *Adv Exp Med Biol* 1998; 442:183-192.

- Stapelton PP, O'Flaherty L, Redmond HP, Bouchier-Hayes DJ. Host defense - a role for the amino acid taurine? *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* 1998 Jan-Feb;22(1):42-8.
- Stapleton P, Charles RP, Redmond HP, Bouchier-Hayes DJ. Taurine and human nutrition. *Clin Nutr* 1997; 16(3):103-108.
- Stapelton PP, Redmond HP, Bouchier-Hayes DJ. Taurine and inflammation - a new approach to an old problem? *J Leukoc Biol* 1997; 61(2):231-232.
- Stapelton PP, Molloy AM, Rogers S, Bloomfield FJ. Neutrophil taurine in psoriasis. *Ir J Med Sci* 1996; 165(3):173-176.
- Suchner U, Senfleben U, Fehlbinger TW. Immune function and organ failure. Immunomodulation with nutritional support-an update. *Anaesthesist.* 2000 May;49(5):460-5.
- Suleiman MS. New concepts in the cardioprotective action of magnesium and taurine during the calcium paradox and ischaemia of the heart. *Magnes Res* 1994; 7(3-4):295-312.
- Suleiman MS, Fernando HC, Dihimis WC, Hutter JA, Chapman RA. A loss of taurine and other amino acids from ventricles of patients undergoing bypass surgery. *Br Heart J.* 1993 Mar;69(3):241-5.
- Syngé RLM. Analysis of a partial hydrolysate of Gramidicin by partition chromatography with starch. *Biochem J* 1944;38:285-294.
- Szutowicz A, Kobes RD, Orsulak PJ. Calorimetric assay for monoamine oxidase in tissues using peroxidase and 2,2'-azinodi(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) as a chromogen. *Anal Biochem* 1984; 138(1):86-94.
- Tallan HH, Jacobson E, Wright CE, Schneidman K, Gaull GE. Taurine uptake by cultured human lymphoblastoid cells. *Life Sci* 1983; 33(19):1853-1860.
- Tamarappoo BK, Nam M, Kilberg MS, Welbourne TC. Glucocorticoid regulation of splanchnic glutamine, alanine, glutamate, ammonia and glutathione fluxes. *Am J Physiol* 1993; 264(4 Pt 1):E526-E533.
- Teran JC. Nutrition and liver diseases. *Curr Gastroenterol Rep* 1999; 1(4):335-340.
- Tetta C, Biasoli S, Schiavon R, Inguaggiato P, David S, Panichi V. An overview of hemodialysis and oxidative stress. *Blood Purif* 1999; 17:118-126.
- Thomas JA, Grisham MB, Melton DF, Jefferson MM. Evidence for a role of taurine in the vitro oxidative toxicity of neutrophils toward erythrocytes. *J Biol Chem* 1985; 260(6):3321-3329.
- Thoroed S, Soergaard M, Cragoe E, Fugelli K. The osmolality-sensitive taurine channel in flounder erythrocytes is strongly stimulated by noradrenaline under hypo-osmotic conditions. *J Exp Biol* 1995; 198(Pt 2):311-324.
- Thoroed SM, Fugelli K. The Na(+)-independent taurine influx in flounder erythrocytes and its association with the volume regulatory taurine efflux. *J Exp Biol* 1994; 186:245-268.
- Tiedemann F, Gmelin L. Einige neue Bestandteile der Galle des Ochsen. *Ann Physik Chem* 1827;9:326-337.
- Trevani AS, Andonegui G, Giordano M, Lopez DH, Gamberale R, Minucci F. Extracellular acidification induces human neutrophil activation. *J Immunol* 1999; 162(8):4849-4857.
- Tse WY, Williams J, Pall A, Wilkes M, Savage CO, Adu D. Antineutrophil cytoplasm antibody-induced neutrophil nitric oxide production is nitric oxide synthase independent. *Kidney Int* 2001; 59(2):593-600.
- Tull SP, Yates CM, Maskrey BH, O'Donnell VB, Madden J, Grimble RF, Calder PC, Nash GB, Rainger GE. Omega-3 Fatty acids and inflammation: novel interactions reveal a new step in neutrophil recruitment. *PLoS Biol.* 2009 Aug; 7(8):e1000177
- Ulmer AJ, Scholz W, Ernst M, Brandt E, Flad HD. Isolation and subfractionation of human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) by density gradient centrifugation on Percoll. *Immunobiology.* 1984 May; 166(3):238-50.
- Ushijima Y, Totsune H, Nishida A, Nakano M. Chemiluminescence from human polymorphonuclear leukocytes activated with opsonized zymosan. *Free Radic Biol Med* 1997; 22(3):401-409.
- Van Gelder BF, Slater EC. The extinction coefficient of cytochrome c. *Biochim Biophys Acta* 1962; 58:593-595.

- Van Pelt LJ, van Zwieten R, Weening RS, Ross D, Verhoeven AJ, Bolscher BG. Limitations on the use of dihydrorhodamine 123 for flow cytometric analysis of the neutrophil respiratory burst. *J Immunol Methods* 1996; 191(2):187-196.
- Van Slyke DD. The quantitative determination of aliphatic amino groups. *J Biol Chem* 1912; 12:275-284.
- Van Slyke DD. The analysis of proteins by determination of the chemical group characteristics of the different amino-acids. *J Biol Chem* 1911;10:15-55.
- Ventrurini A, Ascione R, Lin H, Polesel E, Angelini GD, Suleiman MS. The importance of myocardial amino acids during ischemia and reperfusion in dilated left ventricle of patients with degenerative mitral valve disease. *Mol Cell Biochem*. 2009 Oct; 330(1-2):63-70.
- Vinton NE, Laidlaw SA, Ament ME, Kopple JD. Taurine concentrations in plasma, blood cells and urine of children undergoing long-term total parenteral nutrition. *Pediatr Res* 1987; 21(4):399-403.
- Vinton NE, Laidlaw SA, Ament ME, Kopple JD. Taurine concentrations in plasma and blood cells of patients undergoing long-term parenteral nutrition. *Am J Clin Nutr* 1986; 44(3):398-404.
- Vogt W. Complement activation by myeloperoxidase products released from stimulated human polymorphonuclear leukocytes. *Immunobiology* 1996; 195(3):334-346.
- Vogt W, Hesse D. Oxidants generated by the myeloperoxidase-halide system activate the fifth component of human complement, C5. *Immunobiology* 1994; 192(1-2):1-9.
- Wagner DK, Collins-Lech C, Sohnle PG. Inhibition of neutrophil killing of *Candida albicans* pseudohyphae by substances which quench hypochlorous acid and chloramines. *Infect Immun* 1986; 51(3):731-735.
- Wang YH, Shen YC, Liao JF, Lee CH, Chou CY, Liou KT, Chou YC. Anti-inflammatory effects of dimemorfan on inflammatory cells and LPS-induced endotoxin shock in mice. *Br J Pharmacol*. 2008 Aug; 154(8):1702.
- Wanten GJ, Naber AH, Kruijmel JW, Tool AT, Roos D, Jansen JB. Influences of structurally different lipid emulsions on human neutrophil oxygen radical production. *Eur J Clin Invest* 1999; 29(4):357-363.
- Warren LL, Downey GP. Neutrophil activation and acute lung injury. *Curr Opin Crit Care* 2001; 7:1-7.
- Weening RS, Wever R, Roos D. Quantitative aspects of the production of superoxide radicals by phagocytizing human granulocytes. *J Lab Clin Med* 1975; 85:245-251.
- Weiss SJ, Klein R, Slivka A, Wei M. Chlorination of taurine by human neutrophils. Evidence for hypochlorous acid generation. *J Clin Invest* 1982; 70(3):598-607.
- Welters ID. Effekte von Morphin, Fentanyl und Ketamin auf leukozytäre Funktion, Transkriptionsfaktoren und Interleukin-8-Synthese. Habilitationsschrift zur Erlangung der Venia legendi des Fachbereichs Humanmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen, 2002.
- Winterbourn CC, Kettle AJ. Biomarkers of myeloperoxidase-derived hypochlorous acid. *Free Radic Biol Med* 2000; 29(5):403-409.
- Winterbourn CC, Vissers MC, Kettle AJ. Myeloperoxidase. *Curr Opin Hematol* 2000; 7(1):53-58.
- Witko-Sarsat V, Rieu P, Descamps-Latscha B, Lesavre P, Halbwachs-Mecarelli L. Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects. *Lab invest*. 2000 May;80(5):617-53.
- Wójcik OP, Koenig KL, Zeleniuch-Jacquotte A, Costa M, Chen Y. The potential protective effects of taurine on coronary heart disease. *Atherosclerosis*. 2009 Jun 11.
- Woolf LI, Hasinoff C, Perry A. Estimation of branched-chain alpha-ketoacids in blood by gas chromatography. *J Chromatogr* 1982; 231(2):237-245.
- Xu YJ, Ameja AS, Tappia PS, Dhalla NS. The Potential health benefits of taurine in cardiovascular disease. *Exp Clin Cardiol*. 2008 Summer; 13(2):57-65.
- Xu Z, Du H, Wang S, Liu D. Effects of taurine on tumor necrosis factor expression of lung in rats treated by silica. *Wei Sheng Yan Jiu*. 2007 May; 36(3):364-6.
- Zhang X, Lombardini JB. Effects of in vivo taurine depletion on induced-chemiluminescence production in macrophages isolated from rat lungs. *Amino Acids* 1998; 15(1-2):179-186.
- Zimmermann G, Prescott SM, McIntyre TM. Endothelial cell interactions with granulocytes: tethering and signaling molecules. *Immunol Today* 1992; 13:93-100.

## 8 ANHANG

### 8.1 Ergebnistabellen

#### 8.1.1 Taurin

Saure Aminosäuren		Taurin-Konzentration				
Säureamid	Kontrolle	0,05 mM	0,1 mM	0,2 mM	0,5 mM	1 mM
<b>Asparagin</b>	0,38 ± 0,06	0,39 ± 0,07	0,41 ± 0,06	0,40 ± 0,06	0,39 ± 0,05	0,40 ± 0,06
<b>Glutamin</b>	3,02 ± 0,64	3,15 ± 0,67	3,10 ± 0,65	3,18 ± 0,63	2,92 ± 0,62	2,84 ± 0,57
<b>Aspartat</b>	2,79 ± 0,45	2,86 ± 0,48	2,89 ± 0,50	2,99 ± 0,49	2,78 ± 0,46	2,82 ± 0,47
<b>Glutamat</b>	5,77 ± 0,81	5,99 ± 0,89	5,93 ± 0,85	6,03 ± 0,87	5,82 ± 0,84	6,05 ± 0,92

**Tabelle 5:** Einfluß von **Taurin** (Inkubationszeit: 120 min; n= 10) auf den freien intrazellulären Gehalt **saurer Aminosäuren** (**Aspartat, Glutamat**) sowie ihrer **Säureamide** (**Asparagin, Glutamin**) in PMN. Die Ergebnisse sind in Aminosäuregehalt [ $10^{-16}$  Mol] pro PMN-Zelle angegeben (MW ± SD). \* ≤ 0,05 versus Kontrolle.

Basische Aminosäuren		Taurin-Konzentration				
Säureamid	Kontrolle	0,05 mM	0,1 mM	0,2 mM	0,5 mM	1 mM
<b>Ornithin</b>	0,44 ± 0,09	0,46 ± 0,09	0,47 ± 0,09	0,49 ± 0,10	0,48 ± 0,10	0,44 ± 0,09
<b>Lysin</b>	0,65 ± 0,12	0,60 ± 0,11	0,69 ± 0,13	0,57 ± 0,09	0,67 ± 0,12	0,65 ± 0,12
<b>Arginin</b>	0,28 ± 0,05	0,30 ± 0,06	0,28 ± 0,05	0,27 ± 0,05	0,29 ± 0,05	0,27 ± 0,05
<b>Citrullin</b>	0,09 ± 0,02	0,10 ± 0,02	0,09 ± 0,02	0,09 ± 0,02	0,09 ± 0,02	0,10 ± 0,02

**Tabelle 6:** Einfluß von **Taurin** (Inkubationszeit: 120 min; n= 10) auf den freien intrazellulären Gehalt **basischer Aminosäuren** (**Ornithin, Lysin, Arginin, Citrullin**) in PMN. Die Ergebnisse sind in Aminosäuregehalt [ $10^{-16}$  Mol] pro PMN-Zelle.

**BCAA, Methionin**

Säureamid	Kontrolle	Taurin-Konzentration				
		0,05 mM	0,1 mM	0,2 mM	0,5 mM	1 mM
<b>Isoleucin</b>	0,35 ± 0,07	0,33 ± 0,07	0,33 ± 0,06	0,34 ± 0,07	0,34 ± 0,07	0,36 ± 0,07
<b>Leucin</b>	0,81 ± 0,18	0,78 ± 0,17	0,80 ± 0,17	0,75 ± 0,17	0,64 ± 0,14	0,72 ± 0,16
<b>Valin</b>	0,46 ± 0,09	0,42 ± 0,09	0,43 ± 0,09	0,45 ± 0,09	0,49 ± 0,11	0,46 ± 0,10
<b>Methionin</b>	0,16 ± 0,03	0,19 ± 0,04	0,18 ± 0,04	0,17 ± 0,03	0,18 ± 0,04	0,18 ± 0,04
<b>Taurin</b>	43,4 ± 7,8	43,8 ± 8,0	44,9 ± 8,2	47,5 ± 8,4	51,8 ± 9,3	<b>55,8 ± 9,7</b>
<b>Hypotaurin</b>	1,35 ± 0,33	1,42 ± 0,35	1,26 ± 0,31	<b>1,01 ± 0,26</b>	<b>0,85 ± 0,25</b>	<b>0,56 ± 0,17</b>

**Tabelle 7:** Einfluß von **Taurin** (Inkubationszeit: 120 min; n= 10) auf den freien intrazellulären Gehalt **verzweigt-kettiger Aminosäuren** [BCAA (**Isoleucin**, **Leucin**, **Valin**)], **Methionin**, **Taurin** und **Hypotaurin** in PMN. Die Ergebnisse sind in Aminosäuregehalt [ $10^{-16}$  Mol] pro PMN-Zelle angegeben (MW ± SD). **Fett:**  $p \leq 0,05$  versus Kontrolle.

**Neutrale Aminosäuren**

Säureamid	Kontrolle	Taurin-Konzentration				
		0,05 mM	0,1 mM	0,2 mM	0,5 mM	1 mM
<b>Serin</b>	2,20 ± 0,53	2,03 ± 0,50	1,87 ± 0,42	<b>1,25 ± 0,32</b>	<b>0,95 ± 0,25</b>	<b>0,74 ± 0,20</b>
<b>Glycin</b>	2,17 ± 0,49	2,12 ± 0,46	2,01 ± 0,43	<b>1,18 ± 0,29</b>	<b>0,99 ± 0,24</b>	<b>0,69 ± 0,19</b>
<b>Threonin</b>	0,69 ± 0,12	0,68 ± 0,12	0,66 ± 0,11	<b>0,49 ± 0,10</b>	<b>0,39 ± 0,08</b>	<b>0,25 ± 0,06</b>
<b>Alanin</b>	1,74 ± 0,33	1,76 ± 0,34	1,62 ± 0,41	1,51 ± 0,38	<b>1,39 ± 0,37</b>	<b>1,18 ± 0,27</b>
<b><math>\alpha</math>-Aba</b>	0,26 ± 0,05	0,25 ± 0,05	0,24 ± 0,05	<b>0,16 ± 0,04</b>	<b>0,12 ± 0,02</b>	<b>0,09 ± 0,02</b>

**Tabelle 8:** Einfluß von **Taurin** (Inkubationszeit: 120 min; n= 10) auf den freien intrazellulären Gehalt **neutraler Aminosäuren** [**Serin**, **Glycin**, **Threonin**, **Alanin**,  **$\alpha$ -Aminobutyrat ( $\alpha$ -Aba)**] in PMN. Die Ergebnisse sind in Aminosäuregehalt [ $10^{-16}$  Mol] pro PMN-Zelle angegeben (MW ± SD). **Fett:**  $p \leq 0,05$  versus Kontrolle.

---

**Aromatische Aminosäuren**

Säureamid	Kontrolle	Taurin-Konzentration				
		0,05 mM	0,1 mM	0,2 mM	0,5 mM	1 mM
<b>Tyrosin</b>	0,29 ± 0,06	0,28 ± 0,05	0,29 ± 0,06	0,28 ± 0,05	0,31 ± 0,05	0,30 ± 0,06
<b>Tryptophan</b>	0,13 ± 0,02	0,13 ± 0,02	0,12 ± 0,02	0,12 ± 0,02	0,13 ± 0,02	0,13 ± 0,02
<b>Phenylalanin</b>	1,67 ± 0,46	1,74 ± 0,49	1,79 ± 0,50	1,76 ± 0,48	1,73 ± 0,46	1,66 ± 0,45
<b>Histidin</b>	0,63 ± 0,14	0,66 ± 0,15	0,62 ± 0,15	0,59 ± 0,13	0,64 ± 0,14	0,66 ± 0,15

**Tabelle 9:** Einfluß von **Taurin** (Inkubationszeit: 120 min; n= 10) auf den freien intrazellulären Gehalt **aromatischer Aminosäuren** (**Tyrosin**, **Tryptophan**, **Phenylalanin**, **Histidin**) in PMN. Die Ergebnisse sind in Aminosäuregehalt [ $10^{-16}$  Mol] pro PMN-Zelle angegeben (MW ± SD). \* ≤ 0,05 versus Kontrolle.

---

**O<sub>2</sub><sup>-</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, MPO**

Säureamid	Kontrolle	Taurin-Konzentration				
		0,05 mM	0,1 mM	0,2 mM	0,5 mM	1 mM
<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	3,32 ± 0,45	3,29 ± 0,45	3,12 ± 0,44	<b>2,46 ± 0,39</b>	<b>2,11 ± 0,37</b>	<b>1,53 ± 0,29</b>
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	1,30 ± 0,25	1,30 ± 0,25	1,30 ± 0,25	<b>0,94 ± 0,22</b>	<b>0,79 ± 0,19</b>	<b>0,55 ± 0,14</b>
<b>MPO</b>	0,45 ± 0,14	0,48 ± 0,15	0,53 ± 0,16	0,61 ± 0,19	<b>0,65 ± 0,19</b>	<b>0,72 ± 0,22</b>

**Tabelle 10:** Einfluß von **Taurin** (Inkubationszeit: 120 min; n= 10) auf die **Superoxidationbildung** [O<sub>2</sub><sup>-</sup>; fMol O<sub>2</sub><sup>-</sup>/(PMN x min)], die **Wasserstoffperoxidproduktion** [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; fMol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/(PMN x min)] sowie die **Myeloperoxidaseaktivität** [MPO; Units/l] isolierter PMN (MW ± SD). **Fett:** p ≤ 0,05 versus Kontrolle.

<b>Saure Aminosäuren</b>				
<b>Säureamid</b>	<b>Inkubationszeit</b>			
	<b>10 min</b>	<b>30 min</b>	<b>60 min</b>	<b>120 min</b>
<b>Kontrolle</b>				
<b>Asparagin</b>	0,41 ± 0,06	0,40 ± 0,06	0,37 ± 0,05	0,42 ± 0,07
<b>Glutamin</b>	2,92 ± 0,61	2,90 ± 0,60	2,86 ± 0,59	2,98 ± 0,67
<b>Aspartat</b>	3,02 ± 0,53	3,12 ± 0,56	3,07 ± 0,55	3,04 ± 0,55
<b>Glutamat</b>	6,26 ± 0,96	6,13 ± 0,92	6,18 ± 0,94	6,39 ± 0,99
<b>Tau (1mM)</b>				
<b>Asparagin</b>	0,40 ± 0,07	0,39 ± 0,07	0,38 ± 0,06	0,43 ± 0,09
<b>Glutamin</b>	2,96 ± 0,65	2,88 ± 0,58	2,90 ± 0,64	3,02 ± 0,67
<b>Aspartat</b>	2,86 ± 0,60	2,92 ± 0,63	2,90 ± 0,64	2,93 ± 0,68
<b>Glutamat</b>	6,02 ± 1,03	6,08 ± 1,04	5,99 ± 0,96	6,10 ± 1,08
<b>Asparagin</b>	0,40 ± 0,07	0,39 ± 0,07	0,38 ± 0,06	0,43 ± 0,09

**Tabelle 11:** Einfluß von **Taurin (Tau)** (Inkubationszeiten: 10, 30, 60 und 120 min; n= 10), auf den freien intrazellulären Gehalt **saurer Aminosäuren (Aspartat, Glutamat)** sowie ihrer **Säureamide (Asparagin, Glutamin)** in PMN. Die Ergebnisse sind in Aminosäuregehalt [ $10^{-16}$  Mol] pro PMN-Zelle angegeben angegeben (MW ± SD).

<b>Basische Aminosäuren</b>				
<b>Säureamid</b>	<b>Inkubationszeit</b>			
	<b>10 min</b>	<b>30 min</b>	<b>60 min</b>	<b>120 min</b>
<b>Kontrolle</b>				
<b>Ornithin</b>	0,45 ± 0,08	0,46 ± 0,08	0,47 ± 0,09	0,46 ± 0,08
<b>Lysin</b>	0,64 ± 0,11	0,61 ± 0,11	0,67 ± 0,12	0,63 ± 0,11
<b>Arginin</b>	0,34 ± 0,07	0,33 ± 0,07	0,32 ± 0,06	0,33 ± 0,07
<b>Citrullin</b>	0,12 ± 0,03	0,11 ± 0,03	0,12 ± 0,03	0,12 ± 0,03
<b>Tau (1mM)</b>				
<b>Ornithin</b>	0,45 ± 0,08	0,47 ± 0,09	0,48 ± 0,10	0,50 ± 0,11
<b>Lysin</b>	0,67 ± 0,12	0,71 ± 0,13	0,58 ± 0,12	0,60 ± 0,12
<b>Arginin</b>	0,38 ± 0,09	0,40 ± 0,09	0,29 ± 0,06	0,31 ± 0,07
<b>Citrullin</b>	0,10 ± 0,02	0,12 ± 0,03	0,11 ± 0,03	0,12 ± 0,03
<b>Ornithin</b>	0,45 ± 0,08	0,47 ± 0,09	0,48 ± 0,10	0,50 ± 0,11

**Tabelle 12:** Einfluß von **Taurin (Tau)** (Inkubationszeiten: 10, 30, 60 und 120 min; n= 10), auf den freien intrazellulären Gehalt **basischer Aminosäuren (Ornithin, Lysin, Arginin, Citrullin)** in PMN. Die Ergebnisse sind in Aminosäuregehalt [ $10^{-16}$  Mol] pro PMN-Zelle angegeben angegeben (MW ± SD).

<b>BCAA, Methionin</b>				
<b>Säureamid</b>	<b>Inkubationszeit</b>			
	<b>10 min</b>	<b>30 min</b>	<b>60 min</b>	<b>120 min</b>
<b>Kontrolle</b>				
<b>Isoleucin</b>	0,39 ± 0,07	0,39 ± 0,07	0,38 ± 0,07	0,40 ± 0,07
<b>Leucin</b>	0,70 ± 0,15	0,67 ± 0,15	0,69 ± 0,16	0,72 ± 0,17
<b>Valin</b>	0,59 ± 0,14	0,58 ± 0,13	0,56 ± 0,13	0,55 ± 0,12
<b>Methionin</b>	0,15 ± 0,03	0,16 ± 0,03	0,16 ± 0,03	0,17 ± 0,03
<b>Taurin</b>	40,8 ± 7,7	40,4 ± 7,5	41,0 ± 7,8	41,3 ± 8,0
<b>Hypotaurin</b>	1,44 ± 0,34	1,51 ± 0,36	1,37 ± 0,32	1,31 ± 0,31
<b>Tau (1mM)</b>				
<b>Isoleucin</b>	0,35 ± 0,07	0,35 ± 0,07	0,34 ± 0,06	0,36 ± 0,07
<b>Leucin</b>	0,67 ± 0,15	0,69 ± 0,16	0,62 ± 0,14	0,68 ± 0,17
<b>Valin</b>	0,46 ± 0,09	0,46 ± 0,09	0,47 ± 0,10	0,47 ± 0,10
<b>Methionin</b>	0,17 ± 0,04	0,18 ± 0,04	0,19 ± 0,04	0,18 ± 0,04
<b>Taurin</b>	42,3 ± 8,2	46,4 ± 8,4	<b>51,5 ± 9,1</b>	<b>54,1 ± 9,5</b>
<b>Hypotaurin</b>	1,49 ± 0,36	1,19 ± 0,35	<b>0,86 ± 0,23</b>	<b>0,59 ± 0,18</b>
<b>Isoleucin</b>	0,35 ± 0,07	0,35 ± 0,07	0,34 ± 0,06	0,36 ± 0,07

**Tabelle 13:** Einfluß von **Taurin (Tau)** (Inkubationszeiten: 10, 30, 60 und 120 min; n= 10), auf den freien intrazellulären Gehalt **verzweigtkettiger Aminosäuren [BCAA (Isoleucin, Leucin, Valin)] Methionin, Taurin und Hypotaurin** in PMN. Die Ergebnisse sind in Aminosäuregehalt [ $10^{-16}$  Mol] pro PMN-Zelle angegeben angegeben (MW ± SD). **Fett:** p ≤ 0,05 versus Kontrolle und p ≤ 0,05 versus 10 min.

<b>Neutrale Aminosäuren</b>				
<b>Säureamid</b>	<b>Inkubationszeit</b>			
	<b>10 min</b>	<b>30 min</b>	<b>60 min</b>	<b>120 min</b>
<b>Kontrolle</b>				
<b>Serin</b>	2,22 ± 0,47	2,28 ± 0,47	2,29 ± 0,45	2,30 ± 0,50
<b>Glycin</b>	2,41 ± 0,51	2,36 ± 0,49	2,46 ± 0,52	2,39 ± 0,50
<b>Threonin</b>	0,66 ± 0,09	0,70 ± 0,10	0,73 ± 0,12	0,71 ± 0,11
<b>Alanin</b>	1,86 ± 0,38	1,80 ± 0,36	1,79 ± 0,32	1,90 ± 0,40
<b>Tau (1mM)</b>				
<b>Serin</b>	1,78 ± 0,38	<b>1,43 ± 0,32</b>	<b>1,07 ± 0,27</b>	<b>0,82 ± 0,23</b>
<b>Glycin</b>	1,94 ± 0,45	<b>1,44 ± 0,30</b>	<b>1,12 ± 0,23</b>	<b>0,81 ± 0,18</b>
<b>Threonin</b>	0,60 ± 0,10	<b>0,44 ± 0,07</b>	<b>0,29 ± 0,06</b>	<b>0,22 ± 0,05</b>
<b>Alanin</b>	1,92 ± 0,41	1,65 ± 0,39	<b>1,48 ± 0,36</b>	<b>1,26 ± 0,32</b>
<b>α-Aba</b>	0,27 ± 0,05	<b>0,20 ± 0,04</b>	<b>0,14 ± 0,03</b>	<b>0,10 ± 0,02</b>

**Tabelle 14:** Einfluß von **Taurin (Tau)** (Inkubationszeiten: 10, 30, 60 und 120 min; n= 10), auf den freien intrazellulären Gehalt **neutraler Aminosäuren [Serin, Glycin, Threonin, Alanin, α-Aminobutyrat (α-Aba)]** in PMN. Die Ergebnisse sind in Aminosäuregehalt [ $10^{-16}$  Mol] pro PMN-Zelle angegeben angegeben (MW ± SD). **Fett:** p ≤ 0,05 versus Kontrolle und p ≤ 0,05 versus 10 min.

<b>Aromatische Aminosäuren</b>				
<b>Säureamid</b>	<b>Inkubationszeit</b>			
	<b>10 min</b>	<b>30 min</b>	<b>60 min</b>	<b>120 min</b>
<b>Kontrolle</b>				
<b>Tyrosin</b>	0,30 ± 0,06	0,31 ± 0,06	0,29 ± 0,06	0,32 ± 0,06
<b>Tryptophan</b>	0,13 ± 0,02	0,13 ± 0,02	0,13 ± 0,02	0,13 ± 0,02
<b>Phenylalanin</b>	1,62 ± 0,44	1,60 ± 0,45	1,70 ± 0,46	1,73 ± 0,46
<b>Histidin</b>	0,65 ± 0,15	0,69 ± 0,16	0,62 ± 0,14	0,61 ± 0,14
<b>Tau (1mM)</b>				
<b>Tyrosin</b>	0,30 ± 0,05	0,32 ± 0,06	0,32 ± 0,06	0,30 ± 0,06
<b>Tryptophan</b>	0,13 ± 0,02	0,12 ± 0,02	0,13 ± 0,02	0,12 ± 0,02
<b>Phenylalanin</b>	1,59 ± 0,44	1,62 ± 0,45	1,53 ± 0,41	1,59 ± 0,44
<b>Histidin</b>	0,67 ± 0,13	0,69 ± 0,16	0,63 ± 0,14	0,61 ± 0,14
<b>Tyrosin</b>	0,30 ± 0,05	0,32 ± 0,06	0,32 ± 0,06	0,30 ± 0,06

**Tabelle 15:** Einfluß von **Taurin (Tau)** (Inkubationszeiten: 10, 30, 60 und 120 min; n= 10), auf den freien intrazellulären Gehalt **aromatischer Aminosäuren (Tyrosin, Tryptophan, Phenylalanin, Histidin)** in PMN. Die Ergebnisse sind in in Aminosäuregehalt [ $10^{-16}$  Mol] pro PMN-Zelle angegeben (MW ± SD).

<b><math>\alpha</math>-Ketosauren</b>				
<b>Ketosäure</b>	<b>Taurin-Konzentration</b>			
	<b>Kontrolle</b>	<b>0,1 mM</b>	<b>0,5 mM</b>	<b>1,0 mM</b>
<b>Tau (10 min)</b>				
<b><math>\alpha</math>-KG</b>	1,48 ± 0,37	1,39 ± 0,35	1,57 ± 0,40	1,70 ± 0,43
<b>PYR</b>	5,89 ± 1,43	6,17 ± 1,51	5,95 ± 1,39	5,67 ± 1,36
<b><math>\alpha</math>-KB</b>	4,83 ± 1,07	5,02 ± 1,14	4,57 ± 1,08	4,35 ± 1,13
<b><math>\alpha</math>-KIV</b>	1,95 ± 0,41	2,05 ± 0,49	2,23 ± 0,52	2,39 ± 0,56
<b><math>\alpha</math>-KIC</b>	0,48 ± 0,11	0,50 ± 0,12	0,53 ± 0,12	0,56 ± 0,17
<b>PhePYR</b>	0,40 ± 0,09	0,49 ± 0,12	0,45 ± 0,12	0,50 ± 0,13
<b><math>\alpha</math>-KMV</b>	0,89 ± 0,22	0,93 ± 0,25	0,80 ± 0,21	0,86 ± 0,23
<b>Tau (120 min)</b>				
<b><math>\alpha</math>-KG</b>	1,76 ± 0,38	1,60 ± 0,35	1,69 ± 0,37	1,81 ± 0,40
<b>PYR</b>	6,36 ± 1,38	6,04 ± 1,44	5,56 ± 1,34	4,81 ± 1,21
<b><math>\alpha</math>-KB</b>	4,83 ± 1,07	4,30 ± 1,01	<b>3,59 ± 0,90</b>	<b>2,31 ± 0,56</b>
<b><math>\alpha</math>-KIV</b>	2,09 ± 0,47	1,89 ± 0,44	2,02 ± 0,46	2,23 ± 0,51
<b><math>\alpha</math>-KIC</b>	0,40 ± 0,10	0,38 ± 0,10	0,44 ± 0,11	0,47 ± 0,12
<b>PhePYR</b>	0,39 ± 0,08	0,44 ± 0,11	0,42 ± 0,10	0,40 ± 0,09
<b><math>\alpha</math>-KMV</b>	0,78 ± 0,18	0,82 ± 0,19	0,75 ± 0,18	0,79 ± 0,17

**Tabelle 16:** Einfluß von **Taurin (Tau)** (n= 10, Inkubationszeiten: 10 und 120 min) auf die freien  **$\alpha$ -Ketosaurekonzentrationen** [ **$\alpha$ -Ketoglutarat ( $\alpha$ -KG)**, **Pyruvat (PYR =  $\alpha$ -Ketoalanin)**,  **$\alpha$ -Ketobutyrat ( $\alpha$ -KB)**,  **$\alpha$ -Ketoisovalerianat ( $\alpha$ -KIV)**,  **$\alpha$ -Ketoisocapronat ( $\alpha$ -KIC)**, **p-Hydroxy-Phenylpyruvat (PhePYR)**,  **$\alpha$ -Keto- $\beta$ -methylvalerianat ( $\alpha$ -KMV)] in PMN. Die Ergebnisse sind in  **$\alpha$ -Ketosauregehalt** [ $10^{-17}$  Mol] pro PMN-Zelle angegeben (MW  $\pm$  SD). Kursiv: p  $\leq$  0,05 versus Kontrolle, **Fett**: p  $\leq$  0,05: 120 min versus 10 min und versus Kontrolle.**

<b><math>O_2^-</math>, <math>H_2O_2</math>, MPO</b>				
	<b>Taurin</b>			
	<b>10 min</b>	<b>30 min</b>	<b>60 min</b>	<b>120 min</b>
<b>Kontrolle</b>				
<b><math>O_2^-</math></b>	3,298 ± 0,501	3,316 ± 0,532	3,226 ± 0,551	3,047 ± 0,484
<b><math>H_2O_2</math></b>	1,187 ± 0,261	1,128 ± 0,247	1,165 ± 0,270	1,058 ± 0,245
<b>MPO</b>	0,543 ± 0,161	0,567 ± 0,176	0,529 ± 0,158	0,485 ± 0,153
<b>Tau (1 mM)</b>				
<b><math>O_2^-</math></b>	2,997 ± 0,489	2,707 ± 0,467*	2,139 ± 0,343*#	1,603 ± 0,264*#
<b><math>H_2O_2</math></b>	1,016 ± 0,231	0,876 ± 0,192*	0,699 ± 0,159*#	0,486 ± 0,114*#
<b>MPO</b>	0,527 ± 0,161	0,688 ± 0,213	0,753 ± 0,238	0,786 ± 0,250*#

**Tabelle 17:** Einfluß von **Taurin (Tau)** (Inkubationszeiten: 10, 30, 60 und 120 min; n= 10), auf die **Superoxidationbildung** [ $O_2^-$ ; fMol  $O_2^-$ /(PMN x min)], die **Wasserstoffperoxidproduktion** [ $H_2O_2$ ; fMol  $H_2O_2$ /(PMN x min)] sowie die **Myeloperoxidaseaktivität** [MPO; Units/l] isolierter menschlicher polymorphkerniger Granulozyten (MW  $\pm$  SD). \*  $\leq$  0,05 versus Kontrolle; #  $\leq$  0,05 versus 10 min.

## 8.1.2 Stoffwechselmodulator $\beta$ -Alanin ( $\beta$ -Ala)

### Saure Aminosäuren

	10 min		60 min		120 min	
	Kontrolle	$\beta$ -Ala	Kontrolle	$\beta$ -Ala	Kontrolle	$\beta$ -Ala
<b>Asn</b>	0,37 $\pm$ 0,06	0,40 $\pm$ 0,06	0,40 $\pm$ 0,06	0,36 $\pm$ 0,05	0,36 $\pm$ 0,05	0,37 $\pm$ 0,06
<b>Gln</b>	2,80 $\pm$ 0,58	2,92 $\pm$ 0,62	2,88 $\pm$ 0,60	2,78 $\pm$ 0,60	2,70 $\pm$ 0,56	2,63 $\pm$ 0,55
<b>Asp</b>	2,83 $\pm$ 0,45	2,80 $\pm$ 0,45	2,94 $\pm$ 0,48	2,73 $\pm$ 0,46	2,72 $\pm$ 0,43	2,51 $\pm$ 0,40
<b>Glu</b>	5,90 $\pm$ 0,86	5,88 $\pm$ 0,86	6,01 $\pm$ 0,88	5,86 $\pm$ 0,86	5,79 $\pm$ 0,85	5,58 $\pm$ 0,81

**Tabelle 18:** Einfluß von  $\beta$ -Alanin ( $\beta$ -Ala, 10 mM) auf den freien intrazellulären Gehalt **saurer Aminosäuren** [Asparagin (Asp), Glutamin (Gln)] sowie ihrer **Säureamide** [Aspartat (Asp), Glutamat (Glu)] in PMN (Inkubationszeiten: 10, 60 und 120 min; n= 10). Die Ergebnisse sind in Aminosäuregehalt [ $10^{-16}$  Mol] pro PMN-Zelle angegeben (MW  $\pm$  SD). \*  $\leq$  0,05 versus Kontrolle; #  $\leq$  0,05 versus 10 min.

### Basische Aminosäuren

	10 min		60 min		120 min	
	Kontrolle	$\beta$ -Ala	Kontrolle	$\beta$ -Ala	Kontrolle	$\beta$ -Ala
<b>Orn</b>	0,45 $\pm$ 0,07	0,46 $\pm$ 0,08	0,46 $\pm$ 0,08	0,44 $\pm$ 0,08	0,47 $\pm$ 0,09	0,49 $\pm$ 0,10
<b>Lys</b>	0,61 $\pm$ 0,11	0,59 $\pm$ 0,10	0,67 $\pm$ 0,12	0,70 $\pm$ 0,60	0,64 $\pm$ 0,13	0,73 $\pm$ 0,13
<b>Arg</b>	0,32 $\pm$ 0,06	0,32 $\pm$ 0,06	0,33 $\pm$ 0,07	0,35 $\pm$ 0,07	0,32 $\pm$ 0,06	0,35 $\pm$ 0,06
<b>Cit</b>	0,12 $\pm$ 0,02	0,13 $\pm$ 0,03	0,12 $\pm$ 0,03	0,13 $\pm$ 0,02	0,11 $\pm$ 0,02	0,12 $\pm$ 0,02

**Tabelle 19:** Einfluß von  $\beta$ -Alanin ( $\beta$ -Ala, 10 mM) auf den freien intrazellulären Gehalt **basischer Aminosäuren** [Ornithin (Orn), Lysin (Lys), Arginin (Arg), Citrullin (Cit)] in PMN (Inkubationszeiten: 10, 60 und 120 min; n= 10). Die Ergebnisse sind in Aminosäuregehalt [ $10^{-16}$  Mol] pro PMN-Zelle angegeben (MW  $\pm$  SD). \*  $\leq$  0,05 versus Kontrolle; #  $\leq$  0,05 versus 10 min.

---

**BCAA, Methionin, Taurin, Hypotaurin**

	10 min		60 min		120 min	
	Kontrolle	$\beta$ -Ala	Kontrolle	$\beta$ -Ala	Kontrolle	$\beta$ -Ala
<b>Ile</b>	0,40 $\pm$ 0,07	0,46 $\pm$ 0,08	0,39 $\pm$ 0,07	0,42 $\pm$ 0,08	0,38 $\pm$ 0,07	0,40 $\pm$ 0,07
<b>Leu</b>	0,69 $\pm$ 0,16	0,63 $\pm$ 0,16	0,70 $\pm$ 0,15	0,79 $\pm$ 0,16	0,67 $\pm$ 0,13	0,59 $\pm$ 0,14
<b>Val</b>	0,58 $\pm$ 0,12	0,60 $\pm$ 0,14	0,55 $\pm$ 0,11	0,52 $\pm$ 0,12	0,59 $\pm$ 0,11	0,65 $\pm$ 0,15
<b>Met</b>	0,15 $\pm$ 0,03	0,17 $\pm$ 0,03	0,16 $\pm$ 0,03	0,18 $\pm$ 0,04	0,17 $\pm$ 0,04	0,18 $\pm$ 0,04
<b>Tau</b>	41,0 $\pm$ 7,8	37,4 $\pm$ 7,2	40,3 $\pm$ 7,4	29,0 $\pm$ 5,7*#	39,8 $\pm$ 7,2	24,7 $\pm$ 5,1*#
<b>H-Tau</b>	1,54 $\pm$ 0,34	1,48 $\pm$ 0,32	1,30 $\pm$ 0,32	0,99 $\pm$ 0,24*#	1,39 $\pm$ 0,21	0,79 $\pm$ 0,2*#

**Tabelle 20:** Einfluß von  $\beta$ -Alanin ( $\beta$ -Ala, 10 mM) auf den freien intrazellulären Gehalt **verzweigtkettiger Aminosäuren** [BCAA: Isoleucin (Ile), Leucin (Leu), Valin (Val)] sowie **Taurin (Tau), Hypotaurin (H-Tau)** und **Methionin (Met)** in PMN (Inkubationszeiten: 10, 60 und 120 min; n= 10). Die Ergebnisse sind in Aminosäuregehalt [ $10^{-16}$  Mol] pro PMN-Zelle angegeben (MW  $\pm$  SD). \*  $\leq$  0,05 versus Kontrolle; #  $\leq$  0,05 versus 10 min.

---

**Neutrale Aminosäuren**

	10 min		60 min		120 min	
	Kontrolle	$\beta$ -Ala	Kontrolle	$\beta$ -Ala	Kontrolle	$\beta$ -Ala
<b>Ser</b>	2,29 $\pm$ 0,45	2,51 $\pm$ 0,50	2,19 $\pm$ 0,43	3,76 $\pm$ 0,73*#	2,08 $\pm$ 0,41	3,94 $\pm$ 0,83*#
<b>Gly</b>	2,39 $\pm$ 0,50	2,64 $\pm$ 0,55	2,30 $\pm$ 0,49	3,83 $\pm$ 0,79*#	2,32 $\pm$ 0,47	4,69 $\pm$ 1,11*#
<b>Thr</b>	0,73 $\pm$ 0,12	0,80 $\pm$ 0,13	0,69 $\pm$ 0,11	1,01 $\pm$ 0,22*	0,66 $\pm$ 0,10	1,30 $\pm$ 0,30*#
<b>Ala</b>	1,80 $\pm$ 0,36	1,96 $\pm$ 0,48	1,79 $\pm$ 0,32	2,47 $\pm$ 0,60*	1,98 $\pm$ 0,32	2,69 $\pm$ 0,57*#
<b>Aba</b>	0,28 $\pm$ 0,05	0,28 $\pm$ 0,05	0,26 $\pm$ 0,04	0,34 $\pm$ 0,06*#	0,26 $\pm$ 0,05	0,41 $\pm$ 0,07*#

**Tabelle 21:** Einfluß von  $\beta$ -Alanin ( $\beta$ -Ala, 10 mM) auf den freien intrazellulären Gehalt **neutraler Aminosäuren** [Serin (Ser), Glycin (Gly), Threonin (Thr), Alanin (Ala),  $\alpha$ -Aminobutyrat (Aba)] in PMN (Inkubationszeiten: 10, 60 und 120 min; n= 10). Ergebnisse sind in Aminosäuregehalt [ $10^{-16}$  Mol] pro PMN-Zelle angegeben (MW  $\pm$  SD). \*  $\leq$  0,05 versus Kontrolle; #  $\leq$  0,05 versus 10 min.

---

**Aromatische Aminosäuren**

	10 min		60 min		120 min	
	Kontrolle	$\beta$ -Ala	Kontrolle	$\beta$ -Ala	Kontrolle	$\beta$ -Ala
<b>Tyr</b>	0,29 $\pm$ 0,05	0,28 $\pm$ 0,05	0,28 $\pm$ 0,05	0,31 $\pm$ 0,05	0,35 $\pm$ 0,08	0,31 $\pm$ 0,05
<b>Trp</b>	0,24 $\pm$ 0,05	0,20 $\pm$ 0,04	0,23 $\pm$ 0,05	0,19 $\pm$ 0,04	0,20 $\pm$ 0,04	0,19 $\pm$ 0,04
<b>Phe</b>	1,73 $\pm$ 0,47	1,73 $\pm$ 0,47	1,74 $\pm$ 0,49	1,73 $\pm$ 0,46	1,40 $\pm$ 0,40	1,46 $\pm$ 0,43
<b>His</b>	0,51 $\pm$ 0,12	0,60 $\pm$ 0,14	0,66 $\pm$ 0,15	0,64 $\pm$ 0,14	0,64 $\pm$ 0,15	0,68 $\pm$ 0,16

**Tabelle 22:** Einfluß von  $\beta$ -Alanin ( $\beta$ -Ala, 10 mM) auf den freien intrazellulären Gehalt **aromatischer Aminosäuren** [Tyrosin (Tyr), Tryptophan (Trp), Phenylalanin (Phe), Histidin (His)] in PMN (Inkubationszeiten: 10, 60 und 120 min; n= 10). Die Ergebnisse sind in Aminosäuregehalt [ $10^{-16}$  Mol] pro PMN-Zelle angegeben (MW  $\pm$  SD). \*  $\leq$  0,05 versus Kontrolle; #  $\leq$  0,05 versus 10 min.

---

 **$\alpha$ -Ketosäuren**

	10 min		120 min	
	Kontrolle	$\beta$ -Ala	Kontrolle	$\beta$ -Ala
<b><math>\alpha</math>-KG</b>	1,37 $\pm$ 0,27	1,19 $\pm$ 0,26	1,19 $\pm$ 0,24	1,27 $\pm$ 0,30
<b>PYR</b>	5,96 $\pm$ 1,19	6,43 $\pm$ 1,62	5,76 $\pm$ 1,03	7,08 $\pm$ 1,35*
<b><math>\alpha</math>-KB</b>	4,20 $\pm$ 0,89	4,73 $\pm$ 1,17	4,39 $\pm$ 0,86	5,67 $\pm$ 1,20*
<b><math>\alpha</math>-KIV</b>	2,20 $\pm$ 0,49	2,33 $\pm$ 0,52	2,31 $\pm$ 0,38	2,65 $\pm$ 0,61
<b><math>\alpha</math>-KIC</b>	0,38 $\pm$ 0,08	0,40 $\pm$ 0,09	0,36 $\pm$ 0,07	0,43 $\pm$ 0,10
<b>PhePYR</b>	0,31 $\pm$ 0,07	0,34 $\pm$ 0,08	0,32 $\pm$ 0,07	0,38 $\pm$ 0,08
<b><math>\alpha</math>-KMV</b>	0,80 $\pm$ 0,16	0,85 $\pm$ 0,16	0,75 $\pm$ 0,13	0,78 $\pm$ 0,15

**Tabelle 23:** Einfluß von  $\beta$ -Alanin ( $\beta$ -Ala, 10 mM) auf den freien intrazellulären Gehalt von  **$\alpha$ -Ketosäuren** [ $\alpha$ -Ketoglutarat ( $\alpha$ -KG), Pyruvat (PYR =  $\alpha$ -Ketoalanin),  $\alpha$ -Ketobutyrat ( $\alpha$ -KB),  $\alpha$ -Ketoisovalerianat ( $\alpha$ -KIV),  $\alpha$ -Ketoisocapronat ( $\alpha$ -KIC), p-Hydroxy-Phenylpyruvat (PhePYR),  $\alpha$ -Keto- $\beta$ -methylvalerianat ( $\alpha$ -KMV)] in PMN (Inkubationszeiten: 10 und 120 min; n= 10). Die Ergebnisse sind in  $\alpha$ -Ketosäuregehalt [ $10^{-17}$  Mol] pro PMN-Zelle angegeben (MW  $\pm$  SD). \*  $\leq$  0,05 versus Kontrolle; #  $\leq$  0,05: 120 min versus 10 min.

**O<sub>2</sub><sup>-</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, MPO**

	10 min		60 min		120 min	
	Kontrolle	β-Ala	Kontrolle	β-Ala	Kontrolle	β-Ala
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	3,536 ± 0,551	3,856 ± 0,662	3,461 ± 0,538	4,323 ± 0,767*	3,317 ± 0,528	4,891 ± 0,999*#
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1,324 ± 0,225	1,441 ± 0,257	1,239 ± 0,219	1,586 ± 0,303*	1,154 ± 0,195	1,869 ± 0,358*#
MPO	0,685 ± 0,175	0,636 ± 0,172	0,646 ± 0,161	0,495 ± 0,149	0,605 ± 0,153	0,437 ± 0,124*#

**Tabelle 24:** Einfluß von **β-Alanin (β-Ala, 10 mM)** auf die **Superoxidationbildung** [O<sub>2</sub><sup>-</sup>; fMol O<sub>2</sub><sup>-</sup>/(PMN x min)], die **Wasserstoffperoxidproduktion** [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; fMol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/(PMN x min)] sowie die **Myeloperoxidaseaktivität** [MPO; Units/l] isolierter PMN (MW ± SD); (Inkubationszeiten: 10, 60 und 120 min; n= 10). \* ≤ 0,05 versus Kontrolle; # ≤ 0,05 versus 10 min.

**8.1.3 Taurin + Stoffwechselmodulator β-Alanin****Saure Aminosäuren****Säureamide**

Tau	Kontrolle	Tau	Tau + β-Ala
Asn	0,41 ± 0,08	0,38 ± 0,06	0,39 ± 0,07
Gln	3,14 ± 0,63	3,05 ± 0,62	3,02 ± 0,61
Asp	3,01 ± 0,52	3,09 ± 0,55	2,98 ± 0,50
Glu	6,29 ± 0,96	6,49 ± 1,03	6,32 ± 1,01

**Tabelle 25:** Einfluß von **Taurin** [1 mM **Taurin (Tau)**; Inkubationszeit: 120 min; n= 10] kombiniert mit **β-Alanin (β-Ala, 10 mM)** auf den freien intrazellulären Gehalt **saurer Aminosäuren** [**Asparagin (Asp)**, **Glutamin (Glu)**] sowie ihrer **Säureamide** [(**Aspartat (Asp)**), **Glutamat (Gln)**] in PMN. Die Ergebnisse sind in Aminosäuregehalt [10<sup>-16</sup> Mol] pro PMN-Zelle angegeben (MW ± SD). \* ≤ 0,05 versus Kontrolle; # ≤ 0,05 versus alleiniger Aminosäureinkubation.

---

**Basische Aminosäuren**


---

<b>Tau</b>	<b>Kontrolle</b>	<b>Tau</b>	<b>Tau + <math>\beta</math>-Ala</b>
<b>Orn</b>	0,49 $\pm$ 0,08	0,48 $\pm$ 0,10	0,50 $\pm$ 0,11
<b>Lys</b>	0,65 $\pm$ 0,12	0,67 $\pm$ 0,12	0,59 $\pm$ 0,10
<b>Arg</b>	0,33 $\pm$ 0,05	0,30 $\pm$ 0,06	0,35 $\pm$ 0,07
<b>Cit</b>	0,12 $\pm$ 0,02	0,12 $\pm$ 0,02	0,11 $\pm$ 0,02

**Tabelle 26:** Einfluß von **Taurin** [1 mM **Taurin** (**Tau**); Inkubationszeit: 120 min; n= 10] kombiniert mit  **$\beta$ -Alanin** ( **$\beta$ -Ala**, 10 mM) auf den freien intrazellulären Gehalt **basischer Aminosäuren** [**Ornithin** (**Orn**), **Lysin** (**Lys**), **Arginin** (**Arg**), **Citrullin** (**Cit**)] in PMN. Die Ergebnisse sind in Aminosäuregehalt [ $10^{-16}$  Mol] pro PMN-Zelle angegeben (MW  $\pm$  SD). \*  $\leq$  0,05 versus Kontrolle; #  $\leq$  0,05 versus alleiniger Aminosäureinkubation.

---

**BCAA, Methionin, Taurin, Hypotaurin**


---

<b>Tau</b>	<b>Kontrolle</b>	<b>Tau</b>	<b>Tau + <math>\beta</math>-Ala</b>
<b>Ile</b>	0,56 $\pm$ 0,08	0,49 $\pm$ 0,07	0,52 $\pm$ 0,08
<b>Leu</b>	0,90 $\pm$ 0,15	0,81 $\pm$ 0,14	0,84 $\pm$ 0,14
<b>Val</b>	0,51 $\pm$ 0,09	0,44 $\pm$ 0,08	0,46 $\pm$ 0,08
<b>Met</b>	0,23 $\pm$ 0,04	0,24 $\pm$ 0,04	0,23 $\pm$ 0,04
<b>Tau</b>	41,0 $\pm$ 7,1	50,9 $\pm$ 7,8*	34,0 $\pm$ 6,7*#
<b>H-T</b>	1,86 $\pm$ 0,32	1,08 $\pm$ 0,17*	0,69 $\pm$ 0,17*#

**Tabelle 27:** Einfluß von **Taurin** [1 mM **Taurin** (**Tau**); Inkubationszeit: 120 min; n= 10] kombiniert mit  **$\beta$ -Alanin** ( **$\beta$ -Ala**, 10 mM) auf den freien intrazellulären Gehalt **verzweigtkettiger Aminosäuren** [BCAA: **Isoleucin** (**Ile**), **Leucin** (**Leu**), **Valin** (**Val**)] sowie **Taurin** (**Tau**), **Hypotaurin** (**H-T**) und **Methionin** (**Met**)] in PMN. Die Ergebnisse sind in Aminosäuregehalt [ $10^{-16}$  Mol] pro PMN-Zelle angegeben (MW  $\pm$  SD). \*  $\leq$  0,05 versus Kontrolle; #  $\leq$  0,05 versus alleiniger Aminosäureinkubation.

---

**Neutrale Aminosäuren**


---

<b>Tau</b>	<b>Kontrolle</b>	<b>Tau</b>	<b>Tau + <math>\beta</math>-Ala</b>
<b>Ser</b>	2,01 $\pm$ 0,51	1,10 $\pm$ 0,19*	3,03 $\pm$ 0,47*#
<b>Gly</b>	2,34 $\pm$ 0,39	1,37 $\pm$ 0,23*	3,29 $\pm$ 0,54*#
<b>Thr</b>	0,76 $\pm$ 0,11	0,48 $\pm$ 0,09*	1,01 $\pm$ 0,25*#
<b>Ala</b>	1,96 $\pm$ 0,36	1,19 $\pm$ 0,26*	2,46 $\pm$ 0,40*#
<b>Aba</b>	0,27 $\pm$ 0,05	0,14 $\pm$ 0,02*	0,33 $\pm$ 0,06*#

**Tabelle 28:** Einfluß von **Taurin** [1 mM **Taurin (Tau)**; Inkubationszeit: 120 min; n= 10] kombiniert mit  **$\beta$ -Alanin ( $\beta$ -Ala, 10 mM)** auf den freien intrazellulären Gehalt **neutraler Aminosäuren** [**Serin (Ser)**, **Glycin (Gly)**, **Threonin (Thr)**, **Alanin (Ala)**,  **$\alpha$ -Aminobutyrat (Aba)**] in PMN. Die Ergebnisse sind in Aminosäuregehalt [ $10^{-16}$  Mol] pro PMN-Zelle angegeben (MW  $\pm$  SD). \*  $\leq$  0,05 versus Kontrolle; #  $\leq$  0,05 versus alleiniger Aminosäureinkubation.

---

**Aromatische Aminosäuren**


---

<b>Tau</b>	<b>Kontrolle</b>	<b>Tau</b>	<b>Tau + <math>\beta</math>-Ala</b>
<b>Tyr</b>	0,87 $\pm$ 0,23	0,96 $\pm$ 0,25	0,84 $\pm$ 0,22
<b>Trp</b>	0,25 $\pm$ 0,06	0,27 $\pm$ 0,07	0,20 $\pm$ 0,06
<b>Phe</b>	1,23 $\pm$ 0,31	1,09 $\pm$ 0,30	0,94 $\pm$ 0,24
<b>His</b>	0,66 $\pm$ 0,15	0,60 $\pm$ 0,14	0,79 $\pm$ 0,17

**Tabelle 29:** Einfluß von **Taurin** [1 mM **Taurin (Tau)**; Inkubationszeit: 120 min; n= 10] kombiniert mit  **$\beta$ -Alanin ( $\beta$ -Ala, 10 mM)** auf den freien intrazellulären Gehalt **aromatischer Aminosäuren** [**Tyrosin (Tyr)**, **Tryptophan (Trp)**, **Phenylalanin (Phe)**, **Histidin (His)**] in PMN. Die Ergebnisse sind in Aminosäuregehalt [ $10^{-16}$  Mol] pro PMN-Zelle angegeben (MW  $\pm$  SD). \*  $\leq$  0,05 versus Kontrolle; #  $\leq$  0,05 versus alleiniger Aminosäureinkubation.

---

**A-KETOSÄUREN**


---

<b>Tau</b>	<b>Kontrolle</b>	<b>Tau</b>	<b>Tau +<math>\beta</math>-Ala</b>
<b>KG</b>	1,14 $\pm$ 0,18	1,28 $\pm$ 0,32	1,20 $\pm$ 0,29
<b>PYR</b>	5,73 $\pm$ 1,01	3,93 $\pm$ 0,76*	7,86 $\pm$ 2,09*#
<b>KB</b>	3,91 $\pm$ 0,55	2,78 $\pm$ 0,51*	5,34 $\pm$ 1,37*#
<b>KIV</b>	2,02 $\pm$ 0,37	1,95 $\pm$ 0,40	2,50 $\pm$ 0,71
<b>KIC</b>	0,35 $\pm$ 0,05	0,34 $\pm$ 0,06	0,36 $\pm$ 0,07
<b>PPY</b>	0,30 $\pm$ 0,06	0,29 $\pm$ 0,06	0,35 $\pm$ 0,08
<b>KMV</b>	0,74 $\pm$ 0,11	0,78 $\pm$ 0,14	0,97 $\pm$ 0,28

**Tabelle 30:** Einfluß von **Taurin** [1 mM **Taurin (Tau)**; Inkubationszeit: 120 min; n= 10] kombiniert mit  **$\beta$ -Alanin- ( $\beta$ -Ala, 10 mM)** auf die freien  **$\alpha$ -Ketosäurekonzentrationen** [ **$\alpha$ -Ketoglutarat (KG)**, **Pyruvat (PYR =  $\alpha$ -Ketoalanin)**],  **$\alpha$ -Keto-butyrat (KB)**,  **$\alpha$ -Ketoisovalerianat (KIV)**,  **$\alpha$ -Ketoisocapronat (KIC)**, **p-Hydroxy-Phenylpyruvat (PPY)**,  **$\alpha$ -Keto- $\beta$ -methylvalerianat (KMV)**] in PMN. Die Ergebnisse sind in Aminosäuregehalt [ $10^{-17}$  Mol] pro PMN-Zelle angegeben (MW  $\pm$  SD). \*  $\leq$  0,05 versus Kontrolle; #  $\leq$  0,05 versus alleiniger Aminosäureinkubation.

---

 **$O_2^-$ ,  $H_2O_2$ , MPO**

<b>Tau</b>	<b>Taurin + <math>\beta</math>-Alanin</b>	
	<b>Kontrolle</b>	<b><math>\beta</math>-Alanin</b>
<b><math>O_2^-</math></b>	3,762 $\pm$ 0,553	2,691 $\pm$ 0,516*#
<b><math>H_2O_2</math></b>	1,213 $\pm$ 0,198	1,005 $\pm$ 0,193*#
<b>MPO</b>	0,674 $\pm$ 0,183	0,723 $\pm$ 0,203#

**Tabelle 31:** Einfluß von **Taurin** [**Taurin (Tau)**; Inkubationszeit: 120 min; n= 10] kombiniert mit  **$\beta$ -Alanin ( $\beta$ -Ala, 10 mM)** auf die **Superoxidationbildung** [ $O_2^-$ ; fMol  $O_2^-$ /(PMN x min)], die **Wasserstoffperoxidproduktion** [ $H_2O_2$ ; fMol  $H_2O_2$ /(PMN x min)] sowie die **Myeloperoxidaseaktivität** [**MPO**; Units/l] isolierter PMN (MW  $\pm$  SD). \*  $\leq$  0,05 versus Kontrolle; #  $\leq$  0,05 versus alleiniger Aminosäureinkubation.

---

## 8.2 Abkürzungsverzeichnis

Aba	$\alpha$ -Aminobutyrat
ABTS	2,2'-Azino-di(3-ethylbenzthiazolin)-Sulfonsäure
Ala	Alanin
Arg	Arginin
Asp	Aspartat
Asn	Asparagin
Ala-Gln	L-Alanyl-L-Glutamin
Å	Ångström [10-10m]
bzw.	beziehungsweise
Cit	Citrullin
DANSYL-Cl	5-Dimethylamino-1-Naphtalin-Sulphonylchlorid
DNP	2,4-Dinitrophenylhydrazin
DMPO	5,5-Dimethyl-Pyrrolin-N-Oxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetraazetat
f	Femto [10-15]
F-HPLC	Fluoreszenz-Flüssigkeits-Hochdruck-Chromatographie
FMLP	Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin
g	Fallbeschleunigung [ $g = 9,81 \text{ m/s}^2$ ]
Gln	Glutamin
Glu	Glutamat
Gly	Glycin
GM-CSF	Granulozyten/Makrophagen Colony-Stimulating Factor
h	Stunde
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HBSS	Hank's balanced salt solution
HCl	Salzsäure
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazino)-Ethansulfonsäure
His	Histidin
HOBr	Hypobromit
HPLC	Flüssigkeits-Hochdruck-Chromatographie
H-Tau	Hypotaurin
ICW	intracellular water
I.D.	Innendurchmesser
I.E.	Internationale Einheit
IL	Interleukin
Ile	Isoleucin
iNOS	Induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
I.S.	Interner Standard

---

$\alpha$ -KB	$\alpha$ -Ketobutyrat
$\alpha$ -KG	$\alpha$ -Ketoglutarat
$\alpha$ -KIV	$\alpha$ -Ketoisovalerianat
$\alpha$ -KIC	$\alpha$ -Ketoisocapronat
$\alpha$ -KMV	$\alpha$ -Keto- $\beta$ -methylvalerianat
KOH	Kaliumhydroxid
KS	Ketosäuren
Leu	Leucin
LPS	Lipopolysacharid
Lys	Lysin
m	Milli [10 <sup>-3</sup> ]
M	Molare Konzentration
Mol	Molarer Gehalt
Met	Methionin
min	Minuten
MPO	Myeloperoxidase
MW	Mittelwert
$\mu$	Mikro [10 <sup>-6</sup> ]
N	Normalität
NADP <sup>+</sup>	Oxidiertes Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat
NADPH	reduziertes Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat
NaHCO <sub>3</sub>	Natriumbikarbonat
NaOH	Natriumhydroxid
NaCl	Natriumchlorid
NBD	Nitrobenzooxadiazol
n	Nano [10 <sup>-9</sup> ]
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Superoxidanion
OPA	o-Phtaldialdehyd
Orn	Ornithin
p	Pico [10 <sup>-12</sup> ]
PAF	Plättchen-aktivierender Faktor
PBS	Phosphate-buffered saline
PDA	o-Phenyldiamin
Phe	Phenylalanin
PhePyr	p-Hydroxy-Phenylpyruvat
PHPA	p-Hydroxy-Phenylacetat
PITC	Phenylisothiocyanat
PK 11195	1-(2-Chlorphenyl)-N-methyl-N-(1-methylpropyl)-3-isoquinolincarboxamid
PMA	Phorbol-Myristat-Azetat
PMN	Polymorphkernige Neutrophile Granulozyten
PSI	Druckeinheit (pounds per square inch); 1 PSI = 6894,76 Pascal
PYR	Pyruvat

---

Ro 5-4864	7-Chloro-5-(4'-chlorophenyl)-1,3-dihydro-1-methyl-2H-1,4-benzodiazepin-2
RNA	Ribonucleinsäure
ROI	reactive oxygen intermediates
ROS	reactive oxygen species
RP-HPLC	„Reversed-Phase“-Flüssigkeits-Hochdruck-Chromatographie
s	Sekunde
SD	Standardabweichung
Ser	Serin
SSA	Sulpho-5-Salizylsäure
SEP	Standardextraktionspuffer
Tau	Taurin
TCA-Zyklus	Zitratzyklus (Tricarbon-Acid-Cycle)
Thr	Threonin
TMAH	Trimethylanalinhydroxid
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor- $\alpha$
Trp	Tryptophan
Tyr	Tyrosin
Val	Valin
VK	Variationskoeffizient
z. B.	zum Beispiel

## 8.3 Eigene Publikationen

### Publikationen

1. Jacobus BK, Wolf S, **Burchert D**, Stertmann W, Morr H. Fehldiagnose Asthma – Chronischer Reizhusten und rezidivierende pulmonale Infekte bei einer jungen Patientin. *Pneumologie* 2007; 4:354-356.
2. Mühling J, **Burchert D**, Langefeld TW, Matejec R, Harbach H, Engel J, Wolff M, Welters D, Fuchs M, Menges T, Krüll M, Hempelmann G. Pathways involved in alanyl-glutamine-induced changes in neutrophil amino- and alpha-keto acid homeostasis or immunocompetence. *Amino Acids* 2007; Sep; 33(3):511-24.
3. Mühling J, Sablotzki A, Fuchs M, Krüll M, Dehne MG, Weiss S, Gonter J, **Quandt D**, Hempelmann G. Effects of diazepam on neutrophil (PMN) free amino acid profiles and immune function in vitro. Metabolic and immunological consequences of L-alanyl-L-glutamine supplementation. *Journal of Nutritional Biochemistry* 2001; 12:46-54.

### Posterpräsentationen

1. Jacobus BK, Wolf S, **Burchert D**, Stertmann W, Morr H. Fehldiagnose Asthma bei mediastinalem Teratom. 2007
2. Mühling J, Gonter J, **Quandt D**, Weiss S, Müller M, Engel J, Hempelmann G. Effects of propofol on neutrophil (PMN) free amino acid profiles and immune functions in vitro. Immunologic and metabolic consequences of taurine supplementation. 7th International Congress on Amino Acids and Proteins, Wien 2001. Veröffentlicht in *Amino Acids* 2001; 21:76-77.
3. Weiss S, Mühling J, Gonter J, **Quandt D**, Hempelmann G. Flunitrazepam beeinflusst den freien intrazellulären Aminosäurestoffwechsel in polymorphkernigen Granulozyten. Deutscher Interdisziplinärer Kongress für Intensivmedizin und Notfallmedizin (DIVI), Hamburg 2000. Veröffentlicht in *Intensivmedizin* 2000; 37; Suppl.2:89.

## 8.4 Erklärung

„Ich erkläre: Ich habe die vorliegende Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

Gießen, den

---

Diana Burchert

## 8.5 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich bei der Erstellung meiner Dissertation unterstützt haben:

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Jörg Mühling, MBA für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit diese Arbeit mit den mir zur Verfügung gestellten Mitteln und Mitarbeitern durchzuführen.

Mein Dank gilt auch Frau Meike Müller sowie Herrn Jens Gonter für die ausgezeichnete Zusammenarbeit in unserer Arbeitsgemeinschaft während der Durchführung unserer Versuchsreihen.

Ferner danke ich auch meinem Mann, Herrn Sven-Marc Burchert für die Unterstützung bei der Darstellung der Grafiken und Abbildungen in dieser Arbeit sowie der Fertigstellung der Powerpointpräsentation.

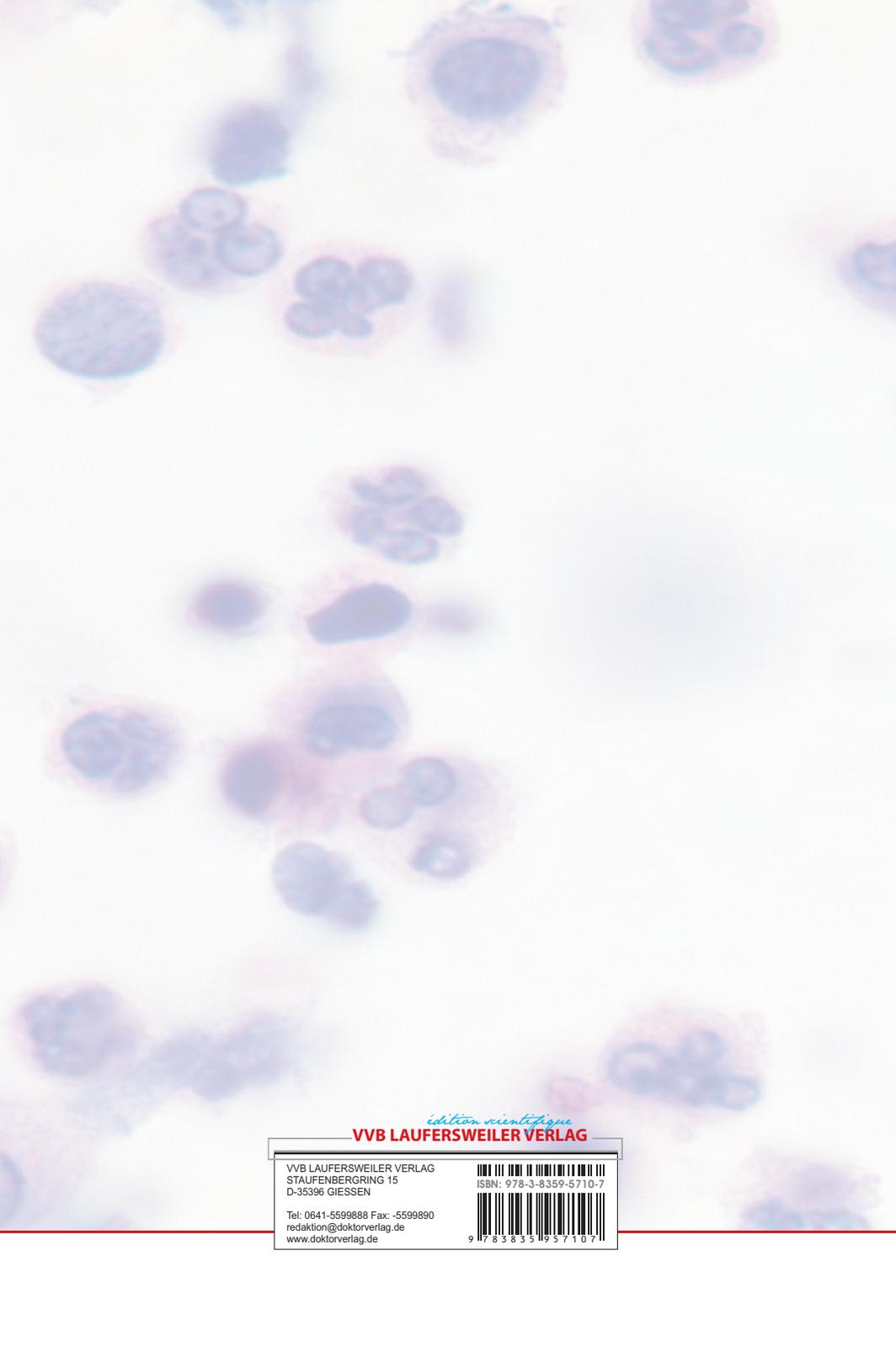
Weiterhin danke ich:

Herrn Dr. Jochen Wilhelm für die Hilfestellung bei der Textformatierung dieser Arbeit sowie Frau Susanne von Gerlach für ihre fachliche Unterstützung.

Allen Probanden für die freundlicherweise überlassenen Blutproben, die mit die Grundlage für diese Dissertationsarbeit gebildet haben.

Dem Institut für Medizinische Informatik der Justus-Liebig-Universität Gießen und seinen Mitarbeitern (ehem. Leiter: Prof. Dr. J. Dudeck) für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung unserer Ergebnisse.

Meiner Familie, meinen Eltern und meinen Freunden für das Verständnis und die Unterstützung während dieser Arbeit.



*édition scientifique*

**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

VVB LAUFERSWEILER VERLAG  
STAUFBENBERGRING 15  
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890  
redaktion@doktorverlag.de  
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-5710-7



9 783835 195710 7