

**Der Einfluss von Pyruvat auf freie intrazelluläre Amino- und
 α -Ketosäuremuster sowie auf ausgewählte Immunfunktionen
polymorphkerniger neutrophiler Granulozyten (PMN)**

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

des Fachbereichs Medizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Diana Mathioudakis

aus Sindelfingen

Gießen 2013

Aus dem Zentrum für Chirurgie, Anästhesiologie und Urologie

Klinik für Anästhesiologie, Intensivmedizin und Schmerztherapie

Universitätsklinikum Giessen und Marburg GmbH

— Standort Giessen —

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

Gutachter: Prof. Dr. Jörg Mühling, MBA

Gutachter: Prof. Dr. Ritva Tikkanen

Tag der Disputation: 21.01.2014

Für Katharina

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Einführung in die Thematik	1
1.2	Die „dynamischen“ Amino- und α -Ketosäurepools in PMN sowie ihre potentielle stoffwechsel- und immunphysiologische Bedeutung	5
1.3	Die stoffwechselphysiologische Bedeutung von Pyruvat und der potentielle immunonutritive Einfluß auf PMN	7
1.4	Ziele und Fragestellungen	12
2	Materialien und Methoden	13
2.1	Zellseparation (PMN)aus Vollblut	13
2.2	Bestimmung der Aminosäuren in Plasma und PMN durch hochauflösende Fluoreszenz-Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie (F-HPLC)	15
2.2.1	Aminosäureanalytik: Probenvorbereitung	15
2.2.2	Aminosäureanalytik: Standardisierung	16
2.2.3	Aminosäureanalytik: Vorbereitung Fluoreszenzmarkierung	17
2.2.4	Aminosäureanalytik: Fluoreszenzmarkierung	17
2.2.5	Aminosäureanalytik: Gerätekonfiguration	19
2.2.6	Aminosäureanalytik: Automatisierte Vorsäulen-derivatisierung	20
2.2.7	Aminosäureanalytik: Gradientenelution freier Aminosäuren	20
2.3	Bestimmung der α -Ketosäuren in Plasma und PMN durch hochauflösende F-HPLC	22
2.3.1	α -Ketosäureanalytik: Standardextraktionspuffer	22

2.3.2	α-Ketosäureanalytik: Standardisierung	22
2.3.3	α-Ketosäureanalytik: Fluoreszenzmarkierung	23
2.3.4	α-Ketosäureanalytik: Halbautomatische Derivatisierung	24
2.3.5	α-Ketosäureanalytik: Gradientenelution freier α-Ketosäuren	25
2.4	Spezifische Immunfunktionstests	27
2.4.1	Nachweis und Quantifizierung der Bildung granulozytärer Superoxidanionen (O ₂ ⁻) vitaler PMN	27
2.4.2	Nachweis und Quantifizierung der Bildung von Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂) vitaler PMN	29
2.4.3	Nachweis und Quantifizierung der Myeloperoxidase (MPO) – Aktivität vitaler PMN	30
2.5	Pyruvatinkubation	31
2.6	Statistik	34
3	Ergebnisse	35
3.1	Separation von PMN aus Vollblut	35
3.2	Bestimmung von Amino- und α-Ketosäuren	35
3.3	Einfluss von Pyruvat auf die freien Amino- und α-Ketosäurepools in PMN sowie granulozytäre Immunfunktion	38
3.3.1	Pyruvat: Einfluss der Inkubationszeit auf die freien intragranulozytären Amino- und α-Ketosäurepools	38
3.3.2	Pyruvat: Einfluss der Inkubationszeit auf granulozytäre Immunfunktionen	39

3.3.3	Pyruvat: Dosisabhängiger Einfluss auf die freien intragranulozytären Aminosäurepools	40
3.3.4	Pyruvat: Dosisabhängiger Einfluss auf die freien intragranulozytären α -Ketosäurepools	43
3.3.5	Pyruvat: Dosisabhängiger Einfluss auf die granulozytären Immunfunktionen	44
4	Diskussion	46
4.1	Verwendete Methoden und Messverfahren	46
4.1.1	Separation von PMN	46
4.1.2	Darstellung der interzellulären Amino- und α Ketosäurekonzentrationen	48
4.1.3	PMN-Zell-Lagerung	50
4.1.4	Wahl des Derivatisierungsreagenz für die Aminosäureanalytik	51
4.1.5	Wahl des optimalen Laufpuffers	53
4.2	Quantitative α -Ketosäurebestimmung	54
4.3	Bestimmung der Immunfunktionsparameter	57
4.3.1	Bestimmung der Superoxidanionbildung	58
4.3.2	Bestimmung der Wasserstoffperoxidproduktion	58
4.3.3	Bestimmung der Myeloperoxidaseaktivität	59
4.4	Einfluss von Pyruvat auf PMN	59
5	Zusammenfassung	70
5.1	Zusammenfassung und Ausblick	70
5.2	Summary	72

6	Literaturverzeichnis	73
7	Anhang	85
7.1	Ergebnistabellen	85
7.1.1	Pyruvat: Einfluß der Inkubationszeit auf die freien intra- granulozytären Amino- und α -Ketosäurepools	85
7.1.1	Pyruvat: dosisabhängiger Einfluß freien intragranulo- zytären Amino- und α -Ketosäurepools	86
7.2	Abbildungsverzeichnis	87
7.3	Tabellenverzeichnis	89
7.4	Abkürzungsverzeichnis	91
7.5	Eigene Publikationen	94
7.6	Erklärung	95
7.7	Danksagung	96

1 Einleitung

1.1 Einführung in die Thematik

Leukozyten (griechisch: leukos = weiss) werden so genannt weil sie - wie wir auch im Rahmen dieser Arbeit nach der Separation und Gefriertrocknung von Neutrophilen Polymorphkernigen Granulozyten (PMN) sehen konnten - interessanterweise als komplett weiße Zellen imponieren. Allerdings sind Leukozyten keine einheitliche Population. Sie werden anhand ihrer morphologischen Charakteristika (z.B. Zellgrösse, Kernform, Granula) im Differentialblutbild im gefärbten Blutausstrich unterschieden (Abbildung 1).

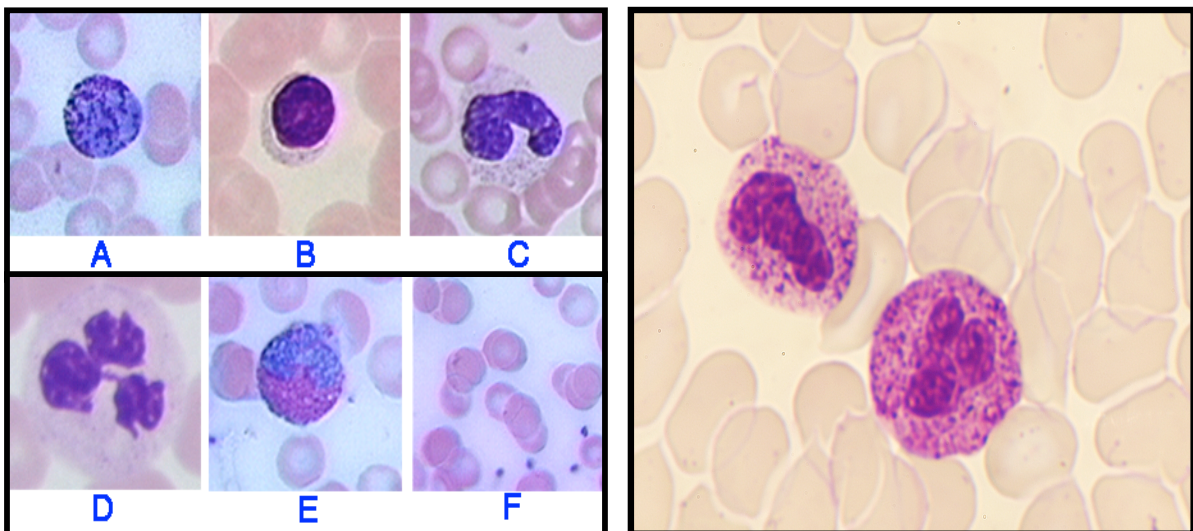


Abbildung 1 (links): Lichtmikroskopische Aufnahmen verschiedener Blutzellen: A) Basophiler Granulozyt, B) Lymphocyt, C) Monocyt, D) Neutrophiler Granulozyt, E) Eosinophiler Granulozyt, Erythrozyten und Thrombozyten. **Rechts:** Lichtmikroskopische Aufnahme von zwei Neutrophilen Granulozyten[‡] (<http://de.wikipedia.org/wiki/Differentialblutbild>, Stand 01.10.2005, abgerufen 21.08.2013)

[‡] Die in dieser Arbeit für einige Abbildungen verwendeten Internetquellen aus Wikicommons enthalten teilweise sehr lange hyperlinks, die mit Zeilenumbrüchen aufgrund der jeweiligen Seitenbreite versehen sind. Bei Verwendung dieser hyperlinks müssen daher die Trennstriche aktiv in der Kopfzeile des Browsers entfernt werden und die Semantik auch über den Umbruch hinaus akkurat übernommen werden.

PMN gehören hier nicht nur quantitativ - sie stellen durchschnittlich 50–70% der Leukozyten - sondern auch qualitativ hinsichtlich ihrer immunologischen Aufgaben zu den wichtigsten Funktionsträgern der unspezifischen Infektabwehr und sind damit bedeutender Teil des Immunsystems des menschlichen Organismus. Sie entstehen aus hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark, reifen im Knochenmarksstroma in 5-10 Tagen heran und haben eine Gesamtlebenszeit von ca. 12 Tagen. Als reife Zellen werden sie aus dem Knochenmark ausgespült und zirkulieren dann im peripheren Blut, wo ihre Halbwertszeit ca. 8-10 Stunden beträgt (Abbildung 2)^{41,180}. Nur ca. 5% der Tagesproduktion befindet sich im peripheren Blut. Ein Pool lagert am Gefäßendothel an, die andere Hälfte zirkuliert. Der Großteil der Granulozyten verbleibt im Knochenmark^{115,121,150,152}. Als hämatopoetischer Wachstumsfaktor stimuliert der Granulozyten-Kolonie-Stimulierende Faktor (G-CSF) selektiv die Granulopoese. Er induziert die Differenzierung und Proliferation der Granulozyten, bewirkt die Mobilisation des reifen Neutrophilen aus dem Knochenmark und reguliert Funktionen der Immunantwort wie Chemotaxis, Migration sowie die Bildung radikaler Sauerstoffspezies^{9,20-22,41,78,82,86,90,115,147,169}.

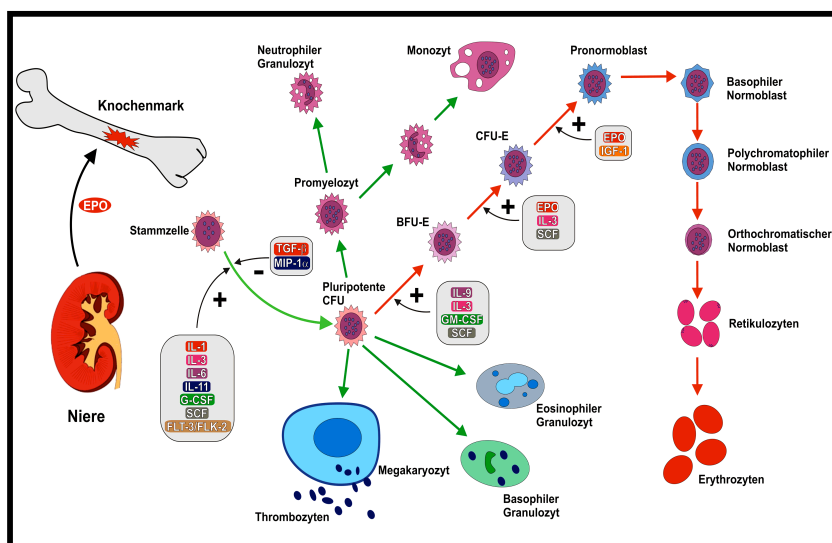


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Blut- und Zellbildung aus blutzellbildenden Stammzellen im Rahmen der Hämatopoese und der wichtigsten Hormone und Zytokine (http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/c/c3/EPO_H%C3%A4matopoese.png Stand 07.02.2007, abgerufen 21.08.2013)

Eine Interaktion zwischen Granulozyten und Gefäßendothel ist durch die direkte Nähe leicht möglich, zum Beispiel im Kapillarbett. Bei inflammatorischen Prozessen oder Gewebläsionen durch Trauma kommt es zunächst zu einer Aktivierung von Granulozyten. Dies wird durch Mediatoren vermittelt. Zu diesen humoralen Stimuli zählen Komplement (z.B. C3a, C5a), Zytokine (Interleukine (z.B. IL-8) und Tumornekrosefaktoren (z.B. TNF), Leukotriene, bakterielle Toxine sowie endogene Pyrogene (Lipopolysaccharide (LPS), die PMN entlang eines Konzentrationsgradienten aus dem Kapillarsystem in das geschädigte Gebiet hineinlocken (Chemotaxis)^{178,188,191}. Chemokine induzieren darüber hinaus die vermehrte Expression von Adhäsionsmolekülen im Granulozyten, die als Oberflächenproteine kohlenhydratbindende, lektinähnliche Selektine darstellen, die eine reversible Bindung an das Endothel propagieren. So kann der zirkulierende Granulozyt über die Gefäßwand rollen und wird damit in seiner Bewegung gebremst (Abbildung 3). Zum anderen exprimieren Granulozyten auch Integrine, die eine permanente Bindung mit den Oberflächenbestandteilen des Endothels ermöglichen (Margination)^{21,98,121,169,178,188,191}.

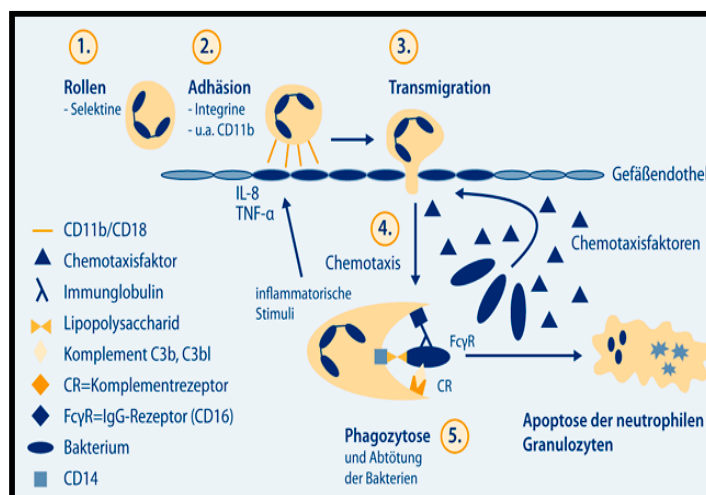


Abbildung 3: Schematische Darstellung der schrittweisen Aktivierung von PMN sowie ihrer Transmigration in inflammatorische Gewebe

(<http://www.cmemitpartnern.springer.de/moc/DisplayContent.do?cid=276363&fid=276354>,
 modifiziert nach Butcher S et al., Immunology 2000, Stand 4.11.2010, abgerufen 21.08.2013)

Sobald diese Bindung vollzogen ist, verändern die PMNs ihre Morphologie und permeieren mit Hilfe proteolytischer Enzyme durch das Endothel postkapillärer Venolen. Sie emigrieren in das extravasale Gewebe (Diapedese). Damit pathogene Agenzien erkannt und schliesslich eliminiert werden können, müssen diese markiert oder opsoniert werden. Hierzu werden spezifische Antikörper der IgG Klasse oder aktiviertes Komplement C3b angelagert. So kann eine spezielle Bindung an granulozytäre Rezeptoren erfolgen^{1,42,90,98,121,169,188,191}.

Die PMN breiten und spreizen sich aus (spreading), indem sie ihre Form ändern. Sie bilden Zytoplasmafortsätze (Pseudopodien) unter Aktivierung von intrazellulären Aktin- und Myosinfilamenten aus und umschliessen den zur Elimination vorbereiteten Fremdkörper bläschenartig mit einem Phagosom^{113,177,191}. Das Phagosom verschmilzt im Zellinneren mit zytoplasmatischen Granula der PMN dann zu einem sogenannten Phagolysosom. Es wird dort durch lysosomale Enzyme und hochreaktive Sauerstoffspezies (reactive oxygen species) desintegriert und verdaut^{42,94,116,124,161,164,178,188,191}.

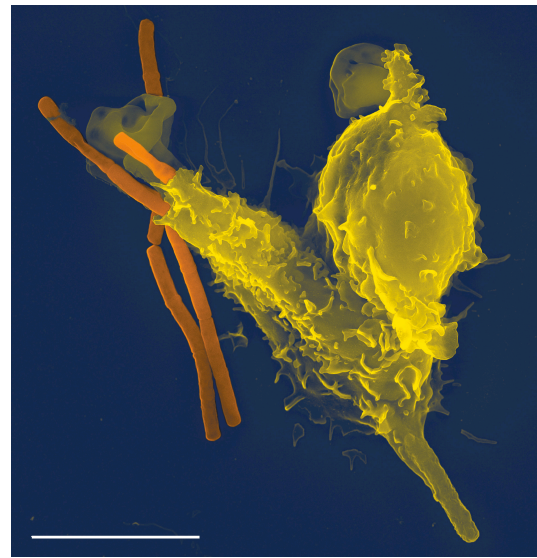


Abbildung 4: Elektronenmikroskopische Aufnahme der morphologischen Veränderungen eines polymorphkernigen Granulozyten (PMN) beim Angriff auf den Erreger des Milzbrand, *Bacillus anthracis* (http://commons.wikimedia.org/wiki/File%3ANeutrophil_with_anthrax_copy.jpg Stand 25.09.2007, abgerufen 21.08.2013)

1.2 Die „dynamischen“ Amino- und α -Ketosäurepools in PMN sowie ihre potentielle stoffwechsel- und immunphysiologische Bedeutung

Von besonderer Bedeutung für die vielfältigen immunologischen Funktionen, aber auch für die zelluläre Integrität von PMN-Zellen scheint ein aktiver intragranulozytärer Amino- und α -Ketosäuresäurestoffwechsel zu sein^{52,53,59-62,133-144}, wie insbesondere Untersuchungen der letzten Dekade zeigen konnten. Hierbei soll zum Beispiel der Stoffwechselaktivität einzelner besonderer Aminosäuren (z.B. Glutamin, Arginin, Ornithin, Taurin), wie auch der spezifischen qualitativen und quantitativen Zusammensetzung der intrazellulären Amino- und α -Ketosäuresäurepools eine essentielle Bedeutung zukommen^{2,34,35,75,111,112,116,124}. Dies erscheint logisch, da zelluläre Stoffwechsel- und Regulationsprozesse sowie die Bereitstellung von Stoffwechselpräkursoren und energiereichen Metaboliten in erster Linie von einem ausgewogenen Gehalt intrazellulärer Substrate sowie Metabolite - hierbei insbesondere auch von freien α -Ketosäuren - abhängen und erst sekundär, also über die trennende Zellmembran hinweg, den Einflüssen und potentiellen Veränderungen der extrazellulären Amino und α -Ketosäurenpools unterliegen^{3,18,68,71,87,93,99,114,129,153}. Einzelne Amino- oder auch α -Ketosäuren dienen hier nicht nur als wichtige Substrate für die Synthese von Proteinen, Enzymen oder anderen wichtigen zellulären Makromolekülen sondern auch als Stickstoff- beziehungsweise Aminogruppendonatoren bei der Biosynthese wichtiger stickstoffhaltiger Verbindungen wie Purinen, Pyrimidinen oder auch des für PMN so essentiellen Stickstoffmonoxids (NO)^{1,36,142-144,152,165,168,190,191,194,195}. Sie sind daher - wie interessante Untersuchungen der letzten Jahre zeigen konnten - in alle wichtigen granulozytären Stoffwechselprozesse, die der Aufrechterhaltung der vielfältigen zellulären Funktionen und Integrität dienen, involviert. Darüber hinaus scheint auch

die Zusammensetzung der freien intrazellulären Amino- oder α -Ketosäurepools hierbei keineswegs willkürlich gewählt zu sein, sondern direkt - man spricht hier auch von „dynamisch“ an die besonderen Stoffwechselsituationen und zellspezifischen Erfordernisse und Funktionen angepaßten Amino- oder α -Ketosäurepools - von den jeweiligen zellspezifischen Aufgaben, Anforderungen und grundsätzlichen physiologischen Funktionen abzuhängen^{59,61,62,80,158-160}. Bei der genaueren Beobachtung der intragranulozytären Pools fällt auf, daß einzelne Amino- oder α -Ketosäuren in besonderem Maße in den Zellen selbst produziert oder aus dem Extrazellulärraum aufgenommen und unter Bildung hoher intra- versus extrazellulärer Gradienten kompartimentiert werden (z.B. Taurin, Glutamin, Glutamat etc.). Die Gründe hierfür sind bislang leider nahezu unerforscht^{59-61,133-144,184}. Allerdings zeigte die Forschungsarbeit des letzten Jahrzehnts, dass es hier einen direkten „immunonutritiven“ Zusammenhang zu den pathophysiologischen Funktionen von PMN-Zellen im Rahmen der granulozytären Immunantwort zu geben scheint^{6,27,28,32-33,48,49,50,63-66,118,122,132}. Insbesondere für die α -Ketosäuren ist allerdings nahezu unerforscht, ob deletäre Einflußfaktoren wie eine reproduzierbare Hemmung oder sogar Blockierung einzelner essentieller intragranulozytärer α -Ketosäurestoffwechselprozesse oder der Verlust einer für die ungestörte physiologische Funktion wichtigen „intragranulozytären Substrathomöostase“ Mitursache - oder sekundär verändert - aggravierendes Moment paralleler Granulozytenfunktionsveränderungen sein könnten^{59,61,136-141,122}. Möglicherweise könnte dieser interessante wissenschaftliche Denkansatz hier Grundlage für spezielle und im Detail noch zu entwickelnde „immunonutritive“ und antioxidative bzw. anti-inflammatorische Therapieverfahren - vielleicht sogar auch auf Basis neuartiger α -Ketosäureverbindungen - sein^{13,19,25,38,39,40,44,54-57,69,72,85,117,119,172,173,176,181,186,201}

1.3 Die stoffwechselfysiologische Bedeutung von Pyruvat und der potentielle immunonutritive Einfluß auf PMN

Bei der näheren Betrachtung einzelner Zellmetabolite, deren Aktivitäten für die stoffwechselfysiologischen Erfordernisse und für die Immunfunktionen von PMN eine bedeutende Rolle zu besitzen scheinen, rücken in den letzten Jahren mehr und mehr die α -Ketosäuren, und hier insbesondere die einfachste α -Keto(carbon)säure Brenztraubensäure (oder auch Acetylameisensäure), deren Salze und Ester als Pyruvate bezeichnet werden, in den Fokus wissenschaftlichen Interesses^{3,32,33,52,53,58,59,61,80,142,194,195}.

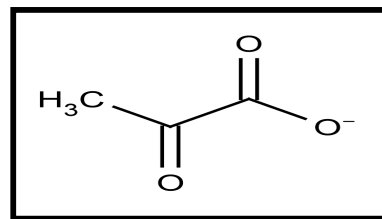


Abbildung 5: Strukturformel von Pyruvat

(<http://de.wikipedia.org/wiki/Brenztraubens%C3%A4ure>, Stand 13.12.2007, aufgerufen 21.08.2013)

Etymologisch ist die Namensgebung „Brenztraubensäure“ auf „Brenzen“, die trockene Destillation von Weinsäure, zurückzuführen. Brenztraubensäure entsteht hierbei nach Decarboxylierung und Abspaltung von Wasser. Das Anion dieser Verbindung heißt daher treffenderweise "Pyruvat", abgeleitet von "pyr" (griechisch: Feuer, Hitze) und "uva" (lateinisch: Weintraube).

Die erste laborchemische Synthese von Pyruvat gelang 1835 dem „Vater der Chemie“ und Professor für Medizin und Pharmazie Jöns Jakob Berzelius (geboren am 20. August 1779 in Socken Väversunda -Östergötland-, gestorben am 7. August 1848 in Stockholm) am durch den schwedischen König Karl XIII. 1810 gegründeten Karolinska Institutet im schwedischen Solna bei Stockholm durch gemeinsames „Brenzen“ von Weinsäure mit Kaliumhydrogensulfat¹¹.



Abbildung 6: Jöns Jakob Berzelius , Lithographie-Portrait von P.H. van den Heuvell aus 1836 ([http://commons.wikimedia.org/wiki/File:J. J. Berzelius.jpg](http://commons.wikimedia.org/wiki/File:J._J._Berzelius.jpg) , Stand 11.04.2007, aufgerufen 21.08.2013)

Hinlänglich bekannt ist die Tatsache, dass Pyruvat im aeroben und anaeroben Stoffwechsel ein wichtiges zelluläres Zwischenprodukt darstellt. Dass Pyruvat aber durchaus auch in einem sogenannten „immunonutritiven Rahmen“ für PMN von großer Bedeutung sein könnte, ist eine neue und spannende, jedoch bis heute nicht hinreichend belegte Hypothese^{3,32,33,52,53,58,59,61,80,142,194,195}.

Allerdings häufen sich in den letzten Jahren durchaus die wissenschaftlichen Hinweise darauf, dass Pyruvat für die Modulation essentieller PMN-Abwehrfunktionen und die Immunregulation dieser Zellen, nicht nur aufgrund seiner hohen Bedeutung für Energiestoffwechsel und Zellmetabolismus, von großer stoffwechselphysiologischer Relevanz zu sein scheint^{50,63-66,100,101,110-112,118,132,165,184,185}.

Gestützt wird diese Vermutung durch den Befund, dass Pyruvat nicht nur ubiquitär bei allen Pro- und Eukaryonten nachzuweisen ist, sondern auch durch die Tatsache, dass Pyruvat, was sowohl Produktion wie aber auch Metabolisierung betrifft, über verschiedenste zelluläre Stoffwechselwege auf- bzw. abgebaut werden kann. Pyruvat besitzt damit quasi eine metabolische Schlüsselfunktion^{59,61,100,101}.

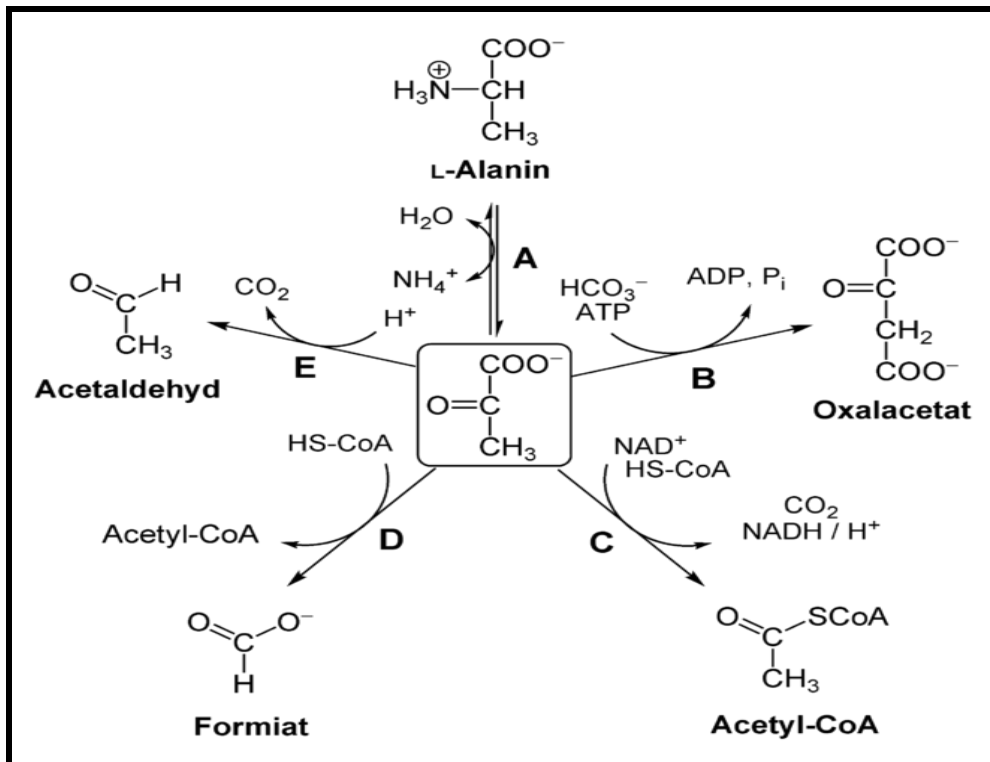


Abbildung 7: Beispiele einiger biochemischer Reaktionen von Pyruvat. Einzelheiten zu den hier dargestellten Stoffwechselschritten finden sich im Text (http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Pyruvate_reactions.png, Stand 26.08.2009, aufgerufen 21.08.2013).

In eukaryotischen Zellen kann Pyruvat hier insbesondere aus Glukose, zum Beispiel im Rahmen der im Cytoplasma über die Zwischenprodukte Glycerinaldehydphosphat und Phosphoenolpyruvat ablaufenden Glycolyse gebildet werden^{52,54-57,190}. Allein schon diese erste Umwandlung von Glucose zu Pyruvat bringt für die Zelle einen deutlichen Gewinn. Es entsteht doch, unter Freisetzung von CO₂, pro Mol Glucose neben 2 Mol Pyruvat noch 2 Mol ATP sowie 2 Mol NADH + H⁺ (Abbildung 7: „C“)^{66,68,99,123,195}. Aber auch die weitere Verstoffwechslung von Pyruvat zu Acetyl-CoA im Rahmen der sogenannten Pyruvat-Decarboxylierung ist für die Zelle von großem

Vorteil^{100,101}. Sie geschieht mithilfe eines sogenannten Pyruvatdehydrogenase-Multi-enzymkomplex und ist Teil der aeroben Zellatmung. Interessanterweise geschieht die Pyruvat-Decarboxylierung hier innerhalb der Mitochondrien, nachdem das Substrat Pyruvat aus dem Cytosol dorthin transportiert wurde^{18,46,93,99,114,129,153,189}. Die Pyruvat-Decarboxylierung ist daher ein wichtiges Bindeglied im Rahmen mehrerer Stoffwechselwege wie z.B. der Glycolyse, dem intrazellulären und mitochondrialem Aminosäureumsatz sowie auch im Krebs oder Tri-Carboxyl-Zyklus (TCA-Zyklus)^{5,12,15,16,57,71,100,101,179}. Einmal in den TCA Zyklus eingespeist wird Acetyl-CoA zu Kohlendioxid oxidiert (durch Glycolyse werden aus 1 Mol Glucose 2 Mol Pyruvat gebildet und in den Mitochondrien der Zelle entstehen daraus dann insgesamt 6 Mol CO₂, 8 Mol NADH + H⁺, 2 Mol FADH₂ und 2 Mol ATP) oder es dient als Präkursormolekül für viele Aminosäuren, für synthetische Stoffwechselintermediäre oder zur Synthese von Makromolekülen^{23,38,39,149,171}. Pyruvat kann aber auch, und insbesondere bei Sauerstoffmangel der Zellen, mit Hilfe der Lactatdehydrogenase (LDH) zu Lactat reagieren^{68,168,190}.

Es bestehen allerdings ebenfalls auch direkte Anbindungen an den zellulären Aminosäurestoffwechsel. Der hierbei bekannteste Umbau von Pyruvat erfolgt über eine Variante des bekannten Cori-Zyklus, den sogenannten Glucose-Alanin-Zyklus (Abbildung 7: A). Die so entstehenden Produkte L-Alanin (aber auch α -Ketoglutarat) werden hierbei im Rahmen reversibler Transaminierungsreaktionen (z. B. Alanin-Aminotransferase) von Pyruvat mit L-Glutamat als Reaktionspartner gebildet^{27,28,46,68,167,189}. Zunehmende Hinweise aus neueren experimentellen Daten legen nahe, dass hier insbesondere auch α -Ketoglutarat, umgewandelt aus Pyruvat, Protagonist bei vielen metabolischen Funktionen ist, die essentiell für eine ungestörte Leukozytenfunktion sind^{32,33,67,123,131,155,200}. Es kann sehr rasch in Vorstufen

verschiedenster Aminosäuren verwandelt werden, und ist ebenso intermediäres Substrat bei der Synthese von Makromolekülen^{32,33,59,61,158-160,168,184}. Insbesondere die Rückverstoffwechslung via Transaminierung (z.B. via der Aspartat-Aminotransferase) macht α -Ketoglutarat für den zellulären Stoffwechsel so interessant, entsteht aus dieser Reaktion doch wiederum Oxalacetat und Glutamat^{25,57,58,190}.

Pyruvat kann aber ebenso mittels des Enzyms Pyruvatcarboxylase durch Addition von CO₂ zu Oxalacetat umgewandelt werden und steht in dieser Form auch wieder der Gluconeogenese zur Verfügung (Abbildung 7: B)^{80,142-144,171,184}. Weitere Möglichkeiten der Verstoffwechslung von Pyruvat findet man bei Pflanzen, Pilzen und einigen Bakterien: hier kann Pyruvat zum Beispiel im Rahmen der anaeroben Ameisensäuregärung zu Ameisensäure (Abbildung 7: D), oder auch mittels der Pyruvatdecarboxylase zu Acetaldehyd abgebaut werden (Abbildung 7: E)^{54,57,61,63,201}.

1.4 Zielsetzung und Fragestellungen

Die grundlegende Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war, den Einfluss der α -Ketosäure Pyruvat auf die intrazellulären Amino- und α -Ketosäuregehalte in PMN zu untersuchen.

Daraus leiteten sich folgende differenzierte Fragestellungen ab:

1. Bewirkt die hier untersuchte α -Ketosäure Pyruvat dosis- und expositionszeitabhängig Veränderungen der intragranulozytären Aminosäure- und α -Ketosäurezusammensetzung ?
2. Beeinflusst Pyruvat essentielle granulozytäre Immunfunktionen, gemessen an der Superoxidanion- und Wasserstoffperoxidbildung sowie der Myeloperoxidaseaktivität ?

2 Materialien und Methoden

2.1 Zellseparation (PMN) aus Vollblut

Vitale PMN aus menschlichem Vollblut wurden auf einem gekühlten (4°C) Percoll®-Gradienten (Pharmacia, Uppsala, Schweden) separiert auf Basis und Weiterentwicklung der von Eggleton et al.⁴⁶ sowie Krumholz und Mitarbeitern¹⁰²⁻¹⁰⁷ beschriebenen Verfahren. Zur Normalwertbestimmung unmittelbar nach Blutentnahme oder direkt nach beschriebener Inkubation mit Pyruvat wurden jeweils 4 ml mit 10 I.E. Heparin-Na/ml versetztes Vollblut auf einen 4°C mit 0,9%-iger NaCl-Lösung vorbereiteten 55%/70%igen Percoll®-Gradienten überschichtet und danach zentrifugiert (15 Minuten, 350 x g, 4 °C, Biofuge®, Heraeus, Hanau).

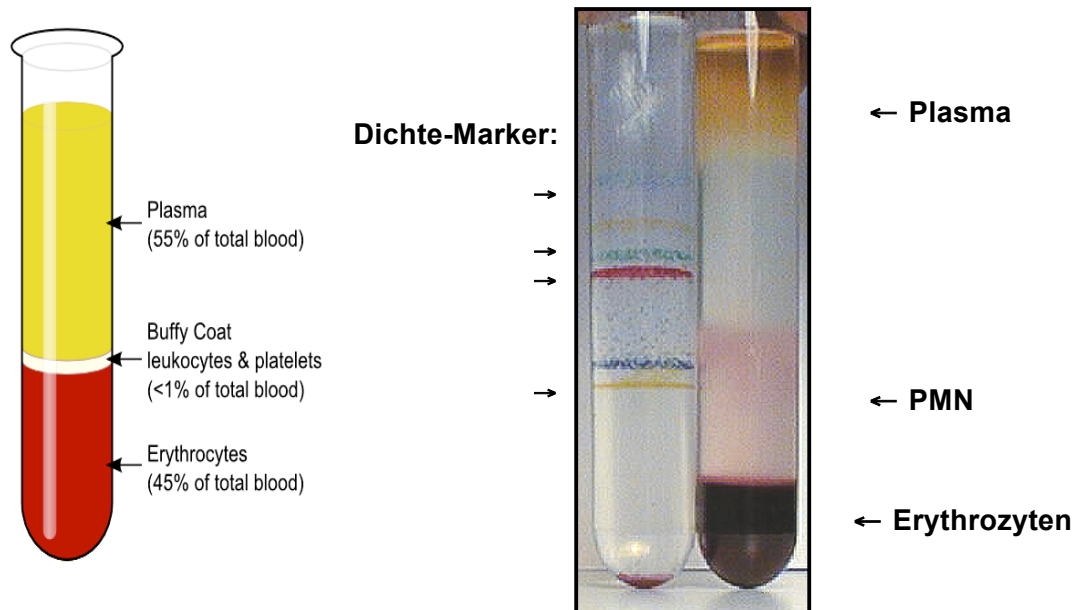


Abbildung 8: Percoll®-Gradientenseparation vitaler PMN aus Vollblut. Schemazeichnung links (Quelle:

<http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Blood-centrifugation-scheme.png> Stand 10.02.2008, abgerufen 21.08.2013) und Original-Fotodokumentation der eigenen Analysetechnik (rechts)

Die PMN konnten nach Auftrennung der Zellfraktionen entnommen werden (Sterican® 20G; B. Braun, Melsungen) und wurden resuspendiert (10 ml auf 4°C gekühlter 1:10 verdünnter PBS®-Puffer [10x (w/o Ca²⁺/ Mg²⁺) Gibco, Karlsruhe]).

Nach einer weiteren Zentrifugation (350 x g, 5 Minuten, 4°C) wurde der PBS-Puffer dekantiert und die verbliebenen Erythrozyten hämolysiert (2 ml gekühltes 4°C Aqua destillata, Pharmacia, Uppsala, Schweden). Eine Re-Isotonisierung wurde nach genau 20 Sekunden durchgeführt, indem 1 ml 2,7%-iger NaCl-Lösung (Merck, Darmstadt) zugesetzt wurde. Die Probe wurde dann mit 1:10 verdünntem PBS-Puffer auf 10 ml aufgefüllt. Es folgte ein erneutes Zentrifugieren (350 x g, 5 Minuten, 4°C) und Dekantieren des PBS-Puffer-Überstandes. Im Rüttelmixer wurde die PMN-Suspension homogenisiert und aliquotiert. Für eine kurzfristige Lagerung (Aminosäureproben <4 Wochen; α -Ketosäureproben <2 Wochen) wurden die Proben bei -20°C eingefroren und dann bei -80°C tiefgefroren. 2 Aliquots wurden unmittelbar zur lichtmikroskopischen Kontrolle (Zeiss, Oberkochen) bezüglich Anzahl und Reinheit in einer Neubauer-Zählkammer (Färbung mit Türks-Lösung[®], Merck, Darmstadt) gezählt und sowie die Vitalität (Färbung mit Trypanblau[®], Merck, Darmstadt) der in der Probe enthaltenen PMN überprüft. Proben mit niedriger PMN-Reinheit (<95%) sowie mit hohem Anteil PMNs (en >5%) wurden verworfen. Eine Lyophilisierung (Gefriertrocknung unter Hochvakuum bei -80°C, CIT-2[®], Heraeus, Hanau) ermöglichte die nicht chemisch vermittelte Lyse der PMNs und damit Stabilität bei längerfristigem Einlagern zur weiteren Analyse (Fluoreszenz-HPLC) lichtgeschützt bei -80°C (primäre Aminosäuren < 6 Monate, α -Ketosäureproben < 4 Wochen).

2.2 Bestimmung der Aminosäuren in Plasma und PMN durch hochauflösende Fluoreszenz-Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie (F-HPLC)

Zur exakten Quantifizierung des intrazellulären Gehaltes primärer Aminosäuren in menschlichen PMN bis auf Einzelzellniveau wurde von Mühling et al.¹³³ die von Fuchs et al.^{60,61} und Riedel et al.¹⁵⁸⁻¹⁶⁰ etablierte Methodik zur Bestimmung primärer Aminosäuren im Plasma signifikant weiterentwickelt sowie präzise standardisiert und validiert. Diese methodologische Arbeit diente als Grundlage, so dass in unserer Arbeitsgruppe reproduzierbar verlässlich unterschiedliche Fragestellungen bearbeitet werden konnten u.a. durch Burchert 2011 der Einfluss von Taurin und β -Alanin auf die Pools primärer Amino- und α -Ketosauren¹⁷.

2.2.1 Aminosäureanalytik: Probenvorbereitung

Die bei -80°C gelagerten, lyophilisierten Standard- und PMN Proben wurden in einem sogenannten „Standardextraktionspuffer“ (SEP) resuspendiert (80% Methanol für die HPLC und 20% H_2O für die HPLC, Merck, Darmstadt). Dieser SEP, versetzt mit in physiologischen Aminosäuregemischen nicht vorkommendem Homoserin (4 $\mu\text{g/ml}$, Sigma Deishofen) diente als interner Standard. Eine chemische Konservierung ≤ 60 Stunden konnte durch das Resuspendieren der Lyophilisate in SEP im Rahmen der sich anschließenden automatisierten Vorsäulen-Derivatisierung ermöglicht werden^{60,61}. Als Resuspensionsvolumen wurden 280 μl SEP verwendet.

2.2.2 Aminosäureanalytik: Standardisierung

Standardisiert und kalibriert wurde die Aminosäureanalytik zur Bestimmung primärer Aminosäuren anhand von eigenen Aminosäurestandardproben (hergestellt mittels physiologischer NaCl-Konzentration, analysenreiner Reagenzien und Lösungen (Sigma, Deisenhofen). Die Standards wurden mit humanem Serumalbumin (4%; Merck, Darmstadt) versetzt^{60,61}.

Es wurden jeweils in 20 ml 0,9%-iger NaCl-Lösung (Merck, Darmstadt) eingewogen:

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

Tabelle 1: Einwaagen Aminosäurestandards

Von Ansatz Nr.1 4 ml und je 400 µl Ansatz 2-5 wurden zusammengeführt sowie humanes Serumalbumin (800 mg Merck, Darmstadt) hinzugegeben und gelöst. Die Stocklösung (je 200 µl) wurde in Eppendorfgefäße aliquotiert und bei -20°C eingefroren und bei -80°C zwischengelagert. Am darauffolgenden Tag erfolgte dann das Lyophilisieren (siehe 2.1.) und bei -80°C die definitive Einlagerung (Lagerzeit: < 6 Monate).

2.2.3 Aminosäureanalytik: Vorbereitung Fluoreszenzmarkierung

Boratpuffer

Isoindol-Derivate werden reproduzierbar und vollständig aus primären Aminosäuren im alkalischen Medium (pH 9,5) gebildet. Ein speziell hergestellter Boratpuffer diente der Vorbereitung zur Fluoreszenzmarkierung für die automatisierte Vorsäulenderivatisierung: 5,03 g Tetraborat (Merck, Darmstadt) wurden kochend in 200 ml H₂O für die HPLC gelöst, abgekühlt und exakt auf einen pH von 0,5 eingestellt (HCl- bzw. NaOH-Lösungen). 5-minütiges Kochen (100°C) ermöglichte reproduzierbare Pufferkapazitäten. Lichtgeschützt eingelagert (20°C) war der Boratpuffer 3 Monate haltbar^{60,61}.

2.2.4 Aminosäureanalytik: Fluoreszenzmarkierung

o-Phtaldialdehyd-Mercaptoethanol-Reagenz (OPA-Thiol-Reagenz)

Primäre Aminosäuren wurden mittels o-Phtaldialdehyd-Mercaptoethanol-Reagenz (OPA-Thiol-Reagenz) im Rahmen der automatisierten Vorsäulenderivatisierung

fluoreszenzmarkiert. 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 2.2.3) 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^{60,61}.

0,75 N HCl-Lösung

Die alkalischen Fluoreszenzderivate mussten auf pH-Werte von durchschnittlich 7,3-7,4 mittels 0,75 N HCl-Lösung abgepuffert^{60,61} werden, um die Stabilität der fluoreszenzmarkierten primären Aminosäuren sowie des Säulenmaterials zu gewährleisten. Es wurde 1 N HCl-Lösung (Merck, Darmstadt) mit H₂O für die HPLC zu einer 0,75 N HCl-Lösung verdünnt. Durch Titration mit 0,1 N HCl wurden im automatisierten Analysenschritt reproduzierbare Neutralisation und pH-Werte (7,4 ± 0,15) erreicht.

Methanol-Natriumacetatpuffer

Die bestmögliche Separation des komplexen OPA-Thiol-Aminosäurederivatgemisches erreichten wir durch ein binäres Eluentensystem aus Methanol/Acetatpuffer. Die 0,5 M Acetatlösung, mit H₂O für die HPLC verdünnt und mit 6M HCl auf einen pH-Wert von 7,2 eingestellt, konnte lichtgeschützt bei 20°C unbegrenzt gelagert werden. Mit H₂O für die HPLC 1:10 weiter verdünnt (= 0,05 M Acetatpuffer) wurde dann entsprechend Methanol für die HPLC dazugegeben:

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

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

Spüllösung für die F-HPLC

Das gesamte System inklusive Probenschleife und Injektionsnadel des Autosamplers wurde mit einem 1:1 Methanol: H₂O-Gemisch (für die HPLC) gereinigt, das über einen Zeitraum von 15 Minuten mittels Ultraschall (Sonorex Super RK 103[®], Bandelin, Berlin) entgast worden war.

2.2.5 Aminosäureanalytik: Gerätekonfiguration F-HPLC

Die komplexe Gerätekonfiguration zur F-HPLC primärer Amino- und α -Ketosäuren sowie die Durchführung der F-HPLC erfolgte wie beschrieben¹⁷. Es wurden benötigt und aufgebaut:

- Gradientenpumpe mit angeschlossener Kontrolleinheit zur Gradientenprogrammierung (600 E[®], Waters, U.S.A.).
- 3-Kanal-Degaser (Knauer, Berlin), dient kontinuierlicher Entgasung der Elutionspuffer.
- Programmierbare Autosampler-Pipettiereinheit (Triathlon[®], Spark, Holland), integriertes Rheodyne-Injektionsventil, angeschlossene 100 μ l fassende Probenschleife (AS 300[®], Sunchrom, Friedrichsdorf) zur automatisierten Vorsäulenderivatisierung.
- Reversed-Phase F-HPLC-Trennsäule (Nova Pak RP-C-18[®], 300 x 3,9 mm, I.D.; 60 Å, 4 μ m; Waters, U.S.A.).
- Säulenofen (Knauer, Berlin) zur kontinuierlichen Temperierung der Trennsäule (35°C) während der Analytik.
- Fluoreszenzspektrometer (RF-530[®], Shimadzu, Kyoto, Japan).
- Interfacebox (Knauer, Berlin) zur digitalen Umwandlung der analog vom Fluoreszenzspektrometer aufgenommenen Daten.

- Computergestützte Meßwerterfassung / Datenauswertung (Compaq, U.S.A.) mit spezieller Integrationssoftware für Aminosäurechromatogramme aus biologischen Proben (EuroChrom 2000 für Windows[®], Version 1,65; Knauer, Berlin).

2.2.6 Aminosäureanalytik: Automatisierte Vorsäulen-Derivatisierung

Die lyophilisierten Proben wurden vor der Vorsäulenderivatisierung manuell durch Aufpipettieren von 280 µl SEP (+ I.S.) gelöst und so ein Extrakt der Probe hergestellt. Nach Inkubation für 5 min und Zentrifugation (Rotixa/ KS[®], Tuttlingen) für 3 min bei 3000 g wurde die Probe in ein spezielles Probengefäß überführt (2-CRV[®], Chromacoll, Trumbull, U.S.A), nachfolgend (200 µl Extrakt) automatisiert mit 80 µl 0,5 M Boratpuffer basisch gepuffert (pH= 9,5), zusätzlich 40 µl OPA-Thiol-Reagenz hinzugefügt. Nach exakt 120 Sekunden wurde die Reaktion (Derivatisierung) mittels 20 µl 0,75 N HCL durch Neutralisation gestoppt (pH ≈ 7,2) . Nach 1:4 Zusatz von 50 µl Elutionspuffer A wurden 50 µl von dieser finalen Verdünnung in das System injiziert.

2.2.7 Aminosäureanalytik: Gradientenelution freier Aminosäuren

Die Gradientenelution fand nach sorgfältiger Äquilibrierung der Analytik (≥4 h) wie hier in Tabelle 2 beschrieben statt (siehe Burchert et al.¹⁷).

Gradientenzeitverläufe Aminosäuren		
Zeit [min]	Puffer A	Puffer B
0	97	3
3	97	3
3,1	100	0
37	70	30
63	0	100
67	97	3

Tabelle 2: Gradientenzeitverläufe zur Analyse freier Aminosäuren. *1 PSI = 6894,76 Pa.

Elutionsbedingungen des binären Gradientenelutionssystems:

Puffer A: 19% Methanol/ 81% 0,05M Acetat (pH 7,2)

Puffer B: 75% Methanol/ 25% 0,05M Acetat (pH 7,2)

Flußrate: 1 ml/min

Druck: 2900 PSI* ± 150 PSI* (A: 97%/ B: 3%)

Fluoreszenzdetektion: Anregungswellenlänge: 330 nm

Emissionswellenlänge: 450 nm

Zur Verwendung kam ein binäres Eluentensystem mit Methanol-Acetat (0,05 M)-Puffern. Die Elutionspuffer wurden entsprechend Tabelle 2 in das Fluoreszenz-HPLC-System eingespeist.

2.3 Bestimmung der α -Ketosäuren in Plasma und PMN durch hochauflösende F-HPLC

Die zur exakten Quantifizierung von intragranulozytärer α -Ketosäuren im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Methodiken genügen den sehr hohen Anforderungen. Die Untersuchungsmethoden wurden von Mühling et al.¹³⁵ zur Bestimmung von α -Ketosäuren auf Einzelzellniveau der PMNs weiterentwickelt sowie präzise standardisiert und validiert. Als Grundlage dienen die Arbeiten von Farshidfar⁵¹ Fuchs⁶¹ und Riedel et al.¹⁵⁸⁻¹⁶⁰ und die darin beschriebenen Arbeitsabläufe zur Analyse plasmatischer α -Ketosäuren.

2.3.1 α -Ketosäureanalytik: Standardextraktionspuffer

Die in physiologischen Gemischen nicht vorkommende α -Ketosäure α -Ketovalerianat (Sigma, Deisenhofen) wurde als interner Standard eingesetzt. Das in flüssiger Form vorliegende α -Ketovalerianat (116 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) verdünnten wir mittels H_2O für HPLC und versetzten 200 μl dieser Lösung (α -Ketovalerianatkonzentration: 2,322 $\mu\text{g}/\text{ml}$) mit 3,8 ml Methanol. 250 μl dieses Standardextraktionspuffers wurden dann für das Resuspendieren der gefriergetrockneten Proben (α -Ketosäurestandard-, Plasma- und PMN) verwendet.

2.3.2 α -Ketosäureanalytik: Standardisierung

Die Standardisierung und Kalibrierung der α -Ketosäureanalytik erfolgte mittels α -Ketosäurestandardproben in physiologischer Kochsalzlösung (analysereine

Reagenzien und Lösungen von Sigma, Deisenhofen). Darüber hinaus wurden die Standardproben mit humanem Serumalbumin (4%; Merck, Darmstadt) versetzt.

Folgende Einwaagen wurden vorgenommen (ad 20 ml NaCl für die HPLC):

	Ketosäure	Code	Masse (mg)
Ansatz 1	α -Ketoglutarat	KG	20
Ansatz 2	Pyruvat	PYR	20
	α -Ketobutytrat	KB	20
Ansatz 3	α -Ketoisovalerianat	KIV	20
	α -Ketoisocapronat	KIC	20
	Phenylpyruvat	PhePYR	20
	α -Keto- β -methylvalerianat	KMV	20

Tabelle 3: Einwaagen α -Ketosäurenstandards

Zur Herstellung einer Stammlösung wurde wie folgt pipettiert: Ansatz 1 240 μ l, Ansatz 2 120 μ l und Ansatz 3 50 μ l mit 19,590 ml NaCl (Σ = 20 ml) versetzt, 800 mg humanes Serumalbumin (Merck, Darmstadt) zugesetzt und gut gelöst. Je 50 μ l dieser Stammlösung wurden in Eppendorfgefäße aliquotiert und zunächst bei -20°C eingefroren. Danach wurden die bei -20°C eingefrorenen Standardproben bei -80°C über Nacht tiefgefroren. Diese wurden dann am darauffolgenden Tag lyophilisiert und bei -80°C eingelagert (Lagerzeit: < 4 Wochen).

2.3.3 α -Ketosäureanalytik: Fluoreszenzmarkierung

Zur Fluoreszenzmarkierung von α -Ketosäuren wurde das sehr oxidationsempfindliche o-Phenyldiamin PDA (Sigma, Deisenhofen) verwandt. Jedwede (oxidative) Veränderung dieses Moleküls könnte als Fluoreszenzstörraktivität die Qualität der Analyse beeinträchtigen. Aus diesem

Grunde wurde das erworbene PDA, welches selbst analysenrein nur in brauner (= oxidierter) Kristallform vorlag, im Institut für Organische Chemie der Justus-Liebig-Universität umkristallisiert. Hierzu wurde das PDA in Heptan bei 100-120°C (Ölbad, Merck, Darmstadt) gelöst und in einem Rotationsverdampfer (Merck, Darmstadt) verdampft. Nach vollzogener Umkristallinisierung und Trocknung wurde das weiß-kristalline PDA unter Stickstoffbegasung (Messer, Griesheim) luftdicht verpackt. Hierdurch war es lichtdicht bei 4°C chemisch stabil. Direkt vor Probenaufbereitung zur Analyse erfolgte die Rekonstitution des PDA. Für jede zu untersuchende Probe wurden 5 mg PDA in 5 ml 3 M HCl (Sigma, Deisenhofen) gelöst und mit 10 µl 2-Mercaptoethanol (Sigma, Deisenhofen) versetzt. Bei Raumtemperatur und lichtdicht war diese Lösung bis zu 6 Stunden stabil.

2.3.4 α -Ketosäureanalytik: Halbautomatische Derivatisierung

Die lyophilisierten Proben (Standard- bzw. PMN-Proben) wurden in 250 µl des Standardextraktionspuffers für die α -Ketosäureanalytik (SEP-KS) resuspendiert, 3 Minuten inkubiert (Rüttelmixer, Eppendorf, Hamburg) sowie 3 Minuten zentrifugiert (3000 x g, Rotixa KS[®], Tuttlingen). Jeweils 200 µl Überstand der Probe wurde in Glasgefäße (10 ml, Knauer, Berlin) überführt. Danach wurde das Methanol unter Stickstoff (Messer, Griesheim) eingedampft und die Probe vollständig getrocknet. Das Abscheiden eines weissen Niederschlages nach ca. 8 ± 2 Minuten (bei den PMN Proben) beobachtet werden. Die Resuspension der getrockneten Probe wurde mit je 5 ml PDA-Reagenz (Ika-Vibrax[®], Merck) durchgeführt. Die Lösungen wurden dann 60 Minuten bei 80°C prozessorgesteuert temperaturkontrolliert in einem Wasserbad (Sigma, Deisenhofen) inkubiert. Die Abkühlung der Proben erfolgte über 15 Minuten bei 4°C.

Alle Proben wurden dann 3-malig mittels Essigsäureethylester (Ethylacetat, Merck, Darmstadt) extrahiert (7 Minuten, Überkopfmischer, Merck, Darmstadt). Danach wurde die Essigsäureethylester-Phasen abpipettiert und die Probe unter Stickstoffzufuhr (Messer, Griesheim) eingedampft und vollständig getrocknet. Nach der 1. Essigsäureethylesterextraktion wurde direkt parallel mit dem Eindampfen des Essigsäureethylester bzw. dem Trocknen der Probe begonnen. Um alle 3 Essigsäureethylesterphasen aus der Probe zu entfernen wurden im Durchschnitt ca. 43 ± 7 Minuten im Rahmen der zweiten Trocknungsphase benötigt.

Sobald die Proben getrocknet waren wurden diese mit 120 μ l Methanol resuspendiert. Danach konnten sie zur weiteren Aufbereitung in der Fluoreszenz-HPLC-Analytik bei -20°C gelagert werden. Hierfür wurde jeweils 50 μ l methanolisches Extrakt eingesetzt.

2.3.5 α -Ketosaureanalytik: Gradientenelution freier α -Ketosauren

Die Gradientenelution fand nach sorgfältiger Äquilibrierung der Analytik (≥ 4 h) wie hier in Tabelle 4 beschrieben statt (siehe Burchert et al.¹⁷). Wie bei der Analytik freier Aminosäuren wurde auch hier binäres Eluentensystem mit Methanol-Acetatpuffern eingesetzt. Die Zusammensetzung der Puffer und Spüllösungen entsprach dem zuvor beschriebenen.

Gradientenzeitverläufe α -Ketosäuren		
Zeit [min]	Puffer A	Puffer B
0	80	20
1	53	47
16	33	67
26	33	67
30	80	20

Tabelle 4: Gradientenzeitverläufe zur Analyse von α -Ketosäuren. *1 PSI = 6894,76 Pa.

Elutionsbedingungen des binären Gradientenelutionssystems:

Puffer A: 19% Methanol/ 81% 0,05M Acetat (pH 7,2)

Puffer B: 75% Methanol/ 25% 0,05M 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

Auch die Fluoreszenz-HPLC-Analytik entsprach ebenfalls der hier zuvor unter **2.2.5** beschriebenen Anforderungen und Konfiguration der Geräte. Auch in diesem Fall verwendeten wir eine Nova-Pak®-Säule (RP-C-18; 300 x 3,9 mm I.D.; 60 Å, 4 μ m; Waters, U.S.A.).

2.4 Spezifische Immunfunktionstests

Unsere Methodiken zur Bestimmung von Superoxidanion- und Wasserstoffperoxidbildung sowie die Quantifizierung der von PMN freigesetzten Myeloperoxidaseaktivität vitaler PMN basieren auf den durch die Arbeitsgruppen von Weening et al.¹⁸⁷, Stangel et al.¹⁷⁰, Pick und Keisari¹⁵¹, Schmitt et al.¹⁶⁶, Krumholz et al.¹⁰²⁻¹⁰⁷ beschriebenen und den von Mühling et al.^{134,136-141} weiterentwickelten Methodiken. Zellfreie Vorversuche wurden etabliert, um gegebenenfalls verfälschende Reaktionen durch Interferenzen und Reaktionen der zu untersuchenden Testsubstanzen mit den Nachweisreagenzien bei den photometrischen Immunfunktionstests zu detektieren.

2.4.1 Nachweis und Quantifizierung der Bildung granulozytärer Superoxidanionen (O_2^-) vitaler PMN

Grundlage des Nachweises bildet die Reduktion von Cytochrom C durch Superoxidanion. Hierzu wurden 100 mg Cytochrom C (Typ IV; Sigma, Deisenhofen) in 30 ml PBS[®]-Puffer (Phosphate buffered saline; Gibco, Karlsruhe) suspendiert und 250 µl Aliquots bei -20°C weggefroren. Bereits opsoniertes Zymosan wurde zur Stimulation der Granulozyten verwendet. Wir stellten dies durch Inkubation (37°C, 30 min, Schüttelwasserbad) von 100 mg Zymosan (Sigma, Deisenhofen) mit 6 ml gepooltem AB-Serum her. Danach wurde es in 0,9%-iger NaCl-Lösung gewaschen und bei 350 x g 10 min zentrifugiert. Dieser Schritt wurde einmalig wiederholt. Das nunmehr opsonierte Zymosan konnte dann in 10 ml PBS[®]-Puffer resuspendiert und in 500 µl aliquotiert und bei -20°C eingefroren werden. Nachdem die Vollblutproben mit den jeweiligen zur Fragestellung gehörigen Testsubstanzen inkubiert wurden,

erfolgte die Separation der PMN durch eine Abwandlung des oben unter 2.1 beschriebenen Verfahrens. Nach Überschichten des Percoll-Gradienten (55%/70%) und Zentrifugationsschritten (15 und 5 min; 20°C, 350 x g) wurden die verbliebenen Erythrozyten mittels 2 ml Aqua destillata hämolysiert, durch 2,7%-iger NaCl-Lösung reisoniert und durch PBS[®]-Puffer auf 10 ml aufgefüllt und vorsichtig resuspendiert. Der Überstand wurde dekantiert und die PMN-Suspension, s.o. mit dem Rüttelmixer homogenisiert. In Aliquots wurden Zellzahl, Reinheit und Vitalität untersucht und die final gewünschte PMN-Konzentration ($0,8 \times 10^6$ PMN/ml) mittels eines Glukose-PBS[®]-Puffers (9,9 g Glukose pro Liter PBS[®]) eingestellt. Hiervon wurden 500 µl ($0,4 \times 10^6$ PMN) mit 500 µl Zymosan, 150 µl AB-Serum, 250 µl Cytochrom C versetzt und unter Zugabe der zu untersuchenden Testsubstanz in entsprechender Dosierung 15 Minuten bei 37 °C im Schüttelwasserbad inkubiert. Als Nullwert wurde Zymosan durch 500 µl Glukose-PBS[®]-Puffer ersetzt. Unmittelbar nach Inkubation wurde die Reaktion gestoppt (Eintauchen der Probe in Eiswasser). Durch Zentrifugation (3 min, 350 x g, 4°C) gewannen wir den Probenüberstand und bestimmten die Extinktion bei 546 nm (Digitalphotometer 6114 S[®]; Eppendorf, Hamburg) gegen den Nullwert. Unter Berücksichtigung des Lambert-Beer'schen Gesetzes berechnete sich die gebildete Superoxidanionmenge aus Extinktion, Schichtdicke und Extinktionskoeffizienten des Cytochrom C $[(21/(\text{mMol} \times \text{cm}))]$ unter Berücksichtigung des Probenvolumens. Testsubstanzfreie Ansätze liefen stets als Kontrollen parallel zu den Meßproben mit. Die gebildete Superoxidanionmenge ist im Ergebnisteil in „fMol x (PMN x min)⁻¹“ angegeben.

2.4.2 Nachweis und Quantifizierung der Bildung von Wasserstoffperoxid (H₂O₂) vitaler PMN

Grundlage des Nachweises bildet die durch Meerrettich-Peroxidase vermittelte Oxidation von Phenolrot durch Wasserstoffperoxid.

Als Vorbereitung wurde Phenolrot (10 mg/ml; Sigma, Deisenhofen) in Aqua destillata (Merck, Darmstadt) und Meerrettich-Peroxidase (5 mg/ml; Typ II, Sigma, Deisenhofen) in Glukose-PBS[®]-Puffer (Ansatz siehe oben) gelöst. Nachdem das Vollblut mit der jeweiligen zu untersuchenden Substanz inkubiert und die PMNs isoliert worden waren (wie oben beschrieben), konnten die PMN mittels voropsoniertem Zymosan (Vorbereitung siehe Superoxidationbestimmung) stimuliert werden. Hierzu wurden 500 µl PMN-Suspension (2×10^6 PMN/ml), 500 µl voropsoniertes Zymosan, 125 µl AB-Serum, 12,5 µl Meerrettich-Peroxidase-Lösung, 12,5 µl Phenolrotlösung, 12,5 µl Natriumazidlösung (200 mM; Merck, Darmstadt) sowie die zu untersuchende Testsubstanz in der entsprechenden Dosierung zusammen pipettiert. Es erfolgte eine 15 minütige Inkubation bei 37°C im Schüttelwasserbad. Direkt danach wurde der Ansatz für 3 Minuten bei 350 x g abzentrifugiert. Nach Zusatz von 25 µl NaOH-Lösung (1N, Merck, Darmstadt) bestimmten wir die Extinktion des Überstandes bei 623 nm im Digitalphotometer gegen den unstimulierten Nullwert. Die Wasserstoffperoxidkonzentration wurde mittels regelmäßiger Eichuntersuchungen bestimmt. Die Wasserstoffperoxidbildung ist im Ergebnisteil in „fMol x (PMN x min)⁻¹“ angegeben.

2.4.3 Nachweis und Quantifizierung der Myeloperoxidase (MPO) – Aktivität vitaler PMN

Zuerst wurden 1 mM 2,2'-Azino-di(3-ethylbenzthiazolin)-Sulfonsäure (ABTS, Sigma, Deisenhofen) in 0,1 M Zitratpuffer (Behring, Marburg) gelöst. Die Vollblutinkubation sowie die nachfolgende PMN-Isolation erfolgte wie beschrieben. 100 µl der PMN-Suspension (2×10^6 PMN/ml) wurden mit 0,5 µg Cytochalasin B (Sigma, Deisenhofen) mit der zu untersuchenden Testsubstanz versetzt 5 Minuten im Schüttelwasserbad bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 100 µl voropsoniertem Zymosan (Herstellung siehe oben) und der zu untersuchenden Testsubstanz erfolgte eine erneute Inkubation (10 min; 37°C) sowie eine Zugabe von 1 ml ABTS-Lösung. Ein Zentrifugationsschritt (3 min, 700 x g, 20°C) ermöglichte das Abnehmen von 1 ml Überstand. Dieser wurde mit 30%-iger Wasserstoffperoxidlösung versetzt (Merck, Darmstadt), mit dem Rüttelmixer homogenisiert und die Extinktion bei 405 nm photometrisch bestimmt.

Die Aktivität der freigesetzten Myeloperoxidase wurde errechnet. Hierzu dienten lineare Eichkurven die in regelmäßigen Intervallen unter Verwendung bekannter Meerrettich-Peroxidasekonzentrationen erstellt wurden. Die Aktivitäten sind im Ergebnisteil in „Units x l⁻¹“ Überstand“ angegeben.

2.5 Pyruvatinkubation

Für alle Pyruvatinkubationen (Standardisierung sowie Experimente) kam heparinisiertes venöses Vollblut (10 I.E. Heparin-Natrium/ml, Sigma, Deisenhofen) zum Einsatz. Wir rekrutierten freiwilligen Spender (Alter: $31 \pm 6,3$ Jahre; mittlere Körpergröße 1,79m; mittleres Körpergewicht: 82,6 kg). Ausschlusskriterien waren metabolische, kardiozirkulatorische, pulmonale, neurologische Erkrankungen oder allergische Diathese sowie Medikamenteneinnahme in der Vorgeschichte. Die Blutentnahmen selbst erfolgten nach 8 bis 10-stündiger Nüchternheit morgens zwischen 08:00 und 10:00 Uhr. Sofort wurden die heparinisierten Vollblutproben portioniert, in Inkubationsröhrchen (Merck, Darmstadt) überführt und nach Zusatz der zu untersuchenden Testsubstanzen im Schüttelwasserbad bei 37°C inkubiert (1 ml Vollblut unter Zusatz von 25 µl der entsprechenden Testsubstanz). Zur Vorbereitung wurden die Testsubstanzen mit *Hank's balanced salt solution* (HBSS[®], Sigma, Deisenhofen) in die jeweilig zu untersuchenden Konzentrationsbereiche diluiert (pH 7,4). Es liefen bei allen dargestellten Untersuchungen testsubstanzfreie Versuchsansätze als Kontrollen mit. Etwaige Volumendifferenzen der Kontrollproben glichen wir mit HBSS[®] aus. Die Standardinkubationszeiten waren 10, 60 und maximal 120 Minuten. Aus folgenden Gründen verzichteten wir auf längere Inkubationszeiten: Präliminäre Untersuchungen und Arbeiten aus unserer Arbeitsgruppe (siehe u.a. Burchert¹⁷) zeigten, dass unter längeren Inkubationszeiten (> 180 min) auch bei den Kontrollen unspezifische, nicht reproduzierbare Veränderungen im intrazellulären Aminosäure- und α -Ketosäurepool wie auch bei den granulozytären Immunfunktionen auftraten. Darüberhinaus gestaltete sich eine genau PMN-Zelltrennung und eine exakte Zellzahlbestimmung bei langen Inkubationszeiten als schwierig. Die ausgewählten Konzentrationsbereiche

orientierten sich an den Angaben und Ergebnissen früherer Untersuchungen (die Referenzen hierzu befinden sich an den entsprechenden Positionen im Diskussionsteil).

Die oben formulierten Fragestellungen wurden durch folgende Experimentkonzeption gezielt abgearbeitet:

Beeinflusst die Dosis des Pyruvats mögliche zu messende Effekte?

Um mögliche dosisabhängige Effekte dokumentieren zu können wurden die Vollblutproben im Teil I der durchgeführten Untersuchungen mit unterschiedlichen Pyruvatkonzentrationen (0, 50 μ M, 100 μ M, 200 μ M, 500 μ M und 1 mM) inkubiert. Die Inkubationszeit betrug 120 Minuten.

Die angewendeten Pyruvatkonzentrationen orientierten sich hier an den in Voruntersuchungen gemessenen sowie den in der Literatur angegebenen Normalwerten von Pyruvat im menschlichen Plasma (0-, $\frac{1}{2}$ -, 1-, 2-, 5- and 10-fache Plasma-Pyruvatkonzentration).

Beeinflusst die Expositionszeit der Inkubation mit Pyruvat mögliche zu messende Effekte?

Im zweiten Teil der vorliegenden Untersuchung verfolgten wir die Fragestellung, ob eine Pyruvatinkubation von Vollblut auch mögliche expositionszeitabhängige Effekte induzieren könne. Hierzu wurden die Proben 10, 60 oder 120 Minuten mit 1mM Pyruvat, dem 10-fachen Plasma-Pyruvatkonzentration, inkubiert.

Das verwendete Pyruvat wurden in Hank's balanced salt solution (HBSS; Sigma, Deisenhofen, Germany) gelöst und der pH-Wert jeder Pyruvatlösung wurde auf 7,4

eingestellt. 1ml Vollblut wurde mit jeweils 25µl der Testlösung versetzt und die so vorbereitete Probe dann bei 37°C im Schüttelwasserbad inkubiert. Zu den Kontrollproben wurde anstatt einer Pyruvatlösung jeweils 25µl HBSS hinzugegeben. Eine weitere Stoffwechselaktivität nach Ablauf der Inkubationszeit wurde durch ein sofortiges Eintauchen der Proben in Eiswasser unterbrochen. Hierdurch sollte eine mögliche Verfälschung der Messergebnisse verhindert werden. Darüberhinaus wurde ein möglicher Proteinkatabolismus nach der Inkubation durch Zusatz von Proteaseinhibitoren verhindert (100 µg/ml Phenyl-Methyl-Sulfonyl-Fluorid (PMSF), 10 µg/ml Leupeptin, 10 µg/ml Pepstatin sowie 10 µg/ml Antipain [Sigma, USA]).

2.6 Statistik

Bei der statistischen Aufbereitung unterstützte uns das Institut für Medizinische Informatik der Justus-Liebig-Universität Gießen.

Nach Sichtung der Messwerte wurde prinzipiell Normalverteilung für die durch in unseren Untersuchungen bestimmten freien Amino- und α -Ketosäuren sowie die untersuchten Immunfunktionsparameter postuliert. Wir stellten daher die Ergebnisse entsprechend aufgeschlüsselt nach Dosierung und Inkubationszeit sowie bezogen auf die jeweiligen Ansätze unter Zuhilfenahme von Mittelwerts- und Standardabweichungsberechnungen dar. Wir setzen ein- bzw. zweifaktorielle Varianzanalysen mit Meßwiederholungen ein, welche bei Haupteffekten durch einen Paarvergleich nach Bonferroni ergänzt wurden.

Im Rahmen dieser explorativen Analyse der Daten wurde eine Vielzahl von Hypothesen getestet: Als Kriterium zur Beibehaltung der Hypothesen war die errechnete Wahrscheinlichkeit für den Fehler der 1. Art p , der reduziert auf ein Signifikanzniveau von $p \leq 0,05$ angegeben wird.

Die Messwerte der Immunfunktionstests wurden zunächst unter Zuhilfenahme des Kolmogorow-Smirnow-Anpassungstests (KSA-Test) hinsichtlich ihrer Normalverteilung geprüft. Darüber hinaus erfolgte mittels des Bartlett's-Tests die Prüfung aller Messergebnisse auf Varianzhomogenität ($p < 0,1$). Danach erfolgte eine ein- bzw. zweifaktorielle Varianzanalyse mit Meßwiederholungen, welche bei nachweisbaren Haupteffekten ebenfalls nach Bonferroni korrigiert wurde.

Konnte eine Varianzanalyse nicht durchgeführt werden (Vorbedingungen nicht erfüllt), wurden der Friedman oder der Miller-Test verwendet. Das Signifikanzniveau für alle angewendeten statistischen Verfahren wurde mit $p \leq 0,05$ angesetzt.

3 Ergebnisse

3.1 Separation von PMN aus Vollblut

Da Zellproben mit weniger als 95% vitalen PMN-Zellen sowie einer PMN-Zellreinheit unter 95% verworfen wurden, betrug die Reinheit der separierten PMN-Zellen durchschnittlich $97,6\% \pm 0,8\%$. Die Vitalität lag im Mittel bei $98,4\% \pm 0,7\%$. Die prozentuale Abweichung der Zellzahl betrug bei zweimaliger Zellzählung im Durchschnitt $4,7 \pm 2,6\%$. Die PMN-Zellseparation selbst benötigte im Mittel 34 Minuten.

3.2 Bestimmung von Amino- und α -Ketosäuren

Im Rahmen der quantitativen Bestimmung von primären Aminosäuren und α -Ketosäuren mittels Hochdruck-Fluoreszenz-Flüssigkeits-Chromatographie wurden die Reproduzierbarkeit wie die Qualität der Untersuchungsergebnisse mittels Verwendung von externen und internen Standardisierungsverfahren fortlaufend überwacht. In den Tabellen 5 und 6 finden sich die Ergebnisse der Qualitätssicherung der hier verwendeten Methodik. Wie die Befunde der „Reihen“- und der „Tag-zu-Tag“-Analysen hinsichtlich der Flächenquotienten wie auch der Retentionszeiten zeigen, fand sich kein Hinweis auf eine methodische Instabilität der Untersuchungsbedingungen. Ferner zeigten sich auch keine Hinweise, dass es nach Resuspension der lyophilisierten Standardaminosäure- bzw. α -Ketosäurestandardproben zu einer weiteren chemischen Umwandlung oder auch zum Verlust an Fluoreszenzaktivität kam. Sowohl bei den Aminosäure- und α -Ketosäurestandardproben wie auch bei den PMN- und Plasmaproben betrug die Wiederfindungsrate für alle hier untersuchten Standardaminosäuren und α -Ketosäuren 100%.

Aminosäureanalytik

	<i>Reihenanalyse</i>				<i>„Tag zu Tag-Analyse“</i>		
	<i>R.-Zeit</i>	<i>Flächen</i>	<i>R.-Zeit</i>		<i>R.-Zeit</i>	<i>Flächen</i>	<i>R.-Zeit</i>
	<i>t</i>	<i>VK</i>	<i>VK</i>		<i>t</i>	<i>VK</i>	<i>VK</i>
	<i>[min]</i>	<i>[%]</i>	<i>[%]</i>		<i>[min]</i>	<i>[%]</i>	<i>[%]</i>
Aminosäure	<hr/>						
Aspartat	3,31	1,28	0,22		3,48	3,02	0,38
Glutamat	4,49	1,35	0,16		4,60	2,07	0,57
Asparagin	8,65	1,13	0,12		8,81	2,13	0,62
Serin	11,27	1,42	0,15		11,56	2,28	0,59
Glutamin	14,42	1,30	0,19		14,82	2,75	0,66
Histidin	16,36	1,46	0,18		17,03	3,26	0,72
Homoserin (I.S.)	20,11	2,82	0,22		20,66	3,15	0,69
Glycin	24,20	1,89	0,24		24,85	1,98	0,71
Threonin	27,09	1,26	0,23		27,63	2,41	0,77
Citrullin	28,32	1,73	0,25		28,93	2,06	0,55
Arginin	34,51	1,34	0,12		35,21	3,79	0,23
Taurin	39,16	1,28	0,07		39,77	4,32	0,19
Hypotaurin	40,28	1,75	0,06		40,83	3,59	0,16
Alanin	41,69	1,49	0,06		42,28	3,78	0,12
Tyrosin	44,34	1,62	0,05		44,70	3,63	0,11
α-Aminobutyrat	49,28	1,26	0,04		49,94	2,81	0,10
Tryptophan	53,02	1,54	0,04		53,21	2,48	0,09
Methionin	53,38	0,98	0,03		53,68	3,70	0,08
Valin	54,26	1,51	0,03		54,71	3,04	0,07
Phenylalanin	55,72	1,07	0,03		56,06	3,53	0,07
Isoleucin	58,22	1,33	0,02		58,55	3,92	0,06
Leucin	59,23	2,52	0,02		59,43	3,46	0,05
Ornithin	62,60	2,47	0,02		63,01	3,37	0,05
Lysin	64,31	2,02	0,02		64,78	4,75	0,04

Tabelle 5: Reproduzierbarkeit und Linearität der Flächenquotienten (Flächen) sowie Retentionszeiten (R.-Zeit) von Standardproben **freier Aminoäuren** bei Reihen- (n= 20) und „Tag-zu-Tag“-Analysen (n= 15); VK= Variationskoeffizient [%], t= Zeit [min], I.S. = Interner Standard.

α -Ketosäureanalytik

	<i>Reihenanalyse</i>				<i>„Tag zu Tag-Analyse“</i>		
	<i>R.-Zeit</i>	<i>Flächen</i>	<i>R.-Zeit</i>		<i>R.-Zeit</i>	<i>Flächen</i>	<i>R.-Zeit</i>
	<i>t</i>	<i>VK</i>	<i>VK</i>		<i>t</i>	<i>VK</i>	<i>VK</i>
	<i>[min]</i>	<i>[%]</i>	<i>[%]</i>		<i>[min]</i>	<i>[%]</i>	<i>[%]</i>
α-Ketosäure							
α -KG	2,41	2,3	0,21		2,51	4,7	0,56
PYR	8,65	1,9	0,19		8,78	3,6	0,54
α -KB	12,67	2,6	0,25		12,89	3,9	0,49
α -KV (I.S.)	17,14	2,8	0,23		17,33	4,4	0,67
α -KIV	19,86	3,9	0,27		19,75	5,3	0,48
α -KIC	21,72	2,4	0,26		21,50	3,7	0,82
PhePYR	22,69	2,6	0,22		22,34	4,5	0,90
α -KMV	25,61	3,2	0,28		25,42	5,1	1,03

Tabelle 6: Reproduzierbarkeit und Linearität der Flächenquotienten (Flächen) sowie Retentionszeiten (R.-Zeit) von α -Ketosäurestandardproben mit freiem **α -Ketoglutarat** (α -KG), **Pyruvat** (PYR = α -Ketoalaninat), **α -Ketobutyrat** (α -KB), **α -Ketovalerianat** (α -KV= Interner Standard), **α -Ketoisovalerianat** (α -KIV), **α -Ketoisocapronat** (α -KIC), **p-Hydroxy-Phenylpyruvat** (PhePYR), **α -Keto- β -methylvalerianat** (α -KMV)] bei Reihen- (n= 15) und „Tag-zu-Tag“-Analysen (n= 12); VK= Variationskoeffizient [%], t= Zeit [min], I.S. = Interner Standard.

3.3 Einfluss von Pyruvat auf die freien Amino- und α -Ketosäurepools in PMN sowie granulozytäre Immunfunktionen

3.3.1 Pyruvat: Einfluss der Inkubationszeit auf die freien intragranulozytären Amino- und α -Ketosäurepools

Eine Inkubation von Vollblut mit 1mM Pyruvat (\approx 10-fache Plasmakonzentration) führte bei den PMN zu signifikanten und deutlich inkubationszeitabhängigen Veränderungen der intrazellulären Pyruvatkonzentrationen. Diese Effekte waren hier

<i>Kontrolle</i>	10 min		60 min		120 min	
	MW	SD	MW	SD	MW	SD
Asparagin	0.39	0.10	0.41	0.09	0.37	0.09
Glutamin	3.11	0.77	3.32	0.91	2.90	0.86
Aspartat	2.65	0.73	2.80	0.61	2.56	0.57
Glutamat	5,91	1,16	6,28	1.81	5,79	1,56
Ornithin	0,46	0.08	0.49	0,08	0,45	0,09
Arginin	0,35	0,07	0,37	0,07	0,34	0,08
Citrullin	0.14	0.03	0.14	0.03	0,14	0.03
Serin	2.30	0,44	2,22	0,53	2,07	0,45
Glycin	2.47	0,56	2,35	0,49	2,29	0,58
Alanin	1,94	0,46	1,86	0,46	1,81	0,59
α -Ketoglutarat	1.28	0.30	1.25	0.34	1.17	0.35
PYRUVAT	6.36	1.84	6.14	1.93	5.92	1.56
<i>PYR (1 mM)</i>	10 min		60 min		120 min	
	MW	SD	MW	SD	MW	SD
Asparagin	0.40	0.11	0.53**	0.12	0.65**	0.17
Glutamin	2.92	0.78	4.62**	1.27	5.54**	1.79
Aspartat	2.87	0.80	4.27**	1.32	5.18**	1.84
Glutamat	6.90	1.45	11.66**	3.91	13.84**	4.32
Ornithin	0.48	0.11	0.58	0.14	0.73**	0.24
Arginin	0.36	0.10	0.42	0.11	0.48**	0.12
Citrullin	0.13	0.03	0.14	0.04	0.16	0.05
Serin	2.19	0.46	2.52	0.67	3.01**	0.66
Glycin	2.22	0.44	2.54	0.59	3.41**	0.91
Alanin	2.26	0.57	3.34**	0.98	5.05**	1.82
α -Ketoglutarat	1.34	0.37	2.01**	0.57	2.78**	0.93
PYRUVAT	7.23	2.29	12.07**	3.36	19.31**	7.54

Tabelle 7: Der Einfluß von *Pyruvat* (PYR; 1 mM; n= 10), inkubiert in Vollblut für 10, 60 und 120 Minuten auf den freien intrazellulären Gehalt stoffwechselphysiologisch bedeutsamer *Aminosäuren* in PMN (10^{-16} Mol/ PMN; MW \pm SD; n=10) sowie auf die Gehalte von freiem intragranulozytären *α -Ketoglutarat* und *Pyruvat* (10^{-17} Mol/ PMN; MW \pm SD; n=10). * = $p \leq 0.05$ versus Kontrolle; # = $p \leq 0.05$ versus 10 Minuten.

allerdings nicht sofort, sondern erst nach 60-minütiger Inkubationszeit sichtbar (60 min: +97%; 120 min: +226%). Zusätzlich zeigte sich auch ein signifikanter Anstieg von intragranulozytärem α -Ketoglutarat (60 min: +61%; 120 min: +137%). Darüber hinaus kam es zu parallelen Veränderungen wichtiger intragranulozytärer Aminosäuren. Wie die Ergebnisse zeigen waren hier auch die Konzentrationen von Asparagin (60 min: +28%; 120 min: +75%), Glutamin (60 min: +39%; 120 min: +91%), Aspartat (60 min: +52%; 120 min: +102%), Glutamat (60 min: +85%; 120 min: +131%), Ornithin (120 min: +32%), Arginin (120 min: +17%), Serin (120 min: +63%), Glycin (120min: +48%) und Alanin (60 min: +81%; 120 min: +179%) inkubationszeitabhängig signifikant verändert. Die anderen in dieser Arbeit untersuchten Amino- und α -Ketosäuren zeigten keine statistisch belegbaren Konzentrationsveränderungen.

3.3.2 Pyruvat: Einfluss der Inkubationszeit auf granulozytäre Immunfunktionen

Wie die Ergebnisse zeigen hatte Pyruvat auch einen sehr deutlichen Einfluß auf die von uns untersuchten Immunfunktionsparameter. Diese inkubationszeitabhängigen Veränderungen (≥ 60 min) betrafen hier nicht nur die Generation von Su-

Kontrolle	10 min		60 min		120 min	
	MW	SD	MW	SD	MW	SD
O₂⁻	3.608	0,959	3,484	0.886	3.264	0.773
H₂O₂	1.279	0.316	1.263	0.365	1.198	0.304
MPO	0.584	0.157	0.545	0,190	0.499	0.172
PYR (1 mM)	10 min		60 min		120 min	
	MW	SD	MW	SD	MW	SD
O₂⁻	4.652	1.195	10.306**	3.051	17.091**	6.560
H₂O₂	1.565	0.437	3.182**	0.846	4.992**	1.926
MPO	0.672	0.211	1.208**	0.413	1.502**	0.738

Tabelle 8: Der Einfluß von **Pyruvat** (PYR; 1 mM; n= 10), inkubiert in Vollblut für 10, 60 and 120 Minuten auf die **Superoxidanionbildung** [fMol O₂⁻/(PMN x min)], die **Wasserstoffperoxidproduktion** [fMol H₂O₂/(PMN x min)] sowie die **Myeloperoxidaseaktivität** [Units/l] isolierter PMN (MW \pm SD). * $\leq 0,05$ versus Kontrolle; # $\leq 0,05$ versus 10 min.

peroxidanion (60 min: +195%; 120 min: +423%) und Wasserstoffperoxid (60 min: +152%; 120 min: +316%) sondern parallel war ebenfalls eine Erhöhung der granulozytären Myeloperoxidaseaktivität (60 min: +122%; 120 min: +201%) festzustellen.

3.3.3 Pyruvat: Dosisabhängiger Einfluss auf die freien intragranulozytären Aminosäurepools

Wie die vorliegenden Ergebnisse zeigen zeigte sich auch ein dosisabhängiger Pyruvateinfluß auf die Konzentrationen saurer intragranulozytärer Aminosäuren (Aspartat, Glutamat) sowie ihre Säureamide (Asparagin, Glutamin), aber ebenso auf Alanin (Abbildung 9). Unterschiede zeigten sich aber sowohl in der für signifikante Veränderungen erforderlichen Pyruvatkonzentration wie auch in der Ausprägung der beobachteten Effekte.

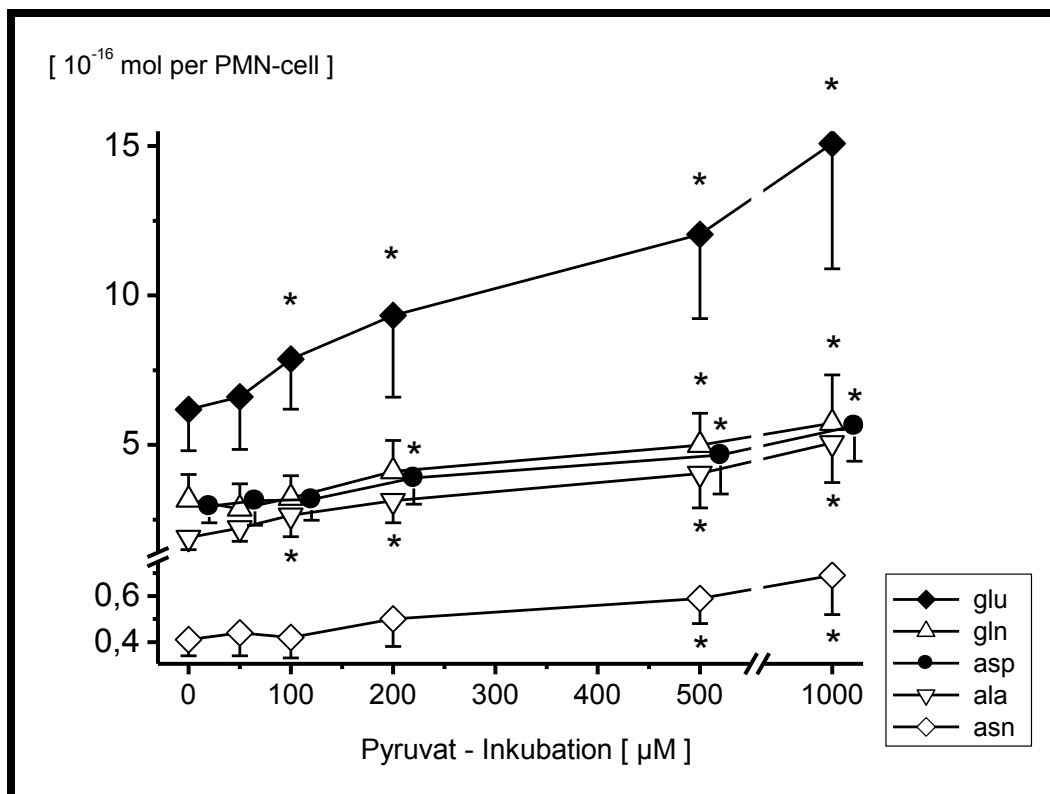


Abbildung 9: Einfluß von *Pyruvat* (0, 50, 100, 200, 500 µM und 1 mM; Inkubationszeit: 120 min; n=10) auf den freien intrazellulären Gehalt von *Glutamat* (glu), *Glutamin* (gln), *Aspartat* (asp), *Alanin* (ala) und *Asparagin* (asn) in PMN. Die Ergebnisse sind in Aminosäuregehalt [10⁻¹⁶ Mol] pro PMN-Zelle angegeben (MW ± SD). * ≤ 0,05 versus Kontrolle.

Geringere Veränderungen (+68% bis +91%) bei höheren Pyruvatkonzentrationen fanden sich hier bei Asparagin und Glutamin ($\geq 500\mu\text{M}$ Pyruvat) und Aspartat ($\geq 200\mu\text{M}$ Pyruvat). Stärker ausgeprägt waren die Effekte bei Glutamat (+ 141%) und Alanin (+ 166%). Ferner zeigten sich die ersten signifikanten Veränderungen bei den zuletzt genannten Aminosäuren auch bei niedrigeren Pyruvatkonzentrationen ($\geq 100\mu\text{M}$ Pyruvat).

Bei den basischen Aminosäuren Ornithin, Arginin, Citrullin und Lysin (Abbildung 10) waren nur geringe Effekte zu evaluieren. Auch bei hohen Pyruvatkonzentrationen (Ornithin: $\geq 500\mu\text{M}$; Arginin: $\geq 1\text{mM}$) zeigten sich signifikante Veränderungen nur bei Ornithin (1mM Pyruvat: +61%) und Arginin (1mM Pyruvat: +47%).

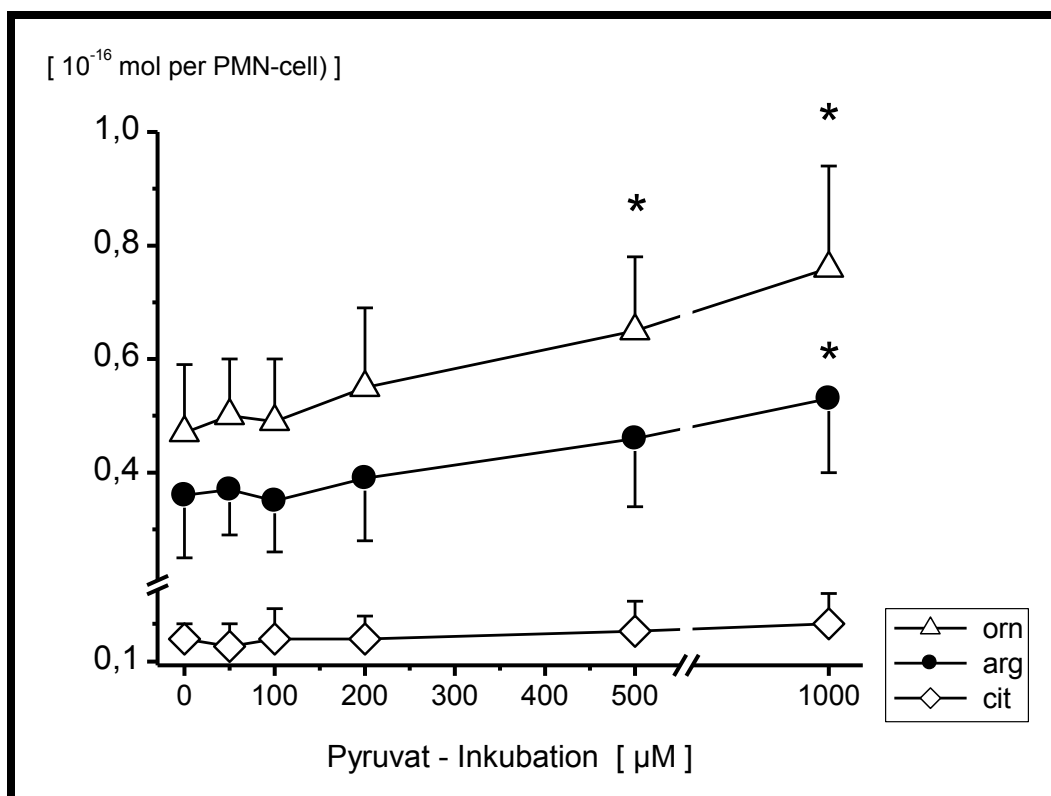


Abbildung 10: Einfluß von **Pyruvat** (0, 50, 100, 200, 500 μM und 1 mM; Inkubationszeit: 120 min; n=10) auf den freien intrazellulären Gehalt von **Ornithin** (orn), **Arginin** (arg) und **Citrullin** (cit) in PMN. Die Ergebnisse sind in Aminosäuregehalt [10^{-16} Mol] pro PMN-Zelle angegeben (MW \pm SD). * $\leq 0,05$ versus Kontrolle.

Ähnlich geringgradige Effekte wie bei den basischen Aminosäuren zeigten sich in der vorliegenden Untersuchung auch bei den neutralen Aminosäuren (Abbildung 11).

Während bei Threonin und α -Aminobutyrat keinerlei Veränderungen zu beobachten waren zeigten sich signifikante Effekte nur bei Serin und Glycin, hier allerdings ausschließlich nur bei der in dieser Arbeit verwendeten höchsten Pyruvatkonzentration von 1mM (Serin: + 36%; Glycin: +45%).

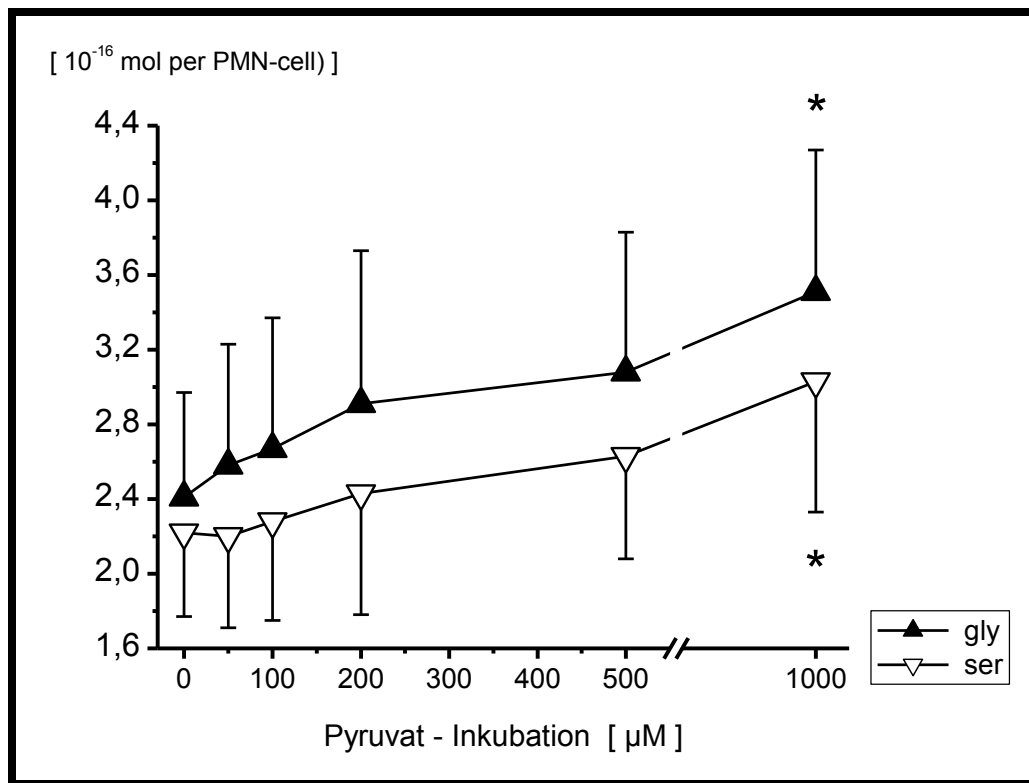


Abbildung 11: Einfluß von **Pyruvat** (0, 50, 100, 200, 500 μM und 1 mM; Inkubationszeit: 120 min; n=10) auf den freien intrazellulären Gehalt von **Serin** (ser), und **Glycin** (gly) in PMN. Die Ergebnisse sind in Aminosäuregehalt [10^{-16} Mol] pro PMN-Zelle angegeben (MW \pm SD). * $\leq 0,05$ versus Kontrolle.

Ein signifikanter Einfluß von Pyruvat auf die in dieser Arbeit weiterhin untersuchten Aminosäuren Methionin, Taurin und Hypotaurin beziehungsweise auf die aromatischen Aminosäuren Tyrosin, Tryptophan, Phenylalanin und Histidin wie aber auch auf die verzweigt-kettigen Aminosäuren Valin, Isoleucin und Leucin konnte allerdings statistisch nicht beobachtet werden.

3.3.4 Pyruvat: Dosisabhängiger Einfluss auf die freien intragranulozytären α -Ketosäurepools

Hinsichtlich der in der vorliegenden Arbeit untersuchten α -Ketosäuren zeigten sich statistisch signifikante Effekte allein für Pyruvat selbst sowie für α -Ketoglutarat (Abbildung 12). Die hierfür notwendigen Pyruvatkonzentrationen betragen bei der von uns gewählten Inkubationszeit von 120 Minuten mindestens 100 μ M Pyruvat im Versuchsansatz. Wie auch bei den Aminosäuren zeigten sich die maximalen Effekte bei Pyruvat und α -Ketoglutarat bei den höchsten Pyruvatkonzentrationen (Pyruvat: +207%; α -Ketoglutarat: + 141%).

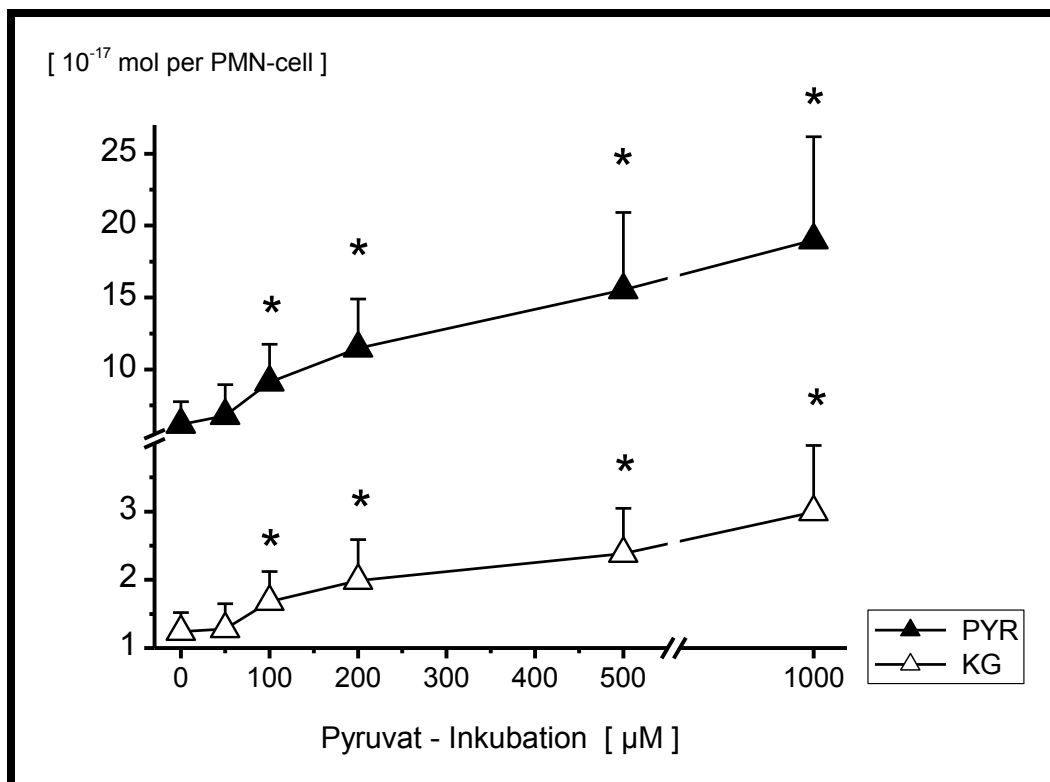


Abbildung 12: Einfluß von **Pyruvat** (0, 50, 100, 200, 500 μ M und 1 mM; Inkubationszeit: 120 min; n=10) auf den freien intrazellulären Gehalt von **Pyruvat**, und **α -Ketoglutarat** in PMN. Die Ergebnisse sind in α -Ketosäuregehalt [10^{-17} Mol] pro PMN-Zelle angegeben (MW \pm SD). * \leq 0,05 versus Kontrolle.

Weitere statistisch signifikante Veränderungen bei den anderen im Rahmen dieser Arbeit untersuchten intragranulozytären α -Ketosäuren im Rahmen einer Pyruvatex-

position von Vollblut (α -Ketobutyrat, α -Ketoisovalerianat, α -Ketoisocapronat, p-Hydroxy-Phenylpyruvat und α -Keto- β -methylvalerianat) fanden sich jedoch nicht.

3.3.5 Pyruvat: Dosisabhängiger Einfluss auf die granulozytären Immunfunktionen

Ausgeprägte Veränderungen zeigten sich bei den hier untersuchten granulozytären Immunfunktionen (Abbildung 13). Schon bei einer geringeren Pyruvat-

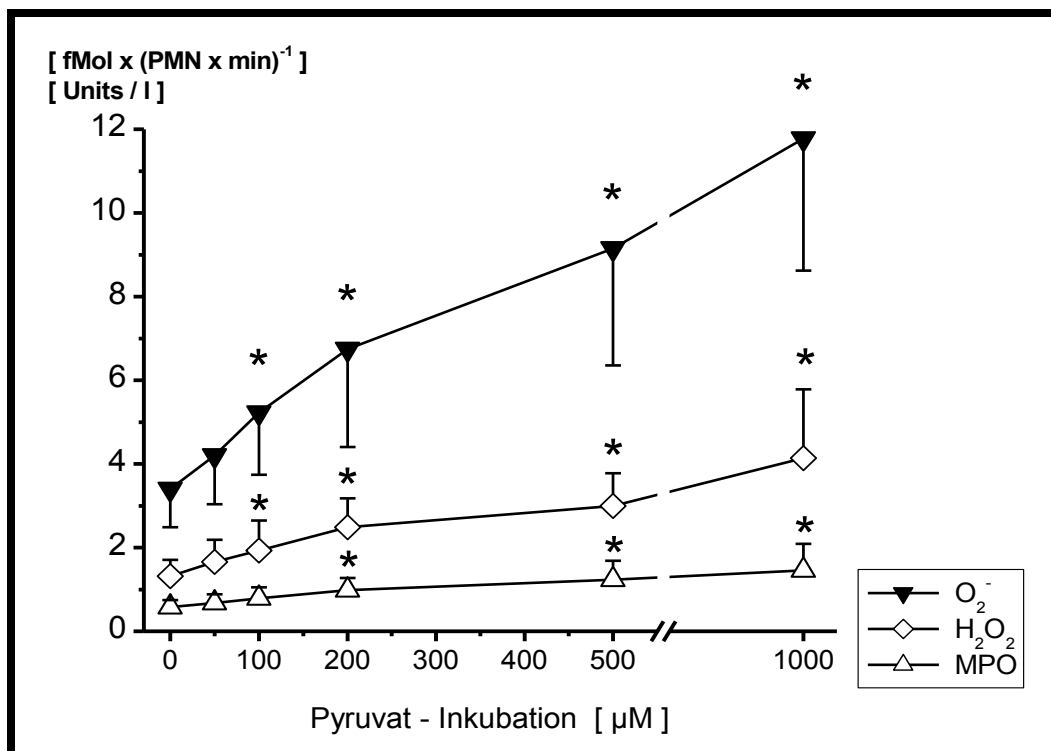


Abbildung 13: Einfluß von **Pyruvat** (0, 50, 100, 200, 500 μM und 1 mM; Inkubationszeit: 120 min; n=10) auf die **Superoxidationbildung** [O_2^- ; $\text{fMol} \text{O}_2^-/(\text{PMN} \times \text{min})$], die **Wasserstoffperoxidproduktion** [H_2O_2 ; $\text{fMol} \text{H}_2\text{O}_2/(\text{PMN} \times \text{min})$] sowie die **Myeloperoxidaseaktivität** [MPO; Units/l] isolierter PMN (MW \pm SD). * $\leq 0,05$ versus Kontrolle.

konzentration von 100 μM fanden sich hier signifikante Veränderungen der Superoxidationbildung (+53% bzw. +246% bei 1 mM Pyruvat) und Wasserstoffperoxidproduktion (+45% bzw. +213% bei 1 mM Pyruvat) nach Vollblutinkubation isolierter PMN. Aber auch die Aktivität der von PMN produzierten Myeloperoxidase war schon bei mittelgradigen Pyruvatspiegeln ($\geq 200\mu\text{M}$) signifikant erhöht (+69% bzw. +151% bei 1 mM Pyruvat).

4 Diskussion

4.1 Verwendete Methoden und Messverfahren

4.1.1 Separation von PMN

Von besonderer Bedeutung im Rahmen der Aufbereitung von PMN-Zellen nach einer vorheriger Inkubation mit unterschiedlichen Nährstoffen, Medikamenten oder Stoffwechselmodulatoren ist es, weiterlaufende Stoffwechselprozesse so weit wie möglich auszuschalten. Nur Separationsverfahren die keine weitere Stoffwechselaktivität der PMN zulassen und so den status quo bei Blutabnahme reflektieren, sind hier geeignet, Veränderungen des freien intragranulozytären Amino- und α -Ketosäurestoffwechsel sensitiv genug zu erfassen^{74,157}. Ziel einer PMN-Aufbereitung aus Vollblut muß folglich die möglichst zügige und inerte PMN-Separation unter vollständigem Schutz und Erhalt aller zellulären Funktion und Integrität bei hoher Probenreinheit sein^{120,183}. Zu diesem Zweck wurde hier, anstelle der sehr häufig verwendeten Ficollgradientenmethodik zur Granulozytenseparation, eine von Mühling et al.^{133,135} weiterentwickelte und modifizierte Methodik verwendet, die eine sehr rasche und hochselektive PMN-Anreicherung aus sehr geringen Vollblutmengen ermöglicht. Es wurden hier 4 ml Vollblut für die Bestimmung von Standardamino-säuren bzw. 8 ml Vollblut für die Bestimmung von α -Ketosäuren verwendet. Mit der dargestellten Methodik war es uns möglich, mit geringen Vollblutmengen hohe Zellzahlen bei sehr hoher Zellreinheit (>97 % PMN pro Probe) zu separieren. Ebenso waren weder die Vitalität noch Integrität der Zellen, wie die lichtmikroskopische Kontrolle jeder Zellprobe bestätigte, durch diese Form der PMN-

Probenvorbereitung beeinträchtigt. Die PMN-Proben wurden einer exakten Zellzählung unterworfen. Die Abweichungen bei zweimaliger Zellzählung lagen bei allen untersuchten Proben bei unter 5%. Weiterhin gelang es auch die Probenvorbereitungs- und Separationszeiten mit durchschnittlich 34 Minuten pro Probe sehr kurz zu halten. Keiner der Separationsschritte wurde bei Raumtemperatur oder sogar 37°C durchgeführt sondern ausschließlich bei einer Temperatur von 4°C. Weiterhin ist auch das gewählte PMN-Lyseverfahren vor der nachfolgenden Aufarbeitung von besonderer analytischer Bedeutung. Ziel dieser Arbeit war daher, im Gegensatz zu aufwändigen und chemischen Lyseverfahren die PMN-Lyse der gefrorenen Probe durchzuführen, um weitere Amino- und α -Ketosäureveränderungen und jede weitere Gefahr einer nicht kontrollierbaren chemischen Umwandlung oder Bindung während der Probenvorbereitung nahezu vollständig auszuschließen. Dies gelang durch eine -für die längerfristige Lagerfähigkeit der Proben in jedem Fall zwingend erforderliche- Tiefgefrierd Trocknung bei -80°C. Diese sogenannte Lyophilisierung ermöglicht eine zügige und komplette Lyse der bei -80°C transient gelagerten PMN. Dies ließ das Zusetzen möglicherweise sogar proteolytischer Reagenzien und einen Wiedererwärmungsschritt vermeiden, was gegebenenfalls eine neue Aktivierung der Zellen bedeutet hätte. Andere temperaturabhängige oder chemische Lyseverfahren (z.B. die Verwendung von aufeinanderfolgenden Gefrier- und Auftauschritten oder eine PMN-Zell-Lyse bei 100°C oder mittels HCl oder auch KOH) garantieren die insbesondere für die sehr reaktiven α -Ketosäuren zu fordernde Stabilität vor stoffwechselaktiver bzw. chemischer Umwandlung (Abbau, Umformung etc.). Auch die anschließende Probenlagerung der so lyophilisierten Proben vor der nachfolgenden HPLC-Analytik erfolgte, analog zu den Befunden von Fuchs et al.⁵⁹⁻⁶² und Mühling et al., bei -80°C^{133,135}.

4.1.2 Darstellung der interzellulären Amino- und α -Ketosäurekonzentrationen

Eine exakte Darstellung der intrazellulären Amino- und α -Ketosäurekonzentrationen auf Einzellzellniveau war ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit (eine ausführliche Methodikdiskussion findet sich in folgenden Publikationen: ^{45,47,51-53,59-62,116,128,133,135,166}). Hintergrund bildet hier die Tatsache, daß Untersucher anderer Arbeitsgruppen fast ausschließlich als Bezugsgröße der intrazellulären Amino- und α -Ketosäurekonzentrationen das parallel gemessene Intrazellulärwasser (ICW) oder die intrazellulären Protein- oder DNA-Gehalte wählten. Ein Hauptproblem dieser vielfältigen Darstellungsformen intrazellulärer Amino- und α -Ketosäurekonzentrationen ist zum einen die nicht mögliche Vergleichbarkeit der Ergebnisse, da auch zwischen den Arbeitsgruppen, die sich auf die gleiche Konzentration bezogen (z. B. ICW), keine Uniformität auch und v.a. in Bezug auf die verwendete HPLC-Methodik sowie auf Probenvorbereitung, Separation der Zellen und Lyse gegeben ist. Auf der anderen Seite sind hier auch pathophysiologische Mechanismen zu diskutieren, die den Bezug intrazellulärer Aminosäurekonzentration auf biologische Zellparameter als wenig sinnvoll erscheinen lassen. Speziell die Aminosäuredarstellung unter Zuhilfenahme des mittleren ICW-Gehaltes ist mit den Grundsätzen einer exakten Quantifizierungsmethodik nicht vereinbar. Neben banalen Veränderungen von Hydratationsgehalt und Volämie (Hypo- und Hypervolämie), osmotischem Druck und Osmolalität (v.a. der Natriumkonzentration) stehen bei vielen Erkrankungen oftmals auch komplexere pathophysiologische Variationen, die Elektrolyt und Volumenshift betreffend, im Vordergrund (hypotone Dehydratation oder gegenläufig Hyperhydratation bzw. hypertone Dehydratation oder gegenläufig Hyperhydratation). Diese können in seltenen Fällen sogar eindrucksvoll mit fulminanten Störungen des intrazellulären Volumens vieler Körperzellen einhergehen (z. B. Ödem, Exsikkose).

Zusätzliche methodische Einschränkungen und Unwägbarkeiten bei der Zellseparation (absolute intrazelluläre Volumenveränderungen während der PMN-Trennung sind nicht meß- und beobachtbar), die Einfluß auf den intrazellulären Wassergehalt von PMN nehmen können, schränken überdies die Exaktheit dieser Bezugsgröße enorm ein. Darüber hinaus fungieren einige der untersuchten Amino- und α -Ketosäuren, und hierbei vor allem Taurin, selbst als osmoregulatorisch aktive Substanzen. Ebenso kritisch muß hier auch der Konzentrationsbezug auf den intrazellulären Proteingehalt („intracellular protein mass“) gesehen werden, da medikamentöse Therapieverfahren und viele chronische, aber insbesondere intensivmedizinisch behandlungspflichtige Erkrankungen (Postaggressionsstoffwechsel im Rahmen schwerer Operationen, Verbrennungskrankheit, Sepsis, Leberzirrhose, Nephrotisches Syndrom etc.) mit schweren Veränderungen des Proteinstoffwechsels einhergehen, und hier zu signifikanten Verschiebungen des intrazellulären Proteingehalts führen können. Vor allem im Rahmen einer kontinuierlichen Verlaufsbeobachtung solch schwerer Erkrankungsformen könnten pathophysiologische Veränderungen des Wasserhaushaltes, des Proteinstoffwechsels, aber ebenso methodische Fehler im Rahmen der Probenvorbereitung zu gefährlichen Fehlinterpretationen der intrazellulären Konzentrationen führen. Einzig hinsichtlich der Bezugsgröße „DNA-Gehalt“ kann auch bei schweren Erkrankungen eine gewisse „Konzentrationsstabilität im Verlauf“ postuliert werden. Wie die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, kann der intrazelluläre Amino- und α -Ketosäuregehalt - und dies auch bei sehr unterschiedlichen Zellzahlen pro Blutprobe - bei sorgfältiger Anwendung der beschriebenen Methodik bis auf das Zellniveau selbst sehr genau bestimmt werden. Damit ist es möglich, auch eine zukünftige kontinuierliche Verlaufsbeobachtung analytisch exakter zu gestalten. Gleichzeitig entfällt die methodische Interpretation

und Diskussion potentieller krankheitsbedingter Veränderungen der gewählten Bezugsgröße.

4.1.3 PMN-Zell-Lagerung

Ein weiterer problematischer Punkt im Rahmen der Methodik ist die Gewährleistung einer stabilen Lagerung der Zellen, um eine Verfälschung der Meßergebnisse zu verhindern^{59-62,133,135}. Entsprechend früherer Ergebnissen ist wegen eines raschen Zerfalls wichtiger Amino- und α -Ketosäuren - neben einer unverzüglichen Aufarbeitung der PMN-Proben - eine sichere Lagerung aller Proben (natürlich inklusive der Standardproben) unerlässlich. Insbesondere die Säureamide Glutamin und Asparagin wie auch α -Ketosäuren sind in wässrigen Lösungen einer starken Hydrolyse unterworfen. Aber auch die Gefahr einer bakteriellen Kontamination muß so gering wie möglich gehalten werden. Wie Fuchs et al.⁵⁹⁻⁶² zeigen konnten ist hier auch ein Tiefgefrieren wässriger Proben auf -80°C für die langfristige Lagerfähigkeit (> 4 Wochen) nicht ausreichend. Allein die auch in dieser Untersuchung vorgenommene Lyophilisierung der Proben gewährleistet auch nach mehrmonatiger Lagerung (bei -80°C bis zu 6 Monate) - verglichen mit frischen biologischen Proben - exakte Konzentrationsbestimmungen ohne Quantitätsverluste. Darüber hinaus bietet die Lyophilisierung eine außerordentlich effektive Extraktion der Aminosäuren aus ihrer Probenmatrix, da das gewählte Extraktionsmittel (80% Methanol/20% H₂O) für die meisten Liganden ein optimales Lösungsmittel darstellt und die proteinische Liganden-Bindung besser als beispielsweise eine Liquid-Liquid-Extraktion löst. Weiterhin gewährleistet das 80%/20% Methanol-H₂O-Gemisch die kurzfristige Lagerfähigkeit (bis zu 80 Stunden), beinhaltet gleichzeitig den internen Standard und extrahiert aus biologischen Proben kein Protein. Dadurch entfällt der häufig empfohlene Deproteinisierungsschritt mit Sulpho-5-Salizylsäure (SSA). Fuchs et al.⁵⁹⁻

⁶² konnten weiterhin zeigen, daß die chemische Konservierung durch Methanol wirkungsvoller ist als die Abkühlung der Proben auf 4°C (sogenannte physikalische Konservierung). Ebenso wichtig ist eine matrixabhängige Kalibrierung, da in wässriger Lösung eingewogene Aminosäuren (z. B. im Handel erhältliche Aminosäurestandards) nicht den Bedingungen bei Aufbereitung biologischer Proben entsprechen, und so eine Gleichbehandlung von Standards nur mittels Kalibrierung aus einer Protein-Matrix sichergestellt werden kann^{59-62,133,135,158-160}. Allein schon die Einwaage von Aminosäuren in elektrolytfreie wässrige Lösungen reduziert die Extraktionsausbeute um bis zu 30%.

4.1.4 Wahl des Derivatisierungsreagenz für die Aminosäureanalytik

Im Rahmen der von uns gewählten Umkehrphasen-HPLC-Analytik (reversed-phase high-performance-liquid-chromatography) wählten wir nach den Ergebnissen von Fuchs et al.^{60,61} und Mühling et al.¹³³ OPA als Fluorophor und als Reagenz zur Derivatisierung. Bei Raumtemperatur wurden Isonidol-Derivate rasch und reproduzierbar gebildet. Die höchste Selektivität und Sensitivität durch das günstige Grössenverhältnis zwischen Aminosäurerest und Fluorphorteil und ein effizientes Kostenprofil stellen die dominanten Vorteile der OPA-Vorsäulen-Derivatisierung dar. Die resultierenden Derivate werden an Umkehrphasen getrennt und zeigen wegen der geringen Molekülgröße der Derivate beste Trennungseigenschaften; dies auch unter potentiell problematischen biologischen Matrices. Ferner zeigt das OPA-Reagenz keine im Chromatogramm störenden Eigenfluoreszenzen, sondern erst nach Einbau der Aminogruppe in die aromatische Gruppe des OPA-Moleküls beginnt das Reaktionsprodukt zu fluoreszieren. Verglichen mit dem häufig verwendeten

Nitrobenzooxadiazol (NBD) zeigt OPA deutlich verbesserte Trennungseigenschaften, und auch hinsichtlich der häufig empfohlenen Vorsäulenderivatisierung mittels 9-Fluorenyl-methyl-chloroformat (FMOC-Cl) besteht der Hauptvorteil darin, dass den Proben zur Entfernung stark fluoreszierender Nebenprodukte kein Pentan zugefügt werden muss. Darüber hinaus ist hier die Derivatisierung intrazellulärer Aminosäuren aufgrund geringer Pufferkapazitäten des Reaktionsansatzes überdies stark problembehaftet und daher nicht empfehlenswert. Eine hier häufig durchgeführte Derivatisierung mit Phenylisothiocyanat (PITC) bietet ebenso keine befriedigenden analytischen Alternativen. Nach zeitintensiver Probenvorbereitung unter Anwendung einer Vakuumzentrifugation zur Extraktion von überschüssigem PITC sind die Proben zwar mehrere Tage stabil zu lagern, jedoch ist die kontinuierliche Untersuchung verschiedener Proben nicht möglich, da alle HPLC-Säulen durch Restspuren des PITC-Reagenz bereits nach 20-30 Analysen methodisch nicht vertretbar geschädigt werden. Zudem wird mehr als die doppelte Probenmenge benötigt, um vergleichbare quantitative Nachweise zu erhalten. Vor allem aber schließen auftretende Interferenzen zwischen stark UV-absorbierenden Substanzen und den PITC-Aminosäurederivaten jeden zuverlässigen Einsatz dieser Methodik zur Analyse freier Aminosäuren in menschlichen Blut- oder Gewebezellen aus. Auch eine Derivatisierung mit 5-Dimethylamino-1-Naphtalin-Sulphonyl-Chlorid (DANSYL-Cl) bietet keine methodischen Vorteile. Zwar ist es mit DANSYL-Cl möglich, zusätzlich zu den primären Aminosäuren, Cystein sowie Cystin quantitativ nachzuweisen, doch zeigen die entstehenden Derivatisierungsprodukte - aufgrund der großen Molekülgröße der Reaktionsprodukte - eine deutlich schlechtere Trennbarkeit. Ferner muss die Derivatisierung des Reagenz bei Lichtausschluss stattfinden, da sonst eine Umsetzung mit reaktiven Aminosäureseitenketten nicht ausgeschlossen werden kann (z. B. mit der ϵ -Aminogruppe von Lysin, dem

Imidazolring von Histidin bzw. der Hydroxyl-Gruppe von Tyrosin). Darüber hinaus bietet die Derivatisierung mit DANSYL-Cl durch ein sogenanntes zeitliches „Shiften“ der Peaks keine Retentionszeitstabilität. Auch das Auftreten hoher „Stör-“ und „Reagenzienpeaks“, hervorgerufen durch DANSYL-Cl selbst, lässt sehr häufig eine sichere Auswertung und eine Basislinientrennung im Chromatogramm nicht zu. Der Nachteil einer geringeren Stabilität der OPA-Derivate im Vergleich zu anderen Derivatisierungsmethodiken kann hier zum Beispiel durch eine exakte zeitliche Standardisierung der Reaktion - insbesondere im Rahmen einer reproduzierbaren Automatisierung der Analytik - behoben werden.

4.1.5 Wahl des optimalen Laufpuffers

Zur optimalen Trennung des komplexen Aminosäurederivatgemisches ist ein optimaler Laufpuffergradient erforderlich. Nach den Ergebnissen von Fuchs et. al.⁵⁸⁻⁶¹ ist mit Methanol als organischer Phase, als Alternative des oft verwendeten Acetonitrils, eine optimale Gradientenelution intrazellulärer Aminosäuregemische möglich. Acetonitril weist, trotz nahezu identischer Polaritätindizes (Acetonitril: 3,2; Methanol: 2,6) bei geringerer Viskosität (Acetonitril: 0,37; Methanol: 0,6), nur eine begrenzte Stabilität auf, ist jedoch erheblich teurer und bereitet auch große Probleme bei der Entsorgung (Freisetzung von Blausäure). Methanol-Acetonitril-Puffer, aber ebenso Methanol-Phosphat-Puffer, gewährleisten - verglichen mit Methanol-Acetat-Puffer - keine gleichbleibenden Elutionseigenschaften und führen häufig zu Kristallbildung. Methanol-Acetat-Puffer weisen demgegenüber eine gute Löslichkeit auf. Die optimale Acetationenkonzentration liegt dabei nach den Ergebnissen von Farshidfar⁵⁰ bei 50 mMol. Höhere Acetationenkonzentrationen bewirken eine

Veränderung der Elutionszeit und damit eine deutlich verlängerte Analysendauer. In Verbindung mit den von uns verwendeten Trennsäulen - alternative Säulen weisen häufig schlechtere Trennungsergebnisse auf - kann die Selektivität hier noch gesteigert werden¹⁵⁸⁻¹⁶⁰.

4.2. Quantitative α -Ketosäurebestimmung

Die Anwendung einer quantitativen Analytik zur Untersuchung bedeutsamer intrazellulärer α -Ketosäuren in PMN stellt aufgrund der großen Instabilität sowie Polarität der zu untersuchenden α -Ketosäuren hohe Anforderungen an die erforderlichen analytischen Verfahren. Die in der vorliegenden Arbeit vorgestellten und präzise validierten Methodiken erlauben hier nach den Ergebnissen von Fuchs et al.^{59,61,62} und Mühling et al.^{133,135} eine exakte, reproduzierbare und insbesondere quantitativ auf das Einzelzellniveau im menschlichen PMN bezogene Analyse metabolisch relevanter α -Ketosäuren.

Die Trennung mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) an Umkehrphasen (reversed phase, RP-HPLC) beruht - wie oben beschrieben - auf der hydrophoben Wechselwirkung zwischen den funktionellen Gruppen der Probenmoleküle (hydrophob) und der unpolaren stationären Phase, die ebenfalls hydrophob ist^{59,61,62,76,133,135}. Zur Elution der Probenmoleküle werden mobile Phasen aus binären oder ternären Gemischen verwendet. Diese Gemische bestehen aus Wasser und schwachen, polaren Lösungsmitteln. Die stationären Phasen sind stark unpolar. Dies hat zur Folge, daß mittels isokratischer Elution polare Moleküle schneller eluiert werden als unpolare. Dementsprechend wird gerade die Trennung der α -Ketosäurederivate vom Verhältnis zwischen Größe der hydrophoben Seitenketten

und hydrophiler Gruppe der Derivate beeinflusst. α -Ketosäuren sind bekanntlich stark polare Stoffwechselprodukte. Aufgrund dieser hohen Polarität können effektive Trennungen von α -Ketosäuregemischen an Umkehr-Phase-Säulen nicht direkt durchgeführt werden, da die Wechselwirkungen mit der hydrophoben stationären Phase zu schwach sind. Um eine reproduzierbare und quantitative α -Ketosäureanalytik über ein RP-HPLC-System gewährleisten zu können, müssen die zu untersuchenden polaren α -Ketosäuren vor der unpolaren Trennung derivatisiert werden^{59-62,73,77,89}, so dass sie leichter an die stationäre Phase adsorbieren. Hierbei ist vor allem die Wahl des Derivatisierungsreagenz für die Sensitivität, Genauigkeit, Reproduzierbarkeit und Effizienz der Analytik von herausragender Bedeutung. Wie verschiedene Arbeitsgruppen zeigten, kann speziell die Anwendung von 2,4-Dinitrophenylhydrazin (DNP), mit großen analytischen Problemen behaftet sein und keine hinreichende Genauigkeit für eine quantitative intrazelluläre Analytik in PMN bieten. Ein bedeutendes Problem ist hier speziell die hohe Nachweisgrenze. Diese liegen nur im nMol-Bereich und damit um den Faktor 10^2 - 10^3 über der, für eine exakte intrazelluläre α -Ketosäureanalytik zwingend einzufordernde Nachweisgrenze^{59-62,158-160}.

Aufgrund der Annahme, dass freie intrazelluläre α -Ketosäuren in PMN - ähnlich wie in anderen Körperzellen - nur in sehr geringen Mengen vorliegen und daher an die erforderliche Analytik hohe Anforderungen gestellt werden müssen, wurde in der vorliegenden Arbeit eine RP-HPLC gestützte Trennung der zu untersuchenden α -Ketosäuren und o-Phenyldiamin (PDA) als Derivatisierungsreagenz verwendet.

Frühere Studien von Farshidfar⁵¹, Fuchs et al.⁵⁹⁻⁶², Hara et al.⁷³ und Riedel und Mitarbeitern^{159,160} konnten zeigen, dass mit o-Phenyldiamin als

Derivatisierungsreagenz sehr gute analytische Ergebnisse erzielt werden können. Für die chromatographische Trennung der aus der Derivatisierungsreaktion mit PDA entstehenden Chinoxalinol-Derivate an Umkehrphasen wurde in der vorliegenden Arbeit ein Elutionssystem verwendet, das die für eine exakte und quantitative intrazelluläre α -Ketosäureanalytik in PMN zu fordernde hohe Sensitivität und präzise Trennleistung gewährleistet. Wie aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit zu ersehen ist, gelingt durch die α -Ketosäurederivatisierung mittels PDA zu ihren mit hoher Intensität fluoreszierenden Chinoxalinol-Derivaten, eine sehr empfindliche und spezifische Erfassung der zu untersuchenden intrazellulären α -Ketosäuren in PMN. Die fluoreszierenden Chinoxalinol-Derivate können qualitativ und quantitativ sehr präzise erfaßt werden und zeigen ebenso auch keine störenden Stereoisomerieeffekte^{51,61,89,175}. Durch Anwendung einer stationären Phase mit geringer Körnung (z. B. 3,9 μm) bei hoher Belegung der Silicageloberfläche (z.B. C18-Silane) wird die Trennleistung der Säule noch erhöht. Dies gewährleistet bei erwünschter Verkürzung der Analysezeiten eine hohe Elutionsauflösung⁵⁹⁻⁶². Von besonderer Bedeutung bei der Wahl von PDA als Derivatisierungsreagenz ist ebenso das erforderliche Derivatisierungsreagenz-Probenmengen-Verhältnis. Nach den Untersuchungen von Woolf et al.¹⁹² und Kieber et al.⁹² muß die Herstellung der Chinoxalinol-Derivate - um eine maximale, schnelle und damit quantitative Umsetzung zu erzielen - mit einem hohen Überschuß an PDA (100-1000-fach) durchgeführt werden. Auch die Wahl der Derivatisierungszeit wie der Derivatisierungstemperatur ist nach den hier vorliegenden Ergebnissen konsequent einzuhalten. Eine optimale Derivatisierungsreaktion zeigte sich in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Farshidfar⁵¹ in Humanplasma bei Temperaturen von 80°C und Reaktionszeiten von 60 Minuten. Die Verwendung von PDA als Derivatisierungsreagenz birgt jedoch auch methodische Probleme: PDA ist extrem

licht- und oxidationsempfindlich, und mögliche fluoreszierende Nebenprodukte des oxidierten o-Phenylendiamin stören die Analytik aufgrund ähnlicher Retentionszeiten erheblich. Um diese unerwünschten Nebenreaktionen zu vermeiden, muß PDA vor der Anwendung deshalb umkristallisiert und sorgfältig gelagert werden (unter Stickstoff lichtgeschützt bei 2-8°C). Störende, fluoreszierende Reaktions- und Nebenprodukte werden zusätzlich durch 2-Mercaptoethanol im Reaktionsansatz abgefangen^{51,59-62,159,160}.

4.3 Bestimmung der Immunfunktionsparameter

In der vorliegenden Arbeit wurden parallel zur Bestimmung des intrazellulären Aminosäure- und α -Ketosäuregehaltes wichtige granulozytäre Immunfunktionsparameter bestimmt. Um eine direkte Vergleichbarkeit mit Befunden früherer Forschungstätigkeit gewährleisten zu können, wählten wir als Grundlage unserer Untersuchungen sehr gut etablierte und gängige Analytikverfahren. Die von uns verwendeten Methodiken zur Bestimmung der granulozytären Superoxidanion- und Wasserstoffperoxidbildung sowie die quantitative Bestimmung der von PMN freigesetzten Myeloperoxidaseaktivität vitaler PMN stellen Weiterentwicklungen der von Weening et al.¹⁸⁷, Stangel et al.¹⁷⁰, Pick und Keisari¹⁵¹, Schmitt et al.¹⁶⁶ sowie Krumholz und Mitarbeitern¹⁰²⁻¹⁰⁷ beschriebenen Analytikverfahren dar. Da eine Aktivierung von PMN aber auf vielfachen Wechselwirkungen mit Endothelzellen und Stimulantien in einem Entzündungsgebiet beruht haben Untersuchungen an isolierten Zellpopulationen, aber auch im Vollblut-Assay, allerdings nur modellhaften Charakter. Insbesondere durch das Fehlen der endothelialen Oberfläche sowie die Abwesenheit bedeutender weiterer pathophysiologischer Komponenten und

Faktoren die krankheitsbedingt in einem Entzündungsgebiet vorliegen, ist die Aussagekraft der untersuchten granulozytären Immunfunktionen daher begrenzt^{62,109,113,133,113,161,169,177,178,191,197,202}.

4.3.1 Bestimmung der Superoxidanionbildung

Die Bestimmung der Superoxidanionbildung beruhte auf der Reduktion von im Versuchsansatz befindlichem Cytochrom C durch das generierte Superoxidanion selbst. Die von einer definierten PMN-Konzentration extrazellulär freigesetzte Superoxidaniongesamtmenge kann, bei optimalem Verhältnis von PMN-Anzahl ($0,8 \times 10^6$ PMN/ml) und Cytochrom C in der Probe, hierbei reproduzierbar quantifiziert werden^{4,29-31,36,70,145,148,154-156,159,163,164,202}. Verglichen mit anderen Methoden (Nitroblau-Tetrazolium-Reduktion, Epinephrin-Oxidation, Lucigenin- bzw. Luminol-Chemilumineszenz, Guaiacol-Oxidation, Serum-PMN-Elastasebestimmung) erlaubt der photometrische Nachweis unter Verwendung von Cytochrom C eine zuverlässige quantitative Bestimmung der Superoxidanionbildung^{14,108,109,161,178}.

4.3.2 Bestimmung der Wasserstoffperoxidproduktion

Bei Wasserstoffperoxid handelt es sich um einen weiteren bedeutenden Immunparameter der PMN. Die Bestimmung des extrazellulär freigesetzten Wasserstoffperoxids erfolgt mittels Phenolrot. Sie beruht auf der durch Meerrettich-Peroxidase vermittelten Oxidation von Phenolrot durch Wasserstoffperoxid. Mit diesem etablierten Verfahren ist eine genaue und reproduzierbare photometrische

Beurteilung des von einer definierten PMN-Gesamtmenge extrazellulär generierten Wasserstoffperoxids möglich^{26,91,125,146,154,162}.

4.3.3 Bestimmung der Myeloperoxidaseaktivität

Auch bei der Bestimmung der extrazellulären Aktivität der von den PMN sezernierten Myeloperoxidase gewährleiten die von Schmitt et al.¹⁶⁶ sowie Krumholz und Mitarbeiter^{94,102-107} entwickelten Methodiken, verglichen mit anderen Verfahren (Di-anisidin-H₂O₂-Assay, Myeloperoxidase-katalysierte HOBr- und HOCL-Bildung, DM-PO-Elektronenspinresonanz, kolorimetrischer Nachweis mittels o-Phenyldiamin, Guaiacol-Oxidation zu Tetraguaiacol) befriedigende analytische Ergebnisse^{1,8}.

Nach Stimulation einer definierten Granulozytenzahl kann hierbei, wie die Ergebnisse früherer Untersuchungen und auch die eigenen Resultate zeigen, die extrazellulär sezernierte Myeloperoxidaseaktivität anhand der katalytischen Oxidation eines Chromogens (ABTS) reproduzierbar photometrisch bei 405 nm quantifiziert werden.

4.4. Einfluss von Pyruvat auf PMN

Die hier präsentierten Ergebnisse zeigen erstmalig, daß exogen zugeführtes Pyruvat, unter den in vitro Bedingungen einer Vollblutinkubation, in PMN zu einer signifikanten Zunahme des intrazellulären Pyruvatgehalts führt. Es scheint also, so unsere Hypothese aus den hier vorliegenden Ergebnissen, dass ein bedeutsamer Transport von exogen zugeführtem Pyruvat durch die Zellmembran von PMN stattfinden muss. Und in der Tat scheinen die besonderen metabolischen Eigenschaften der sogenannten Monocarboxylate, zu denen auch Pyruvat und Laktat gehört, auch von

ihrem raschen transmembranösen Transport abzuhängen. Hierdurch wird natürlich jede metabolische Kommunikation zwischen Zellen und Geweben nachvollziehbar erleichtert. Neben reinen passiven, energieunabhängigen Diffusionsprozessen sind hier, wie aktuelle Untersuchungen sehr gut zeigen konnten, spezielle Monocarboxylat-Transportsysteme (MCT) Katalysatoren dieses raschen zellulären In- oder Efflux^{18,93,99,114}. Die MCT's sind zum Beispiel in Leukozyten auf plasmaseitigen aber auch sub-zellulären Membranen lokalisiert (z.B. im Mitochondrium). Der Transport durch die Membranen geschieht entlang eines Konzentrationsgradienten, der durch Protonen oder die Konzentration MCT-abhängiger Metabolite gesteuert wird. Dies geschieht interessanterweise sogar weitestgehend energieunabhängig^{87,129}. Darüberhinaus wird allerdings auch die Existenz eines nahezu pyruvatspezifischen Diffusionstransporters vermutet. Dieses Transportsystem, das zum Beispiel schon in der Plasmamembran von *Trypanosoma brucei* - und hier bei der sogenannten „bloodstream form“ - identifiziert worden ist, unterscheidet sich von den anderen bisher bekannten MCT, die in der mitochondrialen und/oder plasmatischen Membran eukaryotischer Zellen anwesend sind, durch ihre hohe Selektivität für Pyruvat, aber ebenso auch durch die Tatsache kein L-Laktat zu transportieren^{46,71,153,189}. Interessanterweise können einige wichtige Pharmaka diese Pyruvat-Transportmechanismen, oder gar den Abbau von Pyruvat auf zellulärer Ebene, beeinflussen. Beispielsweise beschrieben Aires et al., dass die mitochondriale Pyruvataufnahme durch Valproinsäure, einem Antikonvulsivum, signifikant verhindert werden kann⁵. Aber auch andere therapeutisch durchaus gebräuchliche Psychopharmaka, interessanterweise sogar auch schon in klinisch äquivalenten und relevanten Dosierungen (z.B. Chlorpromazin, Thioridazin, Fluphenazin, Thiothixen, etc.), können den Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex (PDHC) unterschiedlich stark beeinflussen oder sogar vollständig inhibieren^{7,24,198}.

Die hier vorliegenden ersten grundlegenden Ergebnisse hinsichtlich eines möglichen immunonutritiven Einfluss von Pyruvat auf PMN können diese Fragen allerdings noch nicht abschließend beantworten. Der Grund hierfür ist die Tatsache, dass an dieser Stelle noch nicht abschließend untersucht wurde, ob die beobachteten Effekte das Resultat einer primären intrazellulären Metabolisierung nach Aufnahme von Pyruvat durch PMN waren, oder es sich „nur“ um eine sekundäre Akkumulation von aus Pyruvat von anderen Blutzellen gebildeten Substraten handelt. Durch den von uns gewählten Versuchsansatz der Vollblutinkubation wären hier sogar das gleichzeitige Vorhandensein beider Mechanismen möglich. Betrachtet man die vorliegenden Befunde allerdings etwas detaillierter zeigt sich, dass neben der intrazellulären Pyruvaterhöhung insbesondere die Konzentrationen von α -Ketoglutarat, Glutamin, Glutamat, Asparagin, Aspartat, Alanin, Arginin, Ornithin aber ebenso auch von Glycin und Serin signifikant dosis- wie expositionszeitabhängig verändert waren. Wie wir auch an anderer Stelle dieser Diskussion noch weiter ausführen werden ist daher unsere Arbeitshypothese, dass primär der Anstieg der freien Pyruvatkonzentration im PMN und die nachfolgende intragranulozytäre Pyruvatmetabolisierung in wichtige Aminosäuren und α -Ketosäuren für die von uns beobachteten Ergebnisse verantwortlich zeichnet^{32-35,59,61,134,136-141}. Nichtsdestotrotz kann man an dieser Stelle als wichtiges Zwischenergebnis festhalten, dass extern im Vollblut zugeführtes Pyruvat bei PMN signifikante immunonutritive Effekte auf die hier untersuchten Amino- und α -Ketosäurekonzentrationen sowie ebenso auf essentielle Immunfunktionen zu induzieren vermag^{3,123,131,142-144,167,168,179,190}.

Und tatsächlich konnten hier frühere Untersuchungen an PMN oder anderen leukozytären Zellen schon sehr deutlich zeigen, daß auch andere exogen als Nutritivum zugeführte Aminosäuren (z.B. Ornithin oder Arginin) oder α -Ketosäuren

(z.B. α -Ketoglutarat) sowie ebenso Dipeptide (z.B. L-Alanyl-L-Glutamin) durchaus signifikante immunonutritive Effekte auslösen können. Interessant war, dass sich die Mechanismen der Verstoffwechslung hier sehr ähnelten: nach Aufnahme in die Zellen via passiver Konzentrationsgradient-abhängiger Diffusion oder aktivem Transport erfolgte die weitere intrazelluläre Verstoffwechslung. Bei Di- oder Oligopeptiden wird allerdings die Peptidbindung noch im Blutstrom selbst gespalten und erst danach erfolgt die Aufnahme der jeweiligen Einzelaminosäuren. Aufgrund dieser Vorbefunde ist auch hier unsere Arbeitshypothese, dass Pyruvat als Vorstufe aufgenommen rasch einer nachfolgenden intragranulozytären Metabolisierung zugeführt wird.

Betrachtet man die intrazelluläre Pyruvatverstoffwechslung genauer wird schnell deutlich, dass Pyruvat eine wirklich zentrale Rolle für Funktion und Aktivität von Leukozyten und damit auch in PMN spielt. Einer der wichtigsten biochemischen Prozesse an denen Pyruvat direkt beteiligt ist stellt hier zum Beispiel seine oxidative Degradation dar, katalysiert durch den Pyruvat-Dehydrogenase-Multienzymkomplex (PDH), einem essentiellen Bestandteil der aeroben Atmung. Die hierdurch katalysierte oxidative Decarboxylierung von Pyruvat zu Acetyl-CoA, unter Bildung von je einem Molekül NADH und CO₂, findet weit außerhalb eines Equilibriums statt und ist ein wichtiges Verbindungsglied der Stoffwechselwege der Glykolyse und des Citrat-Zyklus. Die aus den nachfolgenden Reaktionen entstehenden Produkte werden dann entweder als Substrat für die oxidative Phosphorylierung - also als „Brennstoff für die Atmungskette“ benötigt - oder sind Präkursoren vieler wichtiger zellulärer Zwischenprodukte oder Stoffwechselwege (z.B. im Rahmen des Harnstoffzyklus: in Form von aus Oxalacetat gebildetem Aspartat, Fettsäuresynthese, der Isoprenoid-Biosynthese, etc.)^{3,11,12,16,142-144,191}. Tatsächlich

hat ein Fehlen dieses Enzymkomplexes ernsthafte Implikationen für die betroffenen Patienten. Beispielsweise führt eine Malfunktion des Zitronensäurezyklus aufgrund einer PDH-Defizienz zu einem Energiedefizit und damit zu einem abnormal hohen Laktatspiegel mit Laktatazidose im Neugeborenen. Die hiervon betroffenen Kinder leiden zum Beispiel unter schwerer Lethargie, schlechter Nahrungsaufnahme, Tachypnoe und anderen schwerwiegenden Symptomen, die nicht selten auch rasch zum Tode führen können^{32-35,68,149,172,173,184}. Im Falle der neutrophilen Granulozyten scheint weiterhin auch die reversible Transamination von Pyruvat durch die Alanin-Aminotransferase, auch bekannt als Glutamat-Pyruvat-Transaminase GPT, von besonderer Bedeutung für ihre Rolle in der Immunabwehr des gesamten Organismus zu sein. In diesem Fall werden Aminogruppen von Glutamat zum Pyruvat transferiert und produzieren dabei Alanin und α -Ketoglutarat, welche selbst direkt in den Zitronensäurezyklus eingebracht werden können, um danach durch den α -Ketoglutarat-Dehydrogenase-Komplex oxidativ weiter zu Succinyl-CoA decarboxyliert zu werden^{54-58,174,190}. Eine weitere mögliche metabolische Umwandlung von Pyruvat ergibt sich auch durch die nachgewiesene intragranulozytäre Aktivität von Pyruvat-Carboxylase. Dieses Enzym katalysiert die irreversible anaplerotische Carboxylierung von Pyruvat und produziert so Oxalacetat-Präkursoren, auch hier für die nachfolgende Verstoffwechslung im Zitronensäurezyklus. Oxalacetat ist allerdings auch - nach Konversion zu Phosphoenolpyruvat - ein wichtiges Ausgangssubstrat der Glukoneogenese, deren signifikante Aktivität zum Beispiel durch Nachweis des Schlüsselenzyms der Fructose-1,6-Bisphosphatase auch in PMN bewiesen werden konnte^{3,52,53,54-58,122,171}. Darüberhinaus scheint Pyruvat auch der Startpunkt für die de-novo-Synthese von Alanin, Serin und Glycin zu sein. Die hierfür notwendigen Enzyme, vor allem die NADPH-bildenden Stoffwechselwege,

sind - wie andere Arbeitsgruppen eindrucksvoll zeigen konnten - nachgewiesenermaßen in PMN aktiv^{3,32-35,134,136,137,138,142-144,168}.

Bezugnehmend auf die hier vorgestellten Ergebnisse wie auch vor dem Hintergrund der in der Literatur bisher verfügbaren Daten muss daher davon ausgegangen werden, dass Pyruvat als Ausgangssubstrat von zum Beispiel Glutamat, Glutamin, α -Ketoglutarat, Alanin, Asparagin, Aspartat, Arginin, Ornithin, Serin oder auch Glycin eine fundamentale Bedeutung bei der Wiederherstellung von zum Beispiel im Rahmen chronischer Entzündungserkrankungen pathophysiologisch aufgebrauchter oder veränderter Amino- und α -Ketosäure-Speicher besitzt. Pyruvat besitzt also durchaus eine Funktion als intrazelluläres „Schlüssel- oder Signalsubstrat“ mit der Möglichkeit der weitreichenden direkten wie indirekten Einflussnahme auf die Immunmodulation und Funktionalität leukozytärer Zellen (z.B. durch indirekte Regulierung des Arginin-, Ornithin- oder Aspartatmetabolismus die via Oxalacetat als Substrate für die Enzyme des Harnstoffzyklus oder zur Bildung von Phosphoserin und Serin dienen können, durch indirekte Bereitstellung des für eine PMN Aktivierung essentiell erforderlichen NO•, durch die Bildung von Glutamin, Glutamat oder α -Ketoglutarat die der Glutathion-, Prolin-, Purin-, Pyrimidin-, Glucosamin-, NADH-Synthese zugeführt werden können oder letztendlich auch durch die Ausfuhr von Glutamat im Austausch für den Import von Cystin mit der Möglichkeit der intrazellulären Konversion zu Cystein)^{3,32-35,134,136-144,168,194,195}.

Die Umwandlung von Pyruvat liefert aber nicht nur wichtige Präkursoren der oben angeführten Stoffwechselwege sondern insbesondere auch energiereiche Moleküle wie z.B. Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (NADPH) oder Guanosin-5'-Triphosphat (GTP). NADPH kann hier beispielsweise nicht nur aus der Umwandlung von Pyruvat durch die Pyruvatdehydrogenase gebildet werden, sondern ebenso auch

durch katalytische Aktivitäten von Enzymen des TCA-Zyklus wie der Isocitrat- α -Ketoglutarat- und Malat Dehydrogenase^{11,16,23,141}. Darüberhinaus katalysiert die Succinyl-CoA Synthetase einen weiteren wichtigen Schritt im TCA-Zyklus: die spiegelabhängige Phosphorylierung von Guanosin-5'-Diphosphat zu GTP. GTP agiert als wichtige Energiequelle oder als Aktivator von Substraten in Stoffwechselreaktionen (z.B. Proteinbiosynthese) ähnlich wie ATP, aber weitaus spezifischer. In der Tat konnte schon sehr früh durch Hyslop et al. gezeigt werden, dass während einer chemotaktischen Peptidstimulation in Homogenaten in PMN eine hohe GTPase-Aktivität vorhanden ist⁸³. Darüberhinaus beschrieben Woodman et al. (1988) eine relevante Rolle von Pyruvat im Rahmen der de novo Proteinsynthese, die dem Erhalt und der Augmentation des chemotaktisch-peptid-induzierten „respiratory burst“ (mit Bildung von O_2^-) in PMN dient¹⁹². Eine tiefere Analyse der granulozytären Immunfunktion zeigt, dass nicht nur GTPase sondern auch vor allem das immunfunktionelle Enzym NADPH-Oxidase (NADPH-O), welches in der Plasmamembran, aber auch an der Phago(lyso)som-Membran gefunden werden kann, eine massgebliche Rolle in der menschlichen Immunregulation spielt^{88,95,97}. Schon 1933 entdeckten Baldrige und Gerhard den interessanten Effekt, dass bei Stimulation (z.B. der Phagozytose) der Sauerstoffverbrauch von Granulozyten auf den 50- bis 100-fachen Wert ansteigt. Wie nachfolgende Untersuchungen zeigten dient hier die stark erhöhte Sauerstoffkonsumption der Produktion verschiedener teilweise noch viel aggressiverer Sauerstoffspezies. Unter der Vermittlung der NADPH-Oxidase wird aus Sauerstoff und NADPH, unter Transfer von Elektronen nach intrazellulär das Superoxidanion O_2^- erzeugt^{134,135-141,144}. Das hochreaktive Hyperoxidanion selbst ist dabei das Ausgangsprodukt für die Synthese eine Reihe weiterer reaktiver Sauerstoffspezies. Beispielsweise entsteht durch eine von der Superoxid-Dismutase katalysierte Disproportionierung das deutlich stabilere

Wasserstoffperoxid (H_2O_2). Das Wasserstoffperoxid kann als neutrales, wasserähnliches Molekül sehr leicht in Zellen eindringen. Bei der katalytischen Zersetzung des Wasserstoffperoxids entsteht allerdings auch das hochreaktive Hydroxyl-Radikal (OH^\cdot), welches eine Vielzahl von Molekülen attackieren und funktionsunfähig machen kann^{142-144,194,195,199,200}. Aber auch O_2^\cdot selbst ist ein gefährlicher Gegner für pathogene Keime und Moleküle. Bekannt ist, dass O_2^\cdot Bakterien und Pilze direkt über bisher noch nicht vollständig verstandene Mechanismen vernichten kann. Darüberhinaus ist es ebenfalls in der Lage kritische Stoffwechsellenzyme zu inaktivieren, die Lipid-Peroxidation zu aktivieren, oder auch redox-aktives Eisen freisetzen zu können, was die Bildung von unspezifischen weiteren Oxidantien wie zum Beispiel Hydroxylradikalen fördert. Vielfach gesichert ist, dass O_2^\cdot direkt Bakterien tötet, da die Virulenz vieler Pathogene dramatisch abnimmt, sobald deren Superoxid-Dismutase-(SOD)-Gene ausgeschaltet werden^{48,49,134,136-141,194,195}. Sicherlich auch gestützt durch diese Befunde muss man postulieren, dass O_2^\cdot in PMN tatsächlich eine Schlüsselrollenfunktion als Antioxidans besitzt. Aber auch seine Rolle als Ausgangspunkt weiterer, teilweise noch gefährlicherer Substrate und Radikale darf an dieser Stelle nicht unterschätzt werden. Zu diesen zählen hier nicht nur die schon erwähnten (H_2O_2 , OH^\cdot) sondern auch die hypochlorige Säure HOCL gegen die sich PMN sogar durch Umwandlung zum Zwecke der Aktivitätsverminderung selbst schützen müssen (z.B. mittels Taurin durch Bildung von Taurinchloramin). Während des oxidativen Burst wird im Neutrophilen HOCl durch die mittels Myeloperoxidase (MPO)-vermittelter Peroxidation von Chlorid Ionen aus H_2O_2 gebildet. Tatsächlich beschreiben einige Autoren, dass HOCl an der Zerstörung von Bakterien durch die Inhibition wichtiger Stoffwechselwege teilnimmt: beispielsweise durch Reduktion und Aufhebung der Glukose-Oxidation oder durch Reaktion mit einer weiten Reihe von Biomolekülen

(Depletion von Adenin-Nukleotiden, ATP Hydrolyse, etc.), oder sogar durch direkten Angriff auf die DNA und RNA (z.B. durch die Replikationsinhibition)⁹⁶. Weitere Moleküle, die durch HOCl angegriffen werden können sind zum Beispiel auch Fettsäuren (z.B. durch Lipidhydrolyse, die die Membranpermeabilität beeinflusst, Cholesterol (durch die Bildung von toxischen Chlorhydrinen), aber ebenso durch post-translationale Modifikation von Proteinen (beispielsweise in der Proteinentfaltung und Aggregation)^{27,28,37,81,84,194,195}. Aber eingedenk der „guten“ oder „gewünschten“ bakteriziden Wirkungen von Chlorin-Lösungen, die durch HOCl oder auch durch die anderen bei Stimulation von PMN entstehenden toxischen Substanzen ausgelöst werden, muss man immer auch in Betracht ziehen, dass die Diapedese immunonutritional verbesserter Neutrophiler (beispielsweise nach Pyruvat-Exposition) in inflammatorisch geschädigte extravaskuläre Strukturen auch paradoxerweise sehr ernsthaften Schaden in allen Zellen oder Geweben der Entzündungsregion anrichten kann. Dies geht selbstverständlich mit dem möglichen Risiko einher, dass dabei der Verlauf der Erkrankung sogar verschärft werden kann. Interessanterweise zeigen neueste Untersuchungen hier allerdings ebenfalls, dass Pyruvat sogar selbst antioxidative und antiinflammatorische Wirkung entfalten kann, zum Beispiel durch eine aktive Scavenger-Funktion für hochreaktive Sauerstoffspezies^{2,6,13,48,49,94, 124-127,134-141}.

Insgesamt scheint es aber - Bezug nehmend auf unsere eigenen Ergebnisse und die benefiziellen immunonutritionellen Effekte, die andere Arbeitsgruppen gezeigt haben - klar zu sein, dass Pyruvat ein immunonutritional sehr potentes Molekül ist. Es spielt eine bedeutende Rolle in der Regulation des dynamischen α -Keto- und Aminosäurepools ebenso wie in der Modulation der PMN-vermittelten Abwehrreaktion und Immunoregulation. Unglücklicherweise müssen vor

weiterführenden Denkschritten zur *in vivo* Beleuchtung einer möglichen immunonutritionalen Bedeutung von Pyruvat erst wichtige galenische Probleme diskutiert werden, die hauptsächlich in seiner Instabilität in wässriger Lösung begründet liegen. Aus diesem Grund scheinen aktuelle Untersuchungsergebnisse, die sich auf Ethylpyruvat (EP), einen simplen aliphatischen Ester des Pyruvat beziehen sehr vielversprechend zu sein^{54-57,201,203}. Es konnte gezeigt werden, dass die Anwendung von EP in klinisch relevanter Dosierung sicher ist. Eine Behandlung mit EP scheint das Überleben positiv zu beeinflussen und/oder Organdysfunktionen zu ameliorieren. Dies konnte in einer Vielzahl klinischer Modelle kritischer Erkrankungen gezeigt werden, ebenso wie die positive Wirkung von EP bei gestörter zellulärer Funktion *in vitro*^{19,25,55,56,69,117,176,186,196,198,203}. Beispielsweise hat EP anti-inflammatorische Wirkung, es unterdrückt die bakterielle Translokation oder die Hyperpermeabilität bei Endotoxämie und scheint ebenso einen Benefit in Sepsismodellen oder septischem Schock zu entfalten, indem es die Bildung des Tumornekrosefaktor α (TNF α) reduziert, die Expression von Interleukin-6-mRNA in verschiedenen Geweben verhindert, oder die Enzymaktivität von Cyclooxygenase 2 oder der induzierbaren Nitric-Oxid-Synthetase reduziert^{38-40,43,44,79,80,119,172-174,181,196,203}. Weitere interessante antiinflammatorischen Effekte entstehen hier, wie erst vor Kurzem gezeigt werden konnte, durch signifikante Modifikation der im Blut zirkulierenden Signalwege weiterer bedeutender inflammationsvermittelnder Moleküle und Enzyme (z.B. high-mobility group box-1, NF- κ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer von aktivierten B-Zellen))^{57,72,85,127,173,182,188,203}.

Zusammenfassend kann man an dieser Stelle daher folgendes postulieren: auch wenn die ersten wissenschaftlichen Erfolge hinsichtlich einer Rolle von Pyruvat (zum Beispiel in Form von EP appliziert) im Rahmen einer Immunnutrition sehr

vielversprechend erscheinen mögen, werden noch weitere Untersuchungen und Studien erforderlich sein, um den wirklichen klinischen Wert dieser α -Ketosäure, zum Beispiel im Rahmen einer Therapieoption bei schwerstkranken Patienten, rechtfertigen zu können.

5 Zusammenfassung

5.1 Zusammenfassung und Ausblick

Polymorphkernige neutrophile Granulozyten (PMN) stellen, aufgrund ihrer Funktionalität und ihrer hohen Zellumsatzrate, eine sehr wichtige Säule der zellulären, unspezifischen Immunabwehr des Menschen dar. Sie sind in der Lage pathogene Keime mittels Phagozytose in das Zellinnere aufzunehmen. Im Rahmen des „oxidative burst“ produzieren die PMN zytotoxische Sauerstoffmetabolite, welche die opsonierten Fremdstoffe zerstören. Zur Erfüllung ihrer vielseitigen Aufgaben ist die intrazelluläre Amino- und α -Ketosäurehomöostase von entscheidender Bedeutung für die PMN.

In der vorliegenden Arbeit wurde die pathophysiologische Bedeutung von Pyruvat für die PMN untersucht. Nach Inkubation von Pyruvat in menschlichem Vollblut wurden im Anschluss die PMN aus dem Blut isoliert und die freien intrazellulären Amino- und α -Ketosäuren mittels Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie (HPLC) quantitativ analysiert. Parallel wurden wichtige granulozytäre Immunfunktionen wie die Produktion von Wasserstoffperoxid und Superoxidanion sowie die Aktivität der sezernierten Myeloperoxidase untersucht.

Pyruvat induzierte eine sehr deutliche Konzentrationszunahme vor allem der Aminosäuren Glutamat, Glutamin und Alanin. Außerdem wurde eine starke Erhöhung der intrazellulären Konzentration der α -Ketosäuren α -Ketoglutarat und Pyruvat festgestellt. Diese Aminosäuren stellen wichtige Substrate in entscheidenden Stoffwechselwegen der PMN dar. Sie sind beteiligt an der Produktion von Zytokinen und zytotoxischen Sauerstoffmetaboliten, dienen als Bausteine für die DNA-, RNA-, Protein- und Lipidsynthese und liefern wichtige Substrate für die Energiebereitstellung. Weiterhin ließ sich nach der Inkubation mit Pyruvat eine deutliche Zunahme der Aktivität

der Immunfunktionsparameter feststellen. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass man durch die Gabe von Pyruvat die immunologische Funktion der PMN positiv beeinflussen kann.

Bei unterschiedlichen schweren Krankheitsbildern (z.B. Sepsis, massive Traumen, große operative Eingriffen) könnte eine Supplementation von Pyruvat im Rahmen einer immunonutritiven Therapie möglicherweise nicht korrigierbare Ernährungsdefizite ausgleichen und so positive klinische Effekte zeigen. Dazu zählen zum Beispiel kürzere Liege- und Respiratorzeiten, verminderte Mortalität, reduzierte Therapiekosten aber auch eine verbesserte Stickstoffbilanz und geringere Infektionsraten.

Weitere Forschung wird hier allerdings notwendig sein, um diese vielversprechenden in vitro Ergebnisse auch im klinischen Setting zu reproduzieren.

5.2 Summary

For the first time the immunonutritional role of pyruvate on neutrophils (PMN), free α -keto and amino-acid profiles, important reactive oxygen species (ROS) produced [superoxide anion (O_2^-), hydrogen peroxide (H_2O_2)] as well as released myeloperoxidase (MPO) activity has been investigated. Exogenous pyruvate significantly increased PMN pyruvate, α -ketoglutarate, asparagine, glutamine, asparatate, glutamate, arginine, citrulline, alanine, glycine and serine in a dose as well as duration of exposure dependent manner. Moreover, increases in O_2^- -formation, H_2O_2 -generation and MPO activity in parallel with intracellular pyruvate changes have also been detected. Regarding the interesting findings presented here we believe, that pyruvate fulfils considerably the criteria for a potent immunonutritional molecule in the regulation of the PMN dynamic α -keto and amino acid pools. Moreover it also plays an important role in parallel modulation of the granulocyte-dependent innate immune regulation. Although further research is necessary to clarify pyruvate's sole therapeutic role in critically ill patients' immunonutrition, the first scientific successes seem to be very assuring.

The results presented here seem to be very promising concerning the treatment of severe diseases (i.e. sepsis syndrome, polytrauma, etc.) because any deleterious changes in leukocyte function as the result of metabolic dysfunction can aggravate pathophysiological changes. Future therapeutically supplementation of specific amino or keto acids may induce possible positive effects. Future scientific research is needed to prove our thesis.

6 Literaturverzeichnis

- 1) Abramson SB, Amin AR, Clancy RM, Attur M (2001) The Role of nitric oxide in tissue destruction. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 15 (5): 831-45
- 2) Abumrad NN, Morse EL, Williams PE, Adibi SA (1989) Possible sources of glutamine for parenteral nutrition: impact on glutamine metabolism. *Am J Physiol* 257 (2): E228-34
- 3) Agam G, Gutman A (1972) Synthesis of glycogen in leucocytes from various precursors. *Rev Eur Etud Clin Biol* 17: 650-656
- 4) Aiboshi J, Moore EE, Ciesla DJ, Silliman CC (2001) Blood transfusion and the two-insult model of post-injury multiple organ failure. *Shock* 15 (4): 302-306
- 5) Aires CC, Soveral G, Luis PB (2008) Pyruvate uptake is inhibited by valproic acid and metabolites in mitochondrial membranes. *FEBS Lett* 582: 3359-3366
- 6) Andrews FJ, Griffiths RD (2002) Glutamine: essential for immune nutrition in the critically ill. *Br J Nutr* 87 (1): S3-S8
- 7) Bakowski D, Parekh AB (2007) Regulation of store-operated calcium channels by the intermediary metabolite pyruvic acid. *Curr Biol* 17: 1076-1081
- 8) Barr DP, Aust SD (1993) On the mechanism of peroxidase-catalyzed oxygen production. *Arch Biochem Biophys.* 303 (2): 377-82
- 9) Berger M, O'Shea J, Cross AS, Folks TM, Chused TM, Brown EJ (1984) Human neutrophils increase expression of C3bi as well as C3b receptors upon activation. *J Clin Invest* 74: 1566-1571
- 10) Berzelius JJ (1835) Über die Destillationsprodukte der Traubensäure. *Annalen der Physik und Chemie* 36 (9): 1-29
- 11) Board M, Humm S, Newsholme EA (1990) Maximum activities of key enzymes of glycolysis, glutaminolysis, pentose phosphate pathway and tricarboxylic acid cycle in normal, neoplastic and suppressed cells. *Biochem J* 265: 503-509
- 12) Board M, Newsholme E (1996) Hydroxycitrate causes altered pyruvate metabolism by tumorigenic cells. *Biochem Mol Biol Int* 40:1047-1056
- 13) Boelens PG, Nijveldt RJ, Houdijk AP, Meijer S, van Leeuwen PA. (2001) Glutamine alimentation in catabolic state. *J Nutr* 131(9): 2569-77
- 14) Britigan BE, Cohen MS, Rosen GM (1987) Detection of the production of oxygen-centered free radicals by human neutrophils using spin trapping techniques: a critical perspective. *J Leukoc Biol* 41 (4): 349-362
- 15) Brivet M, Garcia-Cazorla A, Lyonnet S (2003) Impaired mitochondrial pyruvate importation in a patient and a fetus at risk. *Mol Genet Metab* 78: 186-192
- 16) Brown AC, Macrae HS, Turner NS (2004) Tricarboxylic-acid-cycle intermediates and cycle endurance capacity. *Int J Sport Nutr Exerc Metab* 14: 720-729
- 17) Burchert D (2011): Der Einfluß von Taurin und β -Alanin auf die Pools primärer Amino- und α -Ketosäuren sowie ausgewählte Immunfunktionen in menschlichen polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten. Inauguraldissertation.
http://geb.uni-giessen.de/geb/volltexte/2011/8044/pdf/BurchertDiana_2011_01_14.pdf

- 18) Burckhardt BC, Burckhardt G (2003) Transport of organic anions across the basolateral membrane of proximal tubule cells. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 146: 95-158
- 19) Cai B, Brunner M, Wang H, et al. (2009) Ethyl pyruvate improves survival in awake hemorrhage. *J Mol Med* 87: 423-433
- 20) Canepa A, Filho JC, Gutierrez A, Carrea A, Forsberg AM, Nilsson E, Verrina E, Perfumo F, Bergström J (2002) Free amino acids in plasma, red blood cells, polymorphonuclear leukocytes, and muscle in normal and uraemic children. *Nephrol Dial Transplant* 17 (3): 413-21
- 21) Carlos TM, Harlan JM (1994) Leukocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood* 84 (7): 2068-101
- 22) Castell L, Vance C, Abbott R, Marquez J, Eggleton P (2004) Granule Localization of Glutaminase in Human Neutrophils and the Consequence of Glutamine Utilization for Neutrophil Activity. *J Biol Chem* 279 (14): 13305-10
- 23) Chang YH (1977) Studies on phagocytosis--III. Tricarboxylic acid cycle and the cytochrome system as energy sources for phagocytosis in rabbit peritoneal exudate polymorphonuclear leukocytes. *Biochem Pharmacol* 26: 1489-1493
- 24) Chen XZ, Shayakul C, Berger UV (1998) Characterization of a rat Na⁺-dicarboxylate cotransporter. *J Biol Chem* 273: 20972-20981
- 25) Cheng BQ, Liu CT, Li WJ (2007) Ethyl pyruvate improves survival and ameliorates distant organ injury in rats with severe acute pancreatitis. *Pancreas* 35: 256-261
- 26) Chen TP, Roberts RL, Wu KG, Ank BJ, Stiehm ER (1993) Decreased superoxide anion and hydrogen peroxide production by neutrophils and monocytes in human immunodeficiency virus-infected children and adults. *Pediatr Res* 34 (4): 544-550
- 27) Cicalese L, Lee K, Schraut W (1996a) Pyruvate prevents ischemia-reperfusion mucosal injury of rat small intestine. *Am J Surg* 171: 97-100
- 28) Cicalese L, Rastellini C, Rao AS (1996b) Pyruvate prevents mucosal reperfusion injury, oxygen free-radical production, and neutrophil infiltration after rat small bowel preservation and transplantation. *Transplant Proc* 28: 2611-2615
- 29) Ciesla DJ, Moore EE, Zallen G, Biffi WL, Silliman CC (2000a) Hypertonic saline attenuation of polymorphonuclear neutrophil cytotoxicity: timing is everything. *J Trauma* 48 (3): 388-395
- 30) Ciesla DJ, Moore EE, Gonzalez RJ, Biffi WL, Silliman CC (2000b) Hypertonic saline inhibits neutrophil (PMN) priming via attenuation of p38 MAPK signaling. *Shock* 14 (3): 265-269
- 31) Ciesla DJ, Moore EE, Musters RJ, Biffi WL, Silliman CA (2001) Hypertonic saline alteration of the PMN cytoskeleton: implications for signal transduction and the cytotoxic response. *J Trauma* 50 (2): 206-212
- 32) Curi R, Newsholme P, Newsholme EA (1988) Metabolism of pyruvate by isolated rat mesenteric lymphocytes, lymphocyte mitochondria and isolated mouse macrophages. *Biochem J* 250: 383-388
- 33) Curi R, Williams JF, Newsholme EA (1989) Pyruvate metabolism by lymphocytes: evidence for an additional ketogenic tissue. *Biochem Int* 19: 755-767
- 34) Curi TC, De Melo MP, De Azevedo RB, Zorn TM, Curi R (1997) Glutamine utilization by rat neutrophils: presence of phosphate-dependent glutaminase. *Am J Physiol* 273 (4): C1124-C1129
- 35) Curi R, Newsholme P, Pithon-Curi TC, Pires-de-Melo M, Garcia C, Homem-de-Bittencourt Júnior PI, Guimarães AR (1999) Metabolic fate of glutamine in lymphocytes, macrophages and neutrophils. *Braz J Med Biol Res* 32 (1): 15-21

- 36) Daher AH, Fortenberry JD, Owens ML, Brown LA (1997) Effects of exogenous nitric oxide on neutrophil oxidative function and viability. *Am J Respir Cell Mol Biol* 16 (4): 407-412
- 37) Dahlgren C, Karlsson A (1999) Respiratory burst in human neutrophils. *J Immunol Methods* 232: 3-14
- 38) Das UN (2006a) Is pyruvate an endogenous anti-inflammatory molecule? *Nutrition* 22: 965-972
- 39) Das UN (2006b) Pyruvate is an endogenous anti-inflammatory and anti-oxidant molecule. *Med Sci Monit* 12: 79-84
- 40) Dave SH, Tilstra JS, Matsuoka K (2009) Ethyl pyruvate decreases HMGB1 release and ameliorates murine colitis. *J Leukoc Biol* 86: 633-643
- 41) Del Fabbro M., Francetti L., Pizzoni L., Rozza R., Weinstein RL (2000) Neutrophil physiology: role and mechanism of action in the immune response at gingival level. *Minerva Stomatol* 49: 227-248
- 42) DeLeo FR, Quinn MT (1996) Assembly of the phagocyte NADPH oxidase: molecular interaction of oxidase proteins. *J. Leukoc Biol* 60 (6): 677-91
- 43) Deng ZH, Ti DD, Xue H (2009) [Effects of ethyl pyruvate on injuries of sepsis in mice]. *Zhongguo Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue* 21: 460-462
- 44) Di PR, Mazzone E, Genovese T (2009) Ethyl pyruvate reduces the development of zymosan-induced generalized inflammation in mice. *Crit Care Med* 37: 270-282
- 45) Dooley DC, Simpson JF, Meryman HT (1982) Isolation of large numbers of fully viable human neutrophils: a preparative technique using percoll density gradient centrifugation. *Exp Hematol* 10: 591-599
- 46) Edlund GL, Halestrap AP (1988) The kinetics of transport of lactate and pyruvate into rat hepatocytes. Evidence for the presence of a specific carrier similar to that in erythrocytes. *Biochem J* 249: 117-126
- 47) Eggleton P, Gargan R, Fisher D (1989) Rapid method for the isolation of neutrophils in high yield without the use of dextran or density gradient polymers. *J Immunol Methods* 121 (1): 105-113.
- 48) Engel JM, Mühlhling J, Kwapisz M, Heidt M (2009a) Glutamine administration in patients undergoing cardiac surgery and the influence on blood glutathione levels. *Acta Anaesthesiol Scand* 53: 1317-1323
- 49) Engel JM, Pitz S, Mühlhling J, Menges T, Martens F, Kwapisz M, Hempelmann G (2009b) Role of glutamine administration on T-cell derived inflammatory response after cardiopulmonary bypass. *Clin Nutr* 28: 15-20
- 50) Fan YP, Yu JC, Kang WM, Zhang Q (2009) Effects of glutamine supplementation on patients undergoing abdominal surgery. *Chin Med Sci J* 24 (1): 55-9
- 51) Farshidfar G (1990) Vergleichende Untersuchungen zur Bestimmung von alpha-Ketosäuren mittels GLC und HPLC. Diplomarbeit im Fach Biochemie an der Freien Universität Berlin
- 52) Fauth U, Heinrichs W, Puente-Gonzalez I (1990) Maximale Umsatzraten an Enzymen der Glykolyse und des Zitratzyklus von separierten Granulozyten in der postoperativen Phase. [Maximal turnover rates of glycolysis enzymes and of the citrate cycle of separated granulocytes in the postoperative period]. *Infusionstherapie* 17: 178-183
- 53) Fauth U, Schleichtriemen T, Heinrichs W, Puente-Gonzalez I, Halmágyi M (1993) The measurement of enzyme activities in the resting human polymorphonuclear leukocyte - critical estimate of a method. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 31 (1): 5-16

- 54) Fink MP (2004) Ethyl pyruvate: a novel treatment for sepsis and shock. *Minerva Anesthesiol* 70: 365-371
- 55) Fink MP (2007a) Ethyl pyruvate: a novel anti-inflammatory agent. *J Intern Med* 261: 349-362
- 56) Fink MP (2007b) Ethyl pyruvate: a novel treatment for sepsis. *Curr Drug Targets* 8: 515-518
- 57) Fink MP (2008) Ethyl pyruvate. *Curr Opin Anaesthesiol* 21: 160-167
- 58) Frei J, Aellig A, Nessi P (1975) Enzyme system and coenzymes involved in the energy metabolism of leukocytes. Function and metabolism of polymorphonuclear neutrophils. *Ann Biol Clin* 33: 459-464
- 59) Fuchs M, Gerlach J, Unger J (1994) Alpha-keto acid metabolism by hepatocytes cultured in a hybrid liver support bioreactor. *Int J Artif Organs* 17: 554-558
- 60) Fuchs M (1990) Entwicklung einer vollautomatischen quantitative Aminosäure-bestimmung mittels hochauflösender Liquidchromatographie nach Fluoreszenzderivatisierung. Diplomarbeit im Fach Biochemie an der freien Universität Berlin.
- 61) Fuchs M (1998) Untersuchungen zur Regelung der Homöostase im Aminosäure und alpha-Ketosäurestoffwechsel von Hepatozyten im Perfusionsmodell. Inaugural Dissertation im Fach Biochemie an der freien Universität Berlin.
- 62) Fuchs M, Engel J, Campos M, Matejec R, Henrich M, Harbach H, Wolff M, Weismüller K, Menges T, Heidt MC, Welters ID, Krüll M, Hempelmann G, Mühling J. (2009) Intracellular alpha-keto acid quantification by fluorescence-HPLC. *Amino Acids* 36 (1): 1-11
- 63) Fürst P (1998) Old and new substrates in clinical nutrition. *J Nutr* 128 (5): 789-796
- 64) Fürst P (2001) New developments in glutamine delivery. *J Nutr* 131 (9): 2562-2568
- 65) Fürst P, Stehle P (2004) What are the essential elements needed for the determination of amino acid requirements in humans? *J Nutr* 134 (6): 1558-1565
- 66) Furukawa S, Saito H, Matsuda T, Inoue T, Fukatsu K, Han I, Ikeda S, Hidemura A, Muto T. 2000. Relative effects of glucose and glutamine on reactive oxygen intermediate production by neutrophils. *Shock* 13 (4): 274-8
- 67) Gabbianelli R, Cifani C, Massi M (2007) Oxidative damage in rat erythrocyte membranes following ethanol intake: effect of ethyl pyruvate. *Chem Biol Interact* 169: 122-131
- 68) Gardner DK, Leese HJ (1988) The role of glucose and pyruvate transport in regulating nutrient utilization by preimplantation mouse embryos. *Development* 104: 423-429
- 69) Genovese T, Esposito E, Mazzon E (2009) Beneficial effects of ethyl pyruvate in a mouse model of spinal cord injury. *Shock* 32: 217-227
- 70) Gonzalez RJ, Moore EE, Ciesla DJ, Biffi WL, Offner PJ, Silliman CC (2001) Phospholipase A(2)-derived neutral lipids from posthemorrhagic shock mesenteric lymph prime the neutrophil oxidative burst. *Surgery* 130 (2): 198-203
- 71) Halestrap AP (1978) Pyruvate and ketone-body transport across the mitochondrial membrane. Exchange properties, pH-dependence and mechanism of the carrier. *Biochem J* 172: 377-387
- 72) Han Y, Englert JA, Yang R (2005) Ethyl pyruvate inhibits nuclear factor-kappaB-dependent signaling by directly targeting p65. *J Pharmacol Exp Ther* 312: 1097-1105
- 73) Hara S, Takemori Y, Yamaguchi M, Nakamura M, Ohkura Y (1985) Determination of alpha-keto acids in serum and urine by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J Chromatogr* 344 (33): 1-9.

- 74) Haslett C, Guthrie LA, Kopaniak MM, Johnston RB, Jr., Henson PM (1985) Modulation of multiple neutrophil functions by preparative methods or trace concentrations of bacterial lipopolysaccharide. *Am J Pathol* 119: 101-110
- 75) Hattori H, Imai H, Hanamoto A, Furuhashi K, Nakagawa Y (2005) Up-regulation of phospholipid hydroxylperoxid glutathione peroxidase in rat casein-induced polymorphonuclear neutrophils. *Biochem J* 389 (2): 279-87
- 76) Hayashi T, Tsuchiya H, Todoriki H, Naruse H (1982) High-performance liquid chromatographic determination of alpha-keto acids in human urine and plasma. *Anal Biochem* 122(1): 173-9.
- 77) Henschen A, Hupf KP, Lottspeich F (1989) High-performance-liquid-chromatography in biochemistry. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, 1. Auflage
- 78) Hippenstiel S, Kratz T, Krüll M, Seybold J, Eichel-Streiber C, Suttrop N (1998) Rho protein inhibition blocks protein kinase C translocation and activation. *Biochem Biophys Res Commun* 245 (3): 830-834.
- 79) Hollenbach M, Hintersdorf A, Huse K (2008) Ethyl pyruvate and ethyl lactate down-regulate the production of pro-inflammatory cytokines and modulate expression of immune receptors. *Biochem Pharmacol* 76: 631-644
- 80) Homem de Bittencourt PI Jr, Peres CM (1993) Pyruvate is a lipid precursor for rat lymphocytes in culture: evidence for a lipid exporting capacity. *Biochem Mol Biol Int* 30:631-641
- 81) Huang LF, Yao YM, Zhang LT (2009) The effect of high-mobility group box 1 protein on activity of regulatory T cells after thermal injury in rats. *Shock* 31: 322-329
- 82) Hume DA, Vijayakumar EK, Schweinberger F (1978) The role of calcium ions in the regulation of rat thymocyte pyruvate oxidation by mitogens. *Biochem J* 174: 711-716
- 83) Hyslop PA, Oades ZG, Jesaitis AJ (1984) Evidence for N-formyl chemotactic peptide-stimulated GTPase activity in human neutrophil homogenates. *FEBS Lett* 166: 165-169
- 84) Ing TS, Zhou XJ, Yu AW (1997) Effects of pyruvate-based or lactate-based peritoneal dialysis solutions on neutrophil intracellular pH. *Int J Artif Organs* 20: 255-260
- 85) Johansson AS, Johansson-Haque K, Okret S (2008) Ethyl pyruvate modulates acute inflammatory reactions in human endothelial cells in relation to the NF-kappaB pathway. *Br J Pharmacol* 154: 1318-1326
- 86) Johnson JL, Moore EE, Partrick DA, Tamura DY, Zallen G, Elzi DJ (1999) Extracellular signal-related kinase 1/2 and p38 mitogen-activated protein kinase pathways serve opposite roles in neutrophil cytotoxicity. *Arch Surg* 134 (10): 1074-1078
- 87) Jolkver E, Emer D, Ballan S (2009) Identification and characterization of a bacterial transport system for the uptake of pyruvate, propionate, and acetate in *Corynebacterium glutamicum*. *J Bacteriol* 191: 940-948
- 88) Kang YH, Park SH, Lee YJ (2002) Antioxidant alpha-keto-carboxylate pyruvate protects low-density lipoprotein and atherogenic macrophages. *Free Radic Res* 36: 905-914
- 89) Katrukha SP, Kukes VG (1986) Derivatization of endogenous and exogenous compounds in plasma for high-performance liquid chromatographic analysis. *J Chromatogr* 365: 105-110
- 90) Kennedy AD, DeLeo FR (2009) Neutrophil apoptosis and the resolution of infection. *Immunol Res* 43 (1-3): 25-61
- 91) Kettle AJ, Carr AC, Winterbourn CC (1994) Assays using horseradish peroxidase and phenolic substrates require superoxide dismutase for accurate determination of hydrogen peroxide production by neutrophils. *Free Radic Biol Med* 17 (2): 161-164

- 92) Kieber DJ, Mopper K (1983) RP-HPLC analysis of alpha-ketoacid quinoxalinol. *J Chromatogr* 281: 135-144
- 93) Kielducka A, Paradies G, Papa S (1981) A comparative study of the transport of pyruvate in liver mitochondria from normal and diabetic rats. *J Bioenerg Biomembr* 13:123-132
- 94) Klebanoff SJ (2005) Myeloperoxidase: friend and foe. *J Leukoc Biol* 77 (5): 598-625
- 95) Klein A, Chan AW, Caplan BU (1990) NADP⁺ reduction by human lymphocytes. *Clin Exp Immunol* 82: 170-173
- 96) Knox, WE, Stumpf PK, Green DE, Auerbach VH (1948) The inhibition of sulfhydryl enzymes as the basis of the bactericidal action of chlorine. *J Bacteriol* 55: 451-458
- 97) Kobayashi T, Tsunawaki S, Seguchi H (2001) Evaluation of the process for superoxide production by NADPH oxidase in human neutrophils: evidence for cytoplasmic origin of superoxide. *Redox Rep* 6: 27-36
- 98) Koh A, da Silva AP, Bansal AK, Bansal M, Sun C, Lee H, Glogauer M, Sodek J, Zohar R (2007) Role of osteopontin in neutrophil function. *Immunology* 122 (4): 466-75
- 99) Kozlova NM, Slobozhanina EI, Chernitskii EA (1983) [Pyruvate and glucose transport through the erythrocyte membranes and the role of spectrin in these processes]. *Biofizika* 28: 826-829
- 100) Krebs HA, Salvin E, Johnson WA (1938) The formation of citric and alpha-ketoglutaric acids in the mammalian body. *Biochem J* 32: 113-117
- 101) Krebs HA (1940) The citric acid cycle and the Szent-Gyorgyi cycle in pigeon breast muscle. *Biochem J* 34: 775-779
- 102) Krumholz W (1991) Der Einfluß ausgewählter intravenöser Anästhetika auf verschiedene Funktionen polymorphkerniger neutrophiler Granulozyten. Gießen: Habilitationsschrift zur Erlangung der Venia legendi des Fachbereichs Humanmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen.
- 103) Krumholz W, Demel C, Jung S, Meuthen G, Hempelmann G (1993a) The influence of intravenous anaesthetics on polymorphonuclear leukocyte function. *Can J Anaesth* 40: 770-774
- 104) Krumholz W, Demel C, Jung S, Meuthen G, Hempelmann G (1993b) The influence of fentanyl and alfentanil on functions of human polymorphonuclear leukocytes in vitro. *Acta Anaesthesiol Scand* 37 (4): 386-389
- 105) Krumholz W, Demel C, Jung S, Meuthen G, Knecht J, Hempelmann G (1995) The effects of thiopentone, etomidate, ketamine and midazolam on several bactericidal functions of polymorphonuclear leucocytes in vitro. *Eur J Anaesthesiol* 12: 141-146
- 106) Krumholz W, Weidenbusch H, Menges T (2000) Der Einfluß von Midazolam und Flunitrazepam auf die Freisetzung von Lysozym und β -Glucuronidase aus polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten in vitro. *Anästhesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther* 35 (5): 316-318
- 107) Krumholz W, Weidenbusch H, Menges T, Keller G, Hempelmann G (2001) The influence of intravenous anaesthetics on the activity of enzymes released from polymorphonuclear leucocytes in vitro. *Eur J Anaesthesiol* 18 (3): 151-158
- 108) Krüll M, Klucken AC, Wuppermann FN, Fuhrmann O, Magerl C, Seybold J (1999) Signal transduction pathways activated in endothelial cells following infection with *Chlamydia pneumoniae*. *J Immunol* 162 (8): 4834-4841
- 109) Kuwabara M, Takahashi TA, Nagahata H, Inanami O (2000) Spin-trapping detection of superoxides in polymorphonuclear leukocytes stimulated with serum-opsonized zymosan. *Jpn J Vet Res* 48 (1): 3-13

- 110) Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 (259): 680-685.
- 111) Lagranha CJ, Senna SM, de Lima TM, Silva EP, Doi SQ, Curi R, Pithon-Curi TC (2004) Beneficial effect of glutamine on exercise-induced apoptosis of rat neutrophils. *Med Sci Sports Exerc* 36 (2): 210-7
- 112) Lagranha CJ, de Lima TM, Senna SM, Doi SQ, Curi R, Pithon-Curi TC. (2005) The effect of glutamine supplementation on the function of neutrophils from exercised rats. *Cell Biochem Funct* 23 (2): 101-7
- 113) Lakshman R, Finn A (2001) Neutrophil disorders and their management. *J Clin Pathol* 54: 7-19.
- 114) Lamers JM, Hulsmann WC (1975) Inhibition of pyruvate transport by fatty acids in isolated cells from rat small intestine. *Biochim Biophys Acta* 394: 31-45
- 115) Lauzon K, Zhao X, Bouetard A, Delbecchi L, Paquette B, Lacasse P (2005) Antioxidants to prevent bovine neutrophil-induced mammary epithel cell damage. *J Dairy Sci* 88 (12): 4295-303.
- 116) Learn DB, Fried VA, Thomas EL (1990) Taurine and hypotaurine content of human leukocytes. *J Leukoc Biol* 48 (2): 174-82
- 117) Lee J, Kwon W, Jo Y (2008) Protective effects of ethyl pyruvate treatment on paraquat-intoxicated rats. *Hum Exp Toxicol* 27: 49-54
- 118) Li Y, Ping X, Yu B, Liu F, Ni X, Li J (2009) Clinical trial: prophylactic intravenous alanyl-glutamine reduces the severity of gastrointestinal toxicity induced by chemotherapy: a randomized crossover study. *Aliment Pharmacol Ther* 30 (5): 452-8
- 119) Liang X, Chavez AR, Schapiro NE (2009) Ethyl pyruvate administration inhibits hepatic tumor growth. *J Leukoc Biol* 86: 599-607
- 120) Lichtenberger C, Zakeri S, Baier K, Willheim M, Holub M, Reinisch W (1999) A novel high-purity isolation method for human peripheral blood neutrophils permitting polymerase chain reaction-based mRNA studies. *J Immunol Methods* 227 (1-2): 75-84
- 121) Lou O, Alcaide P, Luscinskas FW, Muller WA (2007) CD99 Is a Key Mediator of the Transendothelial Migration of Neutrophils. *J Immunol* 178: 1136-1143
- 122) Mackenzie I, Lever A (2007) Management of sepsis. *BMJ* 335: 929-932
- 123) Mahiout A, Matata BM, Brunkhorst R (1997) Effect of glucose and pyruvate in acidic and non-acidic peritoneal dialysis fluids on leukocytes cell functions. *Kidney Int* 51: 860-867
- 124) Marcinkiewicz J, Grabowska A, Bereta J, Stelmaszynska T (1995) Taurine chloramine, a product of activated neutrophils, inhibits in vitro the generation of nitric oxide and other macrophage inflammatory mediators. *J Leukoc Biol* 58 (6): 667-74
- 125) Maslen C, Stevens TR, Hall ND (1987) The generation of lipid peroxides by stimulated human neutrophils. Detection using phenol red oxidation. *J Immunol Methods* 98 (1): 71-76
- 126) Matés JM, Segura JA, Alonso FJ (2008) Intracellular redox status and oxidative stress: implications for cell proliferation, apoptosis, and carcinogenesis. *Arch Toxicol* 82: 273-99
- 127) Matsumoto T, van der AP, Watanabe Y (1991) Neutrophil function in hyperosmotic NaCl is preserved by phosphoenol pyruvate. *Urol Res* 19: 223-227
- 128) McCarthy, Bernhagen J, Liu YC, Perry JD (1990) A rapid preparation technique for leucocytes. *J Microsc* 158: 63-72

- 129) Merezhinskaya N, Fishbein WN (2009) Monocarboxylate transporters: past, present, and future. *Histol Histopathol* 24: 243-264
- 130) Meyer V (1986) *Praxis der HPLC*. Verlag Diesterweg-Salle-Sauerländer, Frankfurt am Main.
- 131) Miwa H, Fujii J, Kanno H (2000) Pyruvate secreted by human lymphoid cell lines protects cells from hydrogen peroxide mediated cell death. *Free Radic Res* 33: 45-56
- 132) Morlion BJ, Stehle P, Wachtler P, Siedhoff HP, Koller M, König W, Fürst P, Puchstein C (1998) Total parenteral nutrition with glutamine dipeptide after major abdominal surgery: a randomized, double-blind, controlled study. *Ann Surg* 227: 302-308.
- 133) Mühling J, Fuchs M, Dehne MG, Sablotzki A, Menges T, Weber B, Hempelmann G (1999) Quantitative determination of free intracellular amino acids in single human polymorphonuclear leucocytes. Recent developments in sample preparation and high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B* 728: 157-166
- 134) Mühling J, Fuchs M, Fleck C, Sablotzki A, Krüll M, Dehne MG, Gonter J, Weiss S, Engel J, Hempelmann G (2002) Effects of arginine, L-alanyl-L-glutamine or taurine on neutrophil (PMN) free amino acid profiles and immune functions in vitro. *Amino Acids* 22: 39-53
- 135) Mühling J, Fuchs M, Campos ME, Gonter J, Engel JM, Sablotzki A, Menges T, Weiss S, Dehne MG, Krüll M, Hempelmann G (2003) Quantitative determination of free intracellular α -keto acids in neutrophils. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 789 (2): 383-92
- 136) Mühling J, Fuchs M, Campos M, Gonter J, Sablotzki A, Engel J, Welters ID, Wolff M, Matejec R, Dehne MG, Menges T, Krüll M, Hempelmann G (2004) Effects of ornithine on neutrophil (PMN) free amino acid and α -keto acid profiles and immune functions in vitro. *Amino Acids* 27: 313-319
- 137) 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 (2005) Alterations in neutrophil (PMN) free intracellular alpha-keto acid profiles and immune functions induced by L-alanyl-L-glutamine, arginine or taurine. *Amino Acids* 29: 289-300
- 138) Mühling J, Engel J, Halabi M (2006) Nitric oxide and polyamine pathway-dependent modulation of neutrophil free amino- and alpha-keto acid profiles or host defense capability. *Amino Acids* 31:11-26
- 139) Mühling J, Burchert D, Langefeld TW, Matejec R, Harbach H, Engel J, Wolff M, Welters ID, Fuchs M, Menges T, Krüll M, Hempelmann G (2007) Pathways involved in alanyl-glutamine-induced changes in neutrophil amino- and α -keto acid homeostasis or immunocompetence. *Amino Acids* 33 (3): 511-24
- 140) 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 (2008) Which mechanisms are involved in taurine-dependent granulocytic immune response or amino- and α -keto acid homeostasis? *Amino Acids* 34 (2): 257-70
- 141) Mühling J, Tussing F, Nickolaus KA, Matejec R, Henrich M, Harbach H, Wolff M, Weismüller K, Engel J, Welters ID, Langefeld TW, Fuchs M, Weigand MA, Heidt MC (2010) Effects of alpha-ketoglutarate on neutrophil intracellular amino and alpha-keto acid profiles and ROS production. *Amino Acids* 38: 167-177
- 142) Newsholme P, Gordon S, Newsholme EA (1987) Rates of utilization and fates of glucose, glutamine, pyruvate, fatty acids and ketone bodies by mouse macrophages. *Biochem J* 242: 631-636
- 143) Newsholme P (2001) Why is L-glutamine metabolism important to cells of the immune system in health, postinjury, surgery or infection? *J Nutr* 131 (9): 2515-22

- 144) Newsholme P, Lima MM, Procopio J, Pithon-Curi TC, Doi SQ, Bazotte RB, Curi R (2003) Glutamine and glutamate as vital metabolites. *Braz J Med Biol Res* 36 (2): 153-63
- 145) Ohmori M, Kitoh Y, Harada K, Sugimoto K, Fujimura A (2000) Polymorphonuclear leukocytes (PMNs) functions in SHR, L-. *J Hypertens* 18 (6): 703-707
- 146) Pabst MJ, Pabst KM, Collier JA, Coleman TC, Lemons-Prince ML, Godat MS (1995) Inhibition of neutrophil and monocyte defensive functions by nicotine. *J Periodontol* 66 (12): 1047-1055
- 147) Partrick DA, Moore EE, Fullerton DA, Barnett CC, Jr., Meldrum DR, Silliman CC (1999) Cardio-pulmonary bypass renders patients at risk for multiple organ failure via early neutrophil priming and late neutrophil disability. *J Surg Res* 86 (1): 42-49
- 148) Partrick DA, Moore EE, Offner PJ, Meldrum DR, Tamura DY, Johnson JL (2000) Maximal human neutrophil priming for superoxide production and elastase release requires p38 mitogen-activated protein kinase activation. *Arch Surg* 135 (2): 219-225
- 149) Paul JL, Roch-Arveiller M, Giroud JP (1987) Effects of storage on the pyruvate-lactate system and random migration of human granulocytes. *Vox Sang* 52: 24-26
- 150) Peters AM (1998) Just how big is the pulmonary granulocyte pool? *Clin Sci* 94 (1): 7-19. Erratum in: *Clin Sci* 94 (3): 333
- 151) Pick E, Keisari Y (1980) A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. *J Immunol Methods* 38:161-169
- 152) Pithon-Curi TC, Levada AC, Lopes LR, Doi SQ, Curi R (2002) Glutamine plays a role in superoxide production and the expression of p47phox and gp91phox in rat neutrophils. *Clin Sci* 103 (4): 403-8
- 153) Poole RC, Halestrap AP, Price SJ (1989) The kinetics of transport of lactate and pyruvate into isolated cardiac myocytes from guinea pig. Kinetic evidence for the presence of a carrier distinct from that in erythrocytes and hepatocytes. *Biochem J* 264: 409-418
- 154) Rajkovic IA, Williams R (1985) Rapid microassays of phagocytosis, bacterial killing, superoxide and hydrogen peroxide production by human neutrophils in vitro. *J Immunol Methods* 78 (1): 35-47
- 155) Ramakrishnan N, Chen R, McClain DE (1998) Pyruvate prevents hydrogen peroxide-induced apoptosis. *Free Radic Res* 29: 283-295
- 156) Ratasirayakorn W, Leone P, Leblebicioglu B, Walters JD (1999) Polyamines found in the inflamed periodontium inhibit priming and apoptosis in human polymorphonuclear leukocytes. *J Periodontol* 70 (2): 179-184
- 157) Rebecchi IM, Ferreira Novo N, Julian Y, Campa A (2000) Oxidative metabolism and release of myeloperoxidase from polymorphonuclear leukocytes obtained from blood sedimentation in a Ficoll-Hypaque gradient. *Cell Biochem Funct* 18 (2): 127-32
- 158) Riedel E, Hampl H, Scigalla P, Nündel M, Kessel M (1989) Correction of amino acid metabolism by recombinant human erythropoietin therapy in hemodialysis patients. *Kidney Int Suppl* 27: 216-21
- 159) Riedel E, Hampl H, Nündel M, Busche D, Fuchs M (1992a). Severity of anaemia influences pattern of amino acids and alpha-keto acids in haemodialysis patients. *Contrib Nephrol* 98: 98-104
- 160) Riedel E, Hampl H, Nündel M, Farshidfar G (1992b) Essential branched-chain amino acids and alpha-ketoanalogues in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 7 (2): 117-120

- 161) Robinson JM (2008) Reactive oxygen species in phagocytic leukocytes. *Histochem Cell Biol* 130 (2): 281-97
- 162) Rodriguez-Bano J, Pascual A, Ballesta S, Garcia I, Perea EJ (1997) Penetration of azithromycin into human neutrophils: effect of hydrogen peroxide production. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 15 (4): 196-199
- 163) Rose S, Fiebrich M, Weber P, Dike J, Buhren V (1998) Neutrophil activation after skeletal muscle ischemia in humans. *Shock* 9 (1): 21-26
- 164) Rosen H, Klebanoff SJ (1979) Bactericidal activity of a superoxide anion-generating system. A model for the polymorphonuclear leukocyte. *J Exp Med* 149 (1): 27-39
- 165) Roth E (2008) Nonnutritive Effects of Glutamine. *J Nutr* 138 (10): 2025-2031
- 166) Schmitt M, Keller HU, Cottier H (1986) Qualitative and quantitative assesment of human polymorphonuclear leukocyte (PMNL) functions. *Beitr Infusionsther Klin Ernähr* 15: 196-203
- 167) Selvaraj RJ, Sbarra AJ (1966) Phagocytosis inhibition and reversal. II. Possible role of pyruvate as an alternative source of energy for particle uptake by guinea-pig leukocytes. *Biochim Biophys Acta* 127: 159-171
- 168) Serrano MA, Curi R (1989) Rates of pyruvate utilization and lactate formation by lymphocytes from young and aged rats. *Braz J Med Biol Res* 22: 555-559
- 169) Smith JA (1994) Neutrophils, host defense, and inflammation: a double-edged sword. *J Leukoc Biol* 56 (6): 672-86
- 170) Stangel W, Seidel J, Mirkani J (1986) Granulozytenfunktionen in gelagerten Blutkonserven. *Beitr Infusionsther Klin Ernähr* 15: 231-241
- 171) Stjernholm RL, Dimitrov NV, Pijanowski LJ (1969) Carbohydrate metabolism in leukocytes. IX. Citric acid cycle activity in human neutrophils. *J Reticuloendothel Soc* 6: 194-201
- 172) Su F, Wang Z, Cai Y (2007) Beneficial effects of ethyl pyruvate in septic shock from peritonitis. *Arch Surg* 142: 166-171
- 173) Su J, Li X, Cui X (2008) Ethyl pyruvate decreased early nuclear factor-kappaB levels but worsened survival in lipopolysaccharide-challenged mice. *Crit Care Med* 36: 1059-1067
- 174) Taylor MD, Grand TJ, Cohen JE (2005) Ethyl pyruvate enhances ATP levels, reduces oxidative stress and preserves cardiac function in a rat model of off-pump coronary bypass. *Heart Lung Circ* 14: 25-31
- 175) Teigland M, Klungsayr L (1983) Accumulation of alpha-ketoisocaproate from leucine in homogenates of tissue from rainbow and rat. *Comp Biochem Physiol A* 75 (4): 703-705
- 176) Tsung A, Kaizu T, Nakao A et al. (2005) Ethyl pyruvate ameliorates liver ischemia-reperfusion injury by decreasing hepatic necrosis and apoptosis. *Transplantation* 79: 196-204
- 177) Tung JP, Fraser JF, Wood P, Fung YL (2009) Respiratory burst function of ovine neutrophils. *BMC Immunol* 10: 25-31
- 178) Udilova N (1999) Vergleichende Untersuchungen von Methoden zum Nachweis von Superoxidradikalen in biologischen Modellsystemen. Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades doctor rerum naturalium im Fach Physik eingereicht an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I der Humboldt Universität zu Berlin.
- 179) Vaartjes WJ, Geelen MJ, van den Bergh SG (1979) Accumulation of pyruvate by isolated rat liver mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 548: 38-47

- 180) Van Eeden SF, Lawrence E, Sato Y, Kitagawa Y, Hogg JC (2000) Neutrophils released from the bone marrow by granulocyte colony-stimulating factor sequester in lung microvessels but are slow to migrate. *Eur Respir J* 15: 1079-1086
- 181) Van Zoelen MA, Bakhtiari K, Dessing MC (2006) Ethyl pyruvate exerts combined anti-inflammatory and anticoagulant effects on human monocytic cells. *Thromb Haemost* 96: 789-793
- 182) Varma SD, Hegde KR, Kovtun S (2006) Oxidative damage to lens in culture: reversibility by pyruvate and ethyl pyruvate. *Ophthalmologica* 220: 52-57
- 183) Venaille TJ, Misso NL, Phillips MJ, Robinson BW, Thompson PJ (1994) Effects of different density gradient separation techniques on neutrophil function. *Scand J Clin Lab Invest* 54 (5): 385-91
- 184) Venizelos N, Hagenfeldt L (1985) Pyruvate and acetate oxidation by leukocytes in vitro. Activation of the pyruvate dehydrogenase complex by uncoupling of oxidative phosphorylation. *Scand J Clin Lab Invest* 45: 335-340
- 185) Walrand S, Guillet C, Gachon P, Rousset P, Giraudet C, Vasson MP, Boirie Y (2004) Protein synthesis rates of human PBMC and PMN can be determined simultaneously in vivo by using small blood samples. *Am J Physiol Cell Physiol* 286 (6): C1474-78
- 186) Wang Q, Ding Q, Zhou Y (2009) Ethyl pyruvate attenuates spinal cord ischemic injury with a wide therapeutic window through inhibiting high-mobility group box 1 release in rabbits. *Anesthesiology* 110: 1279-1286
- 187) Weening RS, Wever R, Roos D (1975) Quantitative aspects of the production of superoxide radicals by phagocytizing human granulocytes. *J Lab Clin Med* 85: 245-251
- 188) Welters ID (2002) 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
- 189) Wiemer EA, Michels PA, Opperdoes FR (1995) The inhibition of pyruvate transport across the plasma membrane of the bloodstream form of *Trypanosoma brucei* and its metabolic implications. *Biochem J* 312 (2): 479-484
- 190) Willems HL, de Kort TF, Trijbels FJ (1978) Determination of pyruvate oxidation rate and citric acid cycle activity in intact human leukocytes and fibroblasts. *Clin Chem* 24: 200-203
- 191) Witko-Sarsat V, Rieu P, Descamps-Latscha B (2000) Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects. *Lab Invest* 80: 617-653
- 192) Woodman RC, Curnutte JT, Babior BM (1988) Evidence that de novo protein synthesis participates in a time-dependent augmentation of the chemotactic peptide-induced respiratory burst in neutrophils. Effects of recombinant human colony stimulating factors and dihydrocytochalasin B. *Free Radic Biol Med* 5: 355-361
- 193) Woolf LI, Hasinoff C, Perry A (1982) Estimation of branched-chain alpha-keto acids in blood by gas chromatography. *J Chromatogr* 231 (2): 237-245
- 194) Wu YT, Wu ZL, Jiang XF (2005) Pyruvate improves neutrophilic nitric oxide generation in peritoneal dialysis solutions. *Artif Organs* 29: 976-980
- 195) Wu YT, Wu ZL, Jiang XF (2003) Pyruvate preserves neutrophilic superoxide production in acidic, high glucose-enriched peritoneal dialysis solutions. *Artif Organs* 27: 276-281
- 196) Yang R, Shaufi AL, Killeen ME (2009) Ethyl pyruvate ameliorates liver injury secondary to severe acute pancreatitis. *J Surg Res* 153: 302-309

- 197) Zhang M, Izumi I, Kagamimori S, Sokejima S, Yamagami T, Liu Z, Qi B (2004) Role of taurine supplementation to prevent exercise-induced oxidative stress in healthy young men. *Amino Acids* 26 (2): 203-7
- 198) Zhang Y, Li M, Meng M (2009) Effect of ethyl pyruvate on physical and immunological barriers of the small intestine in a rat model of sepsis. *J Trauma* 66: 1355-1364
- 199) Zhao J, Juettner B, Scheinichen D (2003) Respiratory burst activity of polymorphonuclear cells is dependent on the cell preparation technique. *Acta Anaesthesiol.Scand* 47: 702-70
- 200) Zhou FQ, Yu AW (1998) Pyruvate-based peritoneal dialysate preserves neutrophilic oxygen consumption. *Zhongguo Yao Li Xue Bao* 19: 207-210
- 201) Zingarelli B (2004) Ethyl pyruvate: a simple solution? *Crit Care Med* 32: 1603-1604
- 202) Zozulinska DA, Wierusz-Wysocka B, Wysocki H, Majchrzak AE, Wykretowicz A (1996) The influence of insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM) duration on superoxide anion and hydrogen peroxide production by polymorphonuclear neutrophils. *Diabetes Res Clin Pract* 33 (3): 139-144
- 203) Zozt KK, Fink MP (2010) The biochemical basis for the anti-inflammatory and cytoprotective actions of ethyl pyruvate and related compounds. *Biochem Pharmacol* 80: 151-9

7 Anhang

7.1 Ergebnistabellen

7.1.1 Pyruvat: Einfluß der Inkubationszeit auf die freien intragranulozytären

Amino- und α -Ketosäurepools

(Ergebnisse ohne signifikante Veränderungen)

Kontrolle	10 min	60 min	120 min
Lysin	0,66 ± 0,16	0,61 ± 0,17	0,70 ± 0,22
Isoleucin	0,42 ± 0,10	0,35 ± 0,10	0,39 ± 0,13
Leucin	0,73 ± 0,21	0,63 ± 0,23	0,75 ± 0,25
Valin	0,62 ± 0,19	0,51 ± 0,19	0,54 ± 0,18
Methionin	0,17 ± 0,04	0,15 ± 0,04	0,18 ± 0,04
Taurin	43,9 ± 10,7	38,4 ± 11,2	40,5 ± 11,9
Hypotaurin	1,64 ± 0,51	1,45 ± 0,46	1,34 ± 0,46
Threonin	0,76 ± 0,14	0,67 ± 0,17	0,70 ± 0,17
α -Aba	0,29 ± 0,07	0,26 ± 0,07	0,25 ± 0,06
Tyrosin	0,34 ± 0,09	0,28 ± 0,09	0,31 ± 0,09
Tryptophan	0,14 ± 0,03	0,12 ± 0,03	0,13 ± 0,04
Phenylalanin	1,74 ± 0,64	1,59 ± 0,68	1,70 ± 0,69
Histidin	0,75 ± 0,23	0,57 ± 0,20	0,61 ± 0,21
α -Ketobutyrat	4,46 ± 1,38	3,94 ± 1,63	4,32 ± 1,75
α -Ketoisovalerianat	2,77 ± 0,82	2,52 ± 0,84	2,43 ± 0,82
α -Ketoisocapronat	0,50 ± 0,16	0,55 ± 0,19	0,59 ± 0,19
p-Hydroxy-Phenylpyruvat	0,41 ± 0,11	0,36 ± 0,12	0,44 ± 0,13
α -Keto- β -methylvalerianat	0,99 ± 0,33	0,96 ± 0,37	1,17 ± 0,45
PYRUVAT (1 mM)	10 min	60 min	120 min
Lysin	0,72 ± 0,17	0,66 ± 0,19	0,60 ± 0,23
Isoleucin	0,38 ± 0,08	0,40 ± 0,15	0,39 ± 0,16
Leucin	0,80 ± 0,25	0,74 ± 0,26	0,69 ± 0,23
Valin	0,51 ± 0,14	0,51 ± 0,17	0,47 ± 0,15
Methionin	0,18 ± 0,04	0,16 ± 0,05	0,16 ± 0,05
Taurin	45,3 ± 11,1	42,4 ± 12,6	40,2 ± 10,6
Hypotaurin	1,25 ± 0,42	1,30 ± 0,52	1,36 ± 0,45
Threonin	0,74 ± 0,17	0,66 ± 0,15	0,65 ± 0,15
α -Aba	0,29 ± 0,07	0,26 ± 0,08	0,24 ± 0,09
Tyrosin	0,35 ± 0,08	0,31 ± 0,09	0,28 ± 0,11
Tryptophan	0,12 ± 0,05	0,12 ± 0,04	0,11 ± 0,04
Phenylalanin	1,55 ± 0,64	1,49 ± 0,62	1,40 ± 0,59
Histidin	0,74 ± 0,24	0,72 ± 0,27	0,61 ± 0,19
α -Ketobutyrat	4,57 ± 1,40	4,63 ± 1,67	4,34 ± 1,46
α -Ketoisovalerianat	2,59 ± 0,75	2,28 ± 0,74	2,36 ± 0,81
α -Ketoisocapronat	0,50 ± 0,15	0,48 ± 0,20	0,42 ± 0,18
p-Hydroxy-Phenylpyruvat	0,37 ± 0,11	0,37 ± 0,14	0,38 ± 0,16
α -Keto- β -methylvalerianat	1,10 ± 0,33	0,88 ± 0,35	0,93 ± 0,42

Tabelle 9: Der Einfluß von *Pyruvat* (PYR; 1 mM; n = 10), inkubiert in Vollblut für 10, 60 and 120 Minuten auf den freien intrazellulären Gehalt stoffwechselphysiologisch bedeutsamer **Amino-** (10^{-16} Mol/ PMN; MW \pm SD; n=10) und **α -Ketosäuren** (10^{-17} Mol/ PMN; MW \pm SD; n=10) in PMN. * = $p \leq 0.05$ versus Kontrolle; # = $p \leq 0.05$ versus 10 Minuten.

7.1.2 Pyruvat: Einfluß der Dosis auf die freien intragranulozytären

Amino- und α -Ketosäurepools

(Ergebnisse ohne signifikante Veränderungen)

PYRUVAT	Kontrolle	50 μ M	100 μ M	200 μ M	500 μ M	1 mM
Lysin	0,71 \pm 0,17	0,65 \pm 0,15	0,65 \pm 0,15	0,66 \pm 0,15	0,69 \pm 0,18	0,74 \pm 0,20
Isoleucin	0,45 \pm 0,12	0,47 \pm 0,13	0,43 \pm 0,12	0,46 \pm 0,12	0,47 \pm 0,13	0,46 \pm 0,12
Leucin	0,83 \pm 0,27	0,77 \pm 0,25	0,90 \pm 0,28	0,86 \pm 0,27	0,78 \pm 0,27	0,82 \pm 0,27
Valin	0,59 \pm 0,18	0,66 \pm 0,22	0,64 \pm 0,22	0,57 \pm 0,17	0,61 \pm 0,18	0,63 \pm 0,20
Methionin	0,21 \pm 0,07	0,18 \pm 0,05	0,18 \pm 0,05	0,19 \pm 0,05	0,19 \pm 0,07	0,19 \pm 0,05
Taurin	50,7 \pm 14,0	50,7 \pm 14,0	50,7 \pm 14,0	51,5 \pm 14,4	49,8 \pm 13,2	49,0 \pm 12,7
Hypotaurin	1,67 \pm 0,58	1,77 \pm 0,65	1,58 \pm 0,57	1,93 \pm 0,75	1,83 \pm 0,72	1,96 \pm 0,78
Threonin	0,87 \pm 0,18	0,79 \pm 0,15	0,81 \pm 0,17	0,88 \pm 0,18	0,95 \pm 0,22	0,90 \pm 0,22
α -Aba	0,31 \pm 0,08	0,31 \pm 0,08	0,32 \pm 0,08	0,30 \pm 0,07	0,30 \pm 0,07	0,29 \pm 0,07
Tyrosin	0,37 \pm 0,10	0,35 \pm 0,08	0,37 \pm 0,10	0,37 \pm 0,10	0,35 \pm 0,08	0,34 \pm 0,10
Tryptophan	0,15 \pm 0,03	0,15 \pm 0,03	0,14 \pm 0,03	0,15 \pm 0,03	0,14 \pm 0,03	0,14 \pm 0,03
Phenylalanin	1,78 \pm 0,70	1,82 \pm 0,73	1,83 \pm 0,75	1,71 \pm 0,68	1,85 \pm 0,73	1,82 \pm 0,73
Histidin	0,67 \pm 0,22	0,65 \pm 0,22	0,79 \pm 0,27	0,71 \pm 0,23	0,73 \pm 0,25	0,70 \pm 0,23
α -KB	4,89 \pm 1,62	4,69 \pm 1,59	4,93 \pm 1,90	5,04 \pm 1,95	5,16 \pm 1,74	4,93 \pm 1,69
α -KIV	3,03 \pm 0,90	2,90 \pm 0,95	3,12 \pm 0,97	3,01 \pm 0,92	2,55 \pm 0,77	2,80 \pm 0,90
α -KIC	0,58 \pm 0,20	0,53 \pm 0,18	0,63 \pm 0,22	0,67 \pm 0,22	0,50 \pm 0,17	0,54 \pm 0,18
PhePYR	0,40 \pm 0,12	0,43 \pm 0,13	0,39 \pm 0,12	0,50 \pm 0,15	0,42 \pm 0,13	0,40 \pm 0,13
α -KMV	0,96 \pm 0,35	1,05 \pm 0,38	1,20 \pm 0,45	1,36 \pm 0,50	1,10 \pm 0,37	1,19 \pm 0,40

Tabelle 10: Der Einfluß von **Pyruvat** (0, 50, 100, 200, 500 μ M und 1 mM; Inkubationszeit: 120 min; n=10) auf den freien intrazellulären Gehalt stoffwechselphysiologisch bedeutsamer **Amino-** (10^{-16} Mol/ PMN; MW \pm SD; n=10) und **α -Ketosäuren** (10^{-17} Mol/ PMN; MW \pm SD; n=10) in PMN. *= $p \leq 0.05$ versus Kontrolle.

7.2. Abbildungsverzeichnis

		Seite
Abb. 1	Lichtmikroskopische Aufnahmen verschiedener Blutzellen	1
Abb. 2	Schematische Darstellung der Blut- und Zellbildung aus blutzellbildenden Stammzellen im Rahmen der Hämatopoese und der wichtigsten Hormone und Zytokine	2
Abb. 3	Schematische Darstellung der schrittweisen Aktivierung von PMN sowie ihrer Transmigration in inflammatorische Gewebe	3
Abb. 4	Elektronenmikroskopische Aufnahme der morphologischen Veränderungen eines polymorphkernigen Granulozyten (PMN) im Rahmen eines Angriffs auf den Erreger des Milzbrands <i>Bacillus anthracis</i>	4
Abb. 5	Strukturformel von Pyruvat	7
Abb. 6	Jöns Jakob Berzelius, Lithographie-Portrait	8
Abb. 7	Beispiele einiger biochemischer Reaktionen von Pyruvat	9
Abb. 8	Percoll®-Gradientenseparation vitaler PMN aus Vollblut	13
Abb. 9	Einfluß von Pyruvat (0, 50, 100, 200, 500 μ M und 1 mM; Inkubationszeit: 120 min; n=10) auf den freien intrazellulären Gehalt von Glutamat (glu), Glutamin (gln), Aspartat (asp), Alanin (ala) und Asparagin (asn) in PMN	40

Abb. 10	Einfluß von Pyruvat (0, 50, 100, 200, 500 μ M und 1 mM; Inkubationszeit: 120 min; n=10) auf den freien intrazellulären Gehalt von Ornithin (orn), Arginin (arg) und Citrullin (cit) in PMN. Die Ergebnisse sind in Aminosäuregehalt [10-16 Mol] pro PMN-Zelle angegeben (MW \pm SD)	41
Abb. 11	Einfluß von Pyruvat (0, 50, 100, 200, 500 μ M und 1 mM; Inkubationszeit: 120 min; n=10) auf den freien intrazellulären Gehalt von Serin (ser), und Glycin (gly) in PMN. Die Ergebnisse sind in Aminosäuregehalt [10-16 Mol] pro PMN-Zelle angegeben (MW \pm SD). * \leq 0,05 versus Kontrolle.	42
Abb. 12	Einfluß von Pyruvat (0, 50, 100, 200, 500 μ M und 1 mM; Inkubationszeit: 120 min; n=10) auf den freien intrazellulären Gehalt von Pyruvat, und α -Ketoglutarat in PMN. Die Ergebnisse sind in α -Ketosäuregehalt [10-17 Mol] pro PMN-Zelle angegeben (MW \pm SD).	43
Abb. 13	Einfluß von Pyruvat (0, 50, 100, 200, 500 μ M und 1 mM; Inkubationszeit: 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 PMN (MW \pm SD).	44

7.3. Tabellenverzeichnis

		Seite
Tab. 1	Einwaagen Aminosäurenstandards	16
Tab. 2	Gradientenzeitverläufe und Elutionsbedingungen des binären Gradientenelutionssystems zur Analyse freier Aminosäuren	21
Tab. 3	Einwaagen α -Ketosäurenstandards	23
Tab. 4	Gradientenzeitverläufe und Elutionsbedingungen des binären Gradientenelutionssystems zur Analyse von α -Ketosäuren	26
Tab. 5	Reproduzierbarkeit und Linearität der Flächenquotienten (Flächen) sowie Retentionszeiten (R.-Zeit) von Standardproben freier Aminosäuren bei Reihen- (n= 20) und „Tag-zu-Tag“-Analysen (n= 15)	36
Tab. 6	Reproduzierbarkeit und Linearität der Flächenquotienten (Flächen) sowie Retentionszeiten (R.-Zeit) von α -Ketosäurestandardproben mit freiem α -Ketoglutarat (α -KG), Pyruvat (PYR = α -Ketoalanin), α -Ketobutyrat (α -KB), α -Ketovalerianat (α -KV= Interner Standard), α -Ketoisovalerianat (α -KIV), α -Ketoisocapronat (α -KIC), p-Hydroxy-Phenylpyruvat (PhePYR), α -Keto- β -methylvalerianat (α -KMOV)] bei Reihen- (n= 15) und „Tag-zu-Tag“-Analysen (n= 12)	37
Tab. 7	Der Einfluß von Pyruvat (PYR; 1 mM; n= 10), inkubiert in Vollblut für 10, 60 and 120 Minuten auf den freien intrazellulären Gehalt stoffwechselphysiologisch bedeutsamer Aminosäuren in	38

	PMN (10-16 Mol/ PMN; MW \pm SD; n=10) sowie auf die Gehalte von freiem intragranulozytären α -Ketoglutarat und Pyruvat (10-17 Mol/ PMN; MW \pm SD; n=10).	
Tab. 8	Der Einfluß von Pyruvat (PYR; 1 mM; n= 10), inkubiert in Vollblut für 10, 60 and 120 Minuten auf die Superoxidanionbildung [fMol O ₂ ⁻ /(PMN x min)], die Wasserstoffperoxidproduktion [fMol H ₂ O ₂ /(PMN x min)] sowie die Myeloperoxidaseaktivität [Units/l] isolierter PMN (MW \pm SD).	39
Tab. 9	Der Einfluß von Pyruvat (PYR; 1 mM; n= 10), inkubiert in Vollblut für 10, 60 and 120 Minuten auf den freien intrazellulären Gehalt stoffwechselphysiologisch bedeutsamer Amino- (10-16 Mol/ PMN; MW \pm SD; n=10) und α -Ketosäuren (10-17 Mol/ PMN; MW \pm SD; n=10) in PMN. *= p \leq 0.05 versus Kontrolle; # = p \leq 0.05 versus 10 Minuten.	85
Tab. 10	Der Einfluß von Pyruvat (0, 50, 100, 200, 500 μ M und 1 mM; Inkubationszeit: 120 min; n=10) auf den freien intrazellulären Gehalt stoffwechselphysiologisch bedeutsamer Amino- (10-16 Mol/ PMN; MW \pm SD; n=10) und α -Ketosäuren (10-17 Mol/ PMN; MW \pm SD; n=10) in PMN. *= p \leq 0.05 versus Kontrolle.	86

7.4 Abkürzungsverzeichnis

α -Aba	α -Aminobuttersäure
ABTS	2,2'-Azino-di(3-ethylbenzthiazolin)-Sulfonsäure
Ala	Alanin
Ala-Gln	Alanyl-Glutamin
ALI	Acute lung injury
ARDS	Acute respiratory distress syndrome
Arg	Arginin
Asn	Asparagin
Asp	Asparaginsäure
BCAA	Verzweigt-kettige Aminosäure (engl. Branched-chain amino acid)
bzw.	Beziehungsweise
c	Zenti (10^{-2})
c.a.	circa
Cit	Citrullin
CO ₂	Kohlendioxid
DFMO	α -Difluoromethylornithin
DNA	Deoxyribonucleic Acid (Desoxyribonukleinsäure)
DON	6-Diazo-5-Oxo-L-Norleucin
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetraazetat
EP	Ethylpyruvat
e.z.	extrazellulär
f	Femto (10^{-15})
g	Gramm
Gln	Glutamin
Glu	Glutaminsäure
Gly	Glycin
h	Stunde (lat. hora)
H ⁺	Wasserstoffion
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HCL	Salzsäure
His	Histidin
HOBr	Hypobromit

HOCL	Hypochlorid
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
H-Tau	Hypotaurin
I.E.	Internationale Einheit
Ile	Isoleucin
I.S.	Interner Standard
i.z.	intrazellulär
α -KB	α -Ketobutyrat
α -KG	α -Ketoglutarat
α -KIC	α -Ketoisocapronat
α -KIV	α -Ketoisovalerianat
α -KMV	α -Keto- β -methylvalerianat
α -KV	α -Ketovalerianat
l	Liter
Leu	Leucin
Lys	Lysin
m	Meter
m	Milli (10^{-3})
M	Molare Konzentration
Met	Methionin
μ	Mikro (10^{-6})
min	Minute
MPO	Myeloperoxidase
MW	Mittelwert
n	Nano (10^{-9})
NaCL	Natriumchlorid
NADH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
NADP ⁺	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat, oxidiert
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat, reduziert
NaOH	Natronlauge
NF- κ B	(nuclear factor kappa-light-chain-enhancer von aktivierten B-Zellen)
NO	Stickstoffmonoxid
NZV	PMN-Einzelzellvolumen
O ₂	Sauerstoff

O ₂ ⁻	Superoxidanion
¹ O ₂	Singulett-sauerstoff
O ₃	Ozon
OH·	Hydroxylradikal
OPA	o-Phtaldialdehyd
Orn	Ornithin
p	Pico (10 ⁻¹²)
PBS	Phosphate Buffered Saline
PDA	o-Phenyldiamin
Phe	Phenylalanin
PhePYR	p-Hydroxy-Phenylpyruvat
PMN	Polymorphkernige Neutrophile Granulozyten
PSI	Pounds Per Square Inch (Druckeinheit)
PYR	Pyruvat
RNA	Ribonucleic Acid (Ribonukleinsäure)
ROS	Reactive Oxygen Species
RP-HPLC	Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography
s	Sekunde
SD	Standardabweichung
Ser	Serin
SOD	Superoxiddismutase
t	Zeit (engl. time)
Tau	Taurin
TauCL	Taurinchloramin
TCA-Zyklus	Zitratzyklus (Tricarbon-Acid-Cycle)
Thr	Threonin
Trp	Tryptophan
Tyr	Tyrosin
Val	Valin
VK	Variationskoeffizient

7.5 Eigene Publikationen

Mathioudakis D und Lüthen C.

„Wrapped it up!“ Ultra-fast-tracking the unsecured intracranial aneurysm. J Neurosurg Anesthesiol 2007; 19 (3) 203.

Mathioudakis D, Engel J, Welters ID, Dehne MG, Matejec R, Harbach H, Henrich M, Schwandner T, Fuchs M, Weismüller K, Scheffer GJ, Mühling J.

Pyruvate: immunonutritional effects on neutrophil intracellular amino or alpha-keto acid profiles and reactive oxygen species production.

Amino Acids 2011; 40: 1077-90.

Menon PR, Doenst T, Ender J, Mohr FW, **Mathioudakis D**.

Surgical treatment of an aorto-right atrial fistula as a complication of tricuspid valve repair.

Thorac Cardiovasc Surg 2011; 59 (4): 250 – 2

Ender J, Eibel S, Mukherjee C, **Mathioudakis D**, Borger MA, Jacobs S, Mohr FW, Falk V.

Prediction of the annuloplasty ring size in patients undergoing mitral valve repair using real-time three-dimensional transoesophageal echocardiography.

Eur J Echocardiogr 2011; 12(6): 445–453.

Mathioudakis D.

One drip is too much! Contamination in intravenous injectate.

BJA online, e-letters Published 19 March 2012

http://bj.oxfordjournals.org/forum/topic/brjana_el%3B8586

7.6 Erklärung

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten 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 sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Diana Mathioudakis

7.7 Danksagung

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

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Jörg Mühling, MBA für die Überlassung des Themas, für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und der labortechnischen Mittel und vor allem für seine exzellente Betreuung und Hilfe.

Bei Frau Birgit Weber und den medizinisch technischen Assistentinnen der Klinik für Anästhesiologie, Intensivmedizin und Schmerztherapie möchte ich mich für ihre Geduld und hervorragende Unterstützung bei der technischen Durchführung der Experimente bedanken.

Ich danke auch Herrn Prof. Dr. Hansjörg Teschemacher und Frau Beate Dickopf des Rudolf-Buchheim-Instituts für Pharmakologie Gießen für die sehr gute Zusammenarbeit und die Lyophilisierung meiner Proben.

Ferner danke ich Herrn Prof. Dr. J. Dudeck und seinen Mitarbeitern vom Institut für Medizinische Informatik der Justus-Liebig-Universität Giessen für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung und Interpretation der vorliegenden Ergebnisse.

Ich möchte mich an dieser Stelle vor allem bei Frau Ute Elisabeth Flieger, M.A. bedanken, die jeden Weg mit mir gegangen ist!