

**HPLC – Methode zur Messung von Leukotrienen im Liquor
cerebrospinalis bei Patienten mit Subarachnoidalblutung**

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Humanmedizin
der Justus – Liebig Universität Gießen

vorgelegt von
Alexandros Mourtzis
aus Darmstadt

Gießen 2004

Aus dem Medizinischem Zentrum für Neurologie und Neurochirurgie
des Univrstätätsklinikums Gießen

Neurochirurgische Klinik

Direktor: Prof. Dr. med. D.-K. Böker

Gutachter: Prof. Dr. Winking

Gutachter: Prof. Dr. Dr. Katz

Tag der Disputation: 24.06.2005

meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS.....	6
1. EINLEITUNG.....	7
1.1 Allgemeiner Abschnitt	8
1.1.1 Wirkungsspektrum der Leukotriene	11
1.2 Analyseverfahren für Leukotriene	17
1.2.1 Bioassay.....	17
1.2.2 Massenspektrometrie	18
1.2.3 Immunoassay	20
1.2.4 High Performance Liquid Chromatography (HPLC)	24
1.2.4.1 Einführung	24
1.2.4.1.1 UV - Absorption.....	25
1.2.4.1.2 HPLC - Säulen	25
1.2.4.1.3 Flussmittel.....	26
1.2.4.1.4 Eluat aus Cys - LT.....	26
1.2.4.1.5 Quantifizierung des Cys - LT Eluats	27
1.2.4.2 Erste HPLC Verfahren zur Aufschlüsselung der SRS - A.....	27
1.2.4.3 HPLC mit vorheriger einfacher Kartuschenextraktion	28
1.2.4.4 Andere HPLC - Methoden	30
2. FRAGESTELLUNG.....	32
3. MATERIAL UND METHODEN.....	33
3.1 Begriffserläuterung.....	33
3.2 Reagenzien und Standards.....	35
3.3 Apparatur	35
3.3.1 Stickstoffdruckgefäßsystem.....	35
3.3.2 HPLC - Säulen.....	36
3.3.2.1 Vorsäulen	36
3.3.2.2 Hauptsäule.....	37
3.3.3 UV - Detektor	37
3.3.4 Integrator.....	37
3.4 Vorversuche zum Aufbau einer HPLC - Methode.....	41
3.4.1 Variierung der Vorsäulen.....	41
3.4.2 Variierung der Flussmittel	44
3.4.3 20 - TF (E ₄ und B ₄) als alternative interne Standards zu PGB ₂	44
3.4.4 Probenaufbereitung für die Pinkerton 4,6 x 250 mm Säule	45
3.5 Probenmessung mit der HPLC - Methode (Zweisäulen HPLC - Schema mit Zwischenschlaufe)	46
3.5.1 Untersuchungsgut	46
3.5.2 Aufbereitung der Patientenproben.....	46
3.5.3 Leukotrienwiederfindung.....	47
3.5.4 Chromatographie	47
3.5.5 ELISA.....	47
3.5.6 Auswertung und statistische Methoden	48

4. ERGEBNISSE	49
4.1 Vorversuche zum Aufbau einer HPLC - Methode.....	49
4.1.1 Variierung von Vorsäulen und Flussmittel	49
4.1.2 20 - TF (E ₄ und B ₄) als alternativer interner Standard zu PGB ₂	56
4.2 Zweisäulensystem mit Zwischenschlaufe	57
4.3 Sensitivität der Analysemethode (Zweisäulen HPLC - Schema mit Zwischenschlaufe und ELISA).....	62
4.5 Leukotrienwiederfindung, Wiederholbarkeit und Spezifität der HPLC - Methode	63
4.6 Auswertung der Messergebnisse.....	65
5. DISKUSSION	66
5.1 Vorsäulen.....	66
5.2 20 - TF (E ₄ und B ₄) als alternativer interner Standard	67
5.3 Probenaufbereitung zur Gewährleistung einer konstanten Flussgeschwindigkeit	69
5.4 Vergleich von HPLC - Methoden mit integriertem Extraktionsschritt.....	70
5.5 Leukotrienwiederfindung und Wiederholbarkeit der Methode	73
5.6 Kritik der Methode.....	74
5.7 Schlussfolgerungen.....	77
5.8 Ausblick	78
6. LITERATURVERZEICHNIS	79
7. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	97
8. ZUSAMMENFASSUNG	99
9. SUMMARY	101
10. DANKSAGUNG	103
11. LEBENS LAUF	104

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abb. 1 Biosynthese der Leukotriene	8
Abb. 2 Modell einer LTD4 - induzierten Signaltransduktion	10
Abb. 3 a HPLC – Apparatur: Übersicht	38
Abb. 3 b HPLC – Apparatur: Detailansicht.....	39
Abb. 4 Pinkerton 4,6 x 250 mm - Säule und Inertsil ODS 4 x 250 mm - Säule..	40
Abb. 5 Einsäulen HPLC – Schema.....	42
Abb. 6 Zweisäulen HPLC - Schema mit einer Vor- und einer Hauptsäule	43
Abb. 7 Einsäulen - Chromatographie der LT (C ₄ , D ₄ und E ₄ Standard - Mixtur) auf der Pinkerton 2 x 20 mm Vorsäule	49
Abb. 8 Chromatographie der LT (C ₄ , D ₄ und E ₄ Standard - Mixtur) im Zweisäulensystem (Pinkerton 2 x 20 mm Vorsäule, 4 x 250 mm Inertsil ODS Hauptsäule) ohne Liquor und mit Liquor ohne und mit pH - Einstellung	51
Abb. 10 Einsäulen - Chromatographie der LT (E ₄ , D ₄ und C ₄ Standard - Mixtur) auf der Pinkerton 4,6 x 250 mm - Säule.....	55
Abb. 11 Zweisäulen HPLC - Schema mit Zwischenschlaufe. (Pink.: Pinkerton- Säule, Inertsil: Inertsil-Säule, Det.: Detektor, Pos.: Position).....	59
Tabelle 1 HPLC - Programm.....	60
Abb. 12 HPLC von 20 - TFE ₄ und von LT (C ₄ , D ₄ und E ₄) - Standard im Zweisäulen HPLC - Schema mit Zwischenschlaufe.	61
Abb. 13 HPLC einer typischen Patientenliquorprobe mit 20 - TFE ₄ als interner Standard im Zweisäulen HPLC - Schema mit Zwischenschlaufe.....	62
Abb. 14 Verdünnungskurve.....	63
Tabelle 2 Wiederfindung der einzelnen Leukotriene in Prozent ± Standardabweichung im Zweisäulen HPLC - Schema mit Zwischenschlaufe.	64
Tabelle 3 Mittelwerte der Leukotriene in Pikogramm pro Milliliter ± Standardabweichung	65
Abb. 15 Darstellung der Meßergebnisse im Balkendiagramm.....	65

1. Einleitung

Zahlreiche tierexperimentelle und klinische Studien zeigen, dass Leukotriene eine zentrale Stellung, sowohl in der Diagnostik, als auch beim Verlauf mehrerer Erkrankungen haben. So korreliert z.B. eine erhöhte Leukotrienkonzentration im Liquor cerebrospinalis nach Subarachnoidalblutung mit einem symptomatischen Vasospasmus der Cerebralgefäße (PAOLETTI et al. 1988).

Der Nachweis von Leukotrienen in biologischen Proben wird häufig durch eine standardisierte Chromatographie durchgeführt mit nachfolgender Quantifizierung mittels eines Immunoassays (KUMLIN 1996).

Ziel dieser Studie ist es, eine alternative Meßmethode zum Nachweis von Cysteinyl - Leukotrienen (Cys - LT) im Liquor cerebrospinalis zu entwickeln. Dabei sind sowohl Patientenproben als auch Proben mit bekannten Leukotrien - Konzentrationen untersucht worden.

1.1 Allgemeiner Abschnitt

Über den Cyclooxygenase - Weg wird Arachidonsäure zu Prostaglandinen und Thromboxanen synthetisiert. Der Metabolismus der Leukotriene erfolgt initial über das Enzym 5 - Lipoxygenase (5 - LO) zur Synthese des instabilen Metaboliten Leukotrien A₄ (LTA₄).

Durch das Enzym LTA₄ - Hydrolase findet die Synthese zu Leukotrien B₄ (LTB₄) statt. Ein anderer Syntheseweg führt über die Leukotrien C₄ (LTC₄) - Synthase und Glutathion zu LTC₄ und weiter über die alpha - Glutamyltranspeptidase zu Leukotrien D₄ (LTD₄). Durch die Aminopeptidase wird LTD₄ zu Leukotrien E₄ (LTE₄) umgewandelt (Abb. 1).

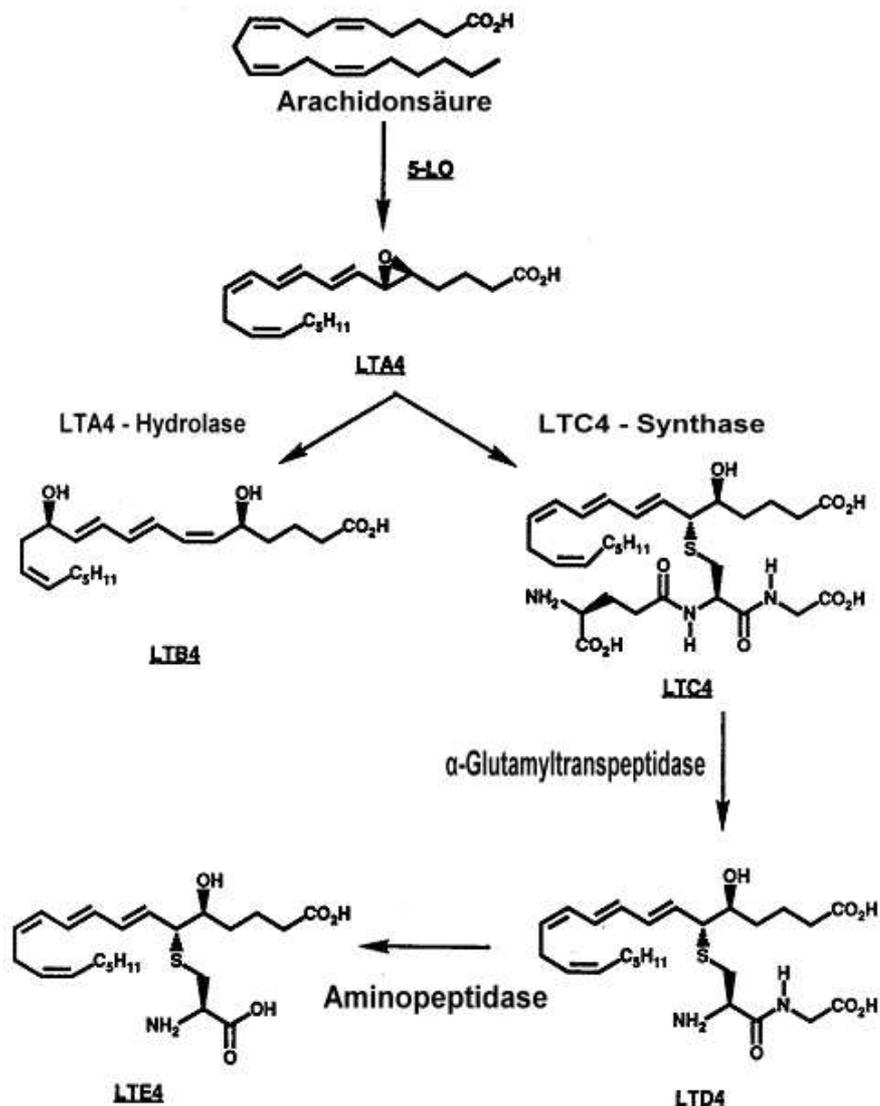


Abb. 1 Biosynthese der Leukotriene

LTC₄, D₄ und E₄ werden aufgrund ihres Cysteinylrestes im Peptidanteil auch als Cysteinyl - Leukotriene (Cys - LT) bezeichnet.

Weitere Synthesewege der Arachidonsäure finden über die 15 -, 12 - und 5 - Lipoxygenase statt, wobei 15 -, 12 - und 5 - Hydroxyeicosatetraensäure (HETE) entstehen (SAMUELSSON 1983).

Unter dem Einfluss von Thrombozyten und neutrophilen Granulozyten, die bei Entzündungen und thrombotischem Geschehen freigesetzt werden, wird die Leukotriensynthese gesteigert (MACLOUF et al. 1989).

Die Metabolisierung findet sowohl renal, als auch in der Leber statt (HAGMANN et al. 1984 und KEPPLER 1988). Nach KEPPLER et al. (1985) liegen die Halbwertszeiten im Blut von LTC₄ bei 12 sec und von LTD₄ bei 30 sec, während danach hauptsächlich das stabile LTE₄ nachzuweisen ist. Im Gegensatz zu den anderen Zellsystemen gestaltet sich der Abbau von LTC₄ über LTD₄ zu LTE₄ im Hirngewebe langsamer (SPECTOR und GOETZL 1986).

Cys - LT sind im Liquor in höheren Konzentrationen als Prostaglandine vorhanden, während dieses Verhältnis im Hirngewebe und in kultivierten Astrozyten umgekehrt ist. Die Cyclooxygenase ist membrangebunden und benötigt freie Arachidonsäuren entweder aus endogenen Phospholipidpools oder aus exogenen Quellen. Die Lipoxygenase wird enzymatisch aus dem Zytosol in die Zellmembran transloziert und mit einem spezifischen Aktivierungsprotein gekoppelt. Hierdurch werden Fettsäurevorstufen aus Fettdepots zugänglich. Zur Freisetzung muss eine zusätzliche Stoffwechselaktivierung erfolgen, z.B. durch PAF. Beide Systeme, sowohl Cyclo - als auch Lipoxygenasestoffwechsel können unabhängig voneinander in einer Zelle existieren (SPECTOR und GOETZL 1986).

Leukotrien - induzierte Effekte kommen über eine Interaktion mit spezifischen Plasmamembranrezeptoren zustande (SARAU et al. 1987). Stellvertretend hierfür wird der bislang am besten erforschte LTD₄ - Rezeptor dargestellt, der mindestens ein Dimer darstellt, wobei eine der Untereinheiten eine Molekularmasse von 70 K Da besitzt (WATANABE et al. 1990).

SJÖLANDER und GRÖNROOS (1994) fanden heraus, dass LTD₄ in menschlichen epithelialen Zelllinien ein Kalziumsignal induziert, das sowohl von der intrazellulären Mobilisation als auch vom Kalziumeinstrom abhängig ist. Erzeugt wird es über die Aktivierung zweier G - Protein Wege. Die intrazelluläre Kalziummobilisation und der nachfolgende Kalziumeinstrom werden über ein pertussistoxinsensibles G - Protein reguliert (Abb. 2). Ferner nimmt ein LTD₄ - induzierter zellulärer Anstieg von cAMP an der Regulierung des Kalziumsignals teil. Dieser Anstieg ist sowohl direkt abhängig vom durch LTD₄ induzierten Kalziumeinstrom, als auch vermutlich durch eine Aktivierung von Proteinkinase A und eine spätere Phosphorylierung eines Plasmamembrankanals (SJÖLANDER und GRÖNROOS 1994).

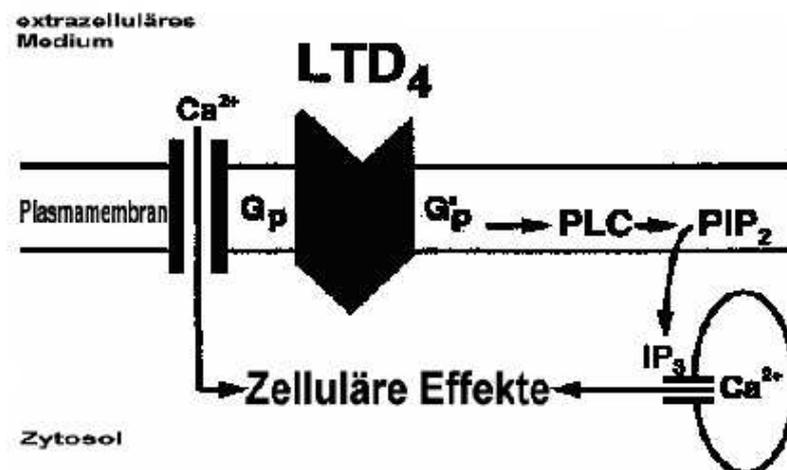


Abb. 2 Modell einer LTD₄ - induzierten Signaltransduktion. G_p: G Protein, G'_p: ein verändertes G Protein, PLC: Phospholipase C, PIP₂: Phosphatidylinositolbiphosphat, IP₃: Inositoltriphosphat

1.1.1 Wirkungsspektrum der Leukotriene

Die chemotaktisch wirkende Substanz LTB_4 (FORD - HUTCHINSON et al. 1980) und die überwiegend spasmogen wirkenden Leukotriene LTC_4 , LTD_4 und LTE_4 (DAHLEN et al. 1980) sind die pharmakologisch relevanten Verbindungen.

Beim Asthma bronchiale können Bronchokonstriktion, Bronchialwandverdickung, eine erhöhte muköse Sekretion und eine Hypersensitivität auf konstringierende Stimuli durch ein inhalatives Antigen wie z.B. Birkenpollen getriggert oder durch Cys - LT ausgelöst werden (FEUERSTEIN 1985). Nach O`BYRNE (2000) spielen LTB_4 über die Chemotaxis von neutrophilen und eosinophilen Granulozyten und Cys - LT (Chemotaxis von eosinophilen Granulozyten) eine wichtige Rolle in der Entzündungsreaktion des Asthmas.

Die Leukotrienfreisetzung aus dem Lungengewebe kann sowohl durch allergene [z.B. inhalative Antigene (FEUERSTEIN 1985)], als auch durch nicht - allergene Auslöser, z.B. chemotaktische Peptide wie FMLP (HAMEL et al. 1984), Thrombozyten - aktivierender Faktor (PAF) (BEAUBIEN et al. 1984), Phagozytose stimulierende Substanzen (WILLIAMS et al. 1984), Komplementkomponente C5a (STIMLER et al. 1982), Kalzium Ionophor A 23187 (SCHULZ und SEEGER 1986) und bakterielles Endotoxin (HAGMANN et al. 1984) aktiviert oder gefördert werden. Ähnliche Ergebnisse zeigten SALARI et al. (1986) bei Experimenten mit nasalen Polypen von Patienten mit allergischer Rhinitis.

TANIGUCHI et al. (1985) sahen eosinophile Granulozyten als Quelle von erhöhten LTC_4 - Werten im peripheren Blut bei intrinsischem und extrinsischem Asthma.

Zusammen mit LTD_4 und LTE_4 ist LTC_4 im Vergleich zu Histamin ein potenterer Bronchokonstriktor. Es spricht schlecht auf Antihistaminika oder Anticholinergika an (JONES et al. 1982). Eine durch Cys - LT ausgelöste Bronchokonstriktion beginnt zeitlich später, dauert länger an und erniedrigt die pulmonale Compliance eher als die Resistance (DRAZEN et al. 1982). Durch Cys - LT Aerosol kommt diese Wirkung eher zum Tragen als bei intravenöser Gabe (WEISS et al. 1982).

Außerdem stimulieren LTC_4 und LTD_4 die muköse Sekretion (MAROM et al. 1982) und steigern die Ödemneigung über eine erhöhte vaskuläre Permeabilität (WOODWARD et al. 1983).

Bei der Therapie des Asthmas konnten bislang durch die Rezeptorantagonisten Montelukast, Zafirlukast und durch den 5 - Lipoxygenase - Hemmer Zileuton gute Resultate im Hinblick auf die Bronchokonstriktion (verbesserte forcierte expiratorische Volumina in einer Sekunde) und die Verhinderung von Asthmaanfällen erzielt werden (MISSION et al. 1999).

Die kardiovaskulären Effekte von Cys - LT äußern sich insbesondere beim kardiogenen Schock: Hier haben sie Einfluss auf die Reduktion des koronaren Flows, die herabgesetzte myokardiale Kontraktilität, sowie die Reduktion der kardialen Auswurfleistung. Gleichzeitig können sie eine Arrhythmie auslösen (SALARI 1986).

Ferner führen Cys - LT beim Schock zu einer pulmonalen Dysfunktion und zu einer Hämatokriterhöhung. (HAGMANN et al. 1985).

Auch gibt es Hinweise, dass besonders LTB_4 über eine chemotaktische Anhäufung von neutrophilen Granulozyten in ischämischen Myokardbezirken zur Gewebläsion beim Myokardinfarkt beiträgt (GOLDMAN und GOETZL 1982).

Während es Hinweise für eine Leukotrienbiosynthese in den Nieren gibt (PIROTZKY et al. 1984), ist es fraglich, ob dies zu einer Veränderung des Blutflusses führt (CHAPNICK 1984).

BAUD et al. (1985) berichteten, dass Cys - LT, an menschlichen glomerulären Epithelzellen binden und deren Proliferation fördern. Durch die Gabe des Leukotrienrezeptorantagonisten FPL 55712 wird dieser Vorgang blockiert.

LTB_4 ist bei Nephritiden erhöht und trägt über seine chemotaktische Wirkung zur Entzündungsreaktion bei. Es fördert gemeinsam mit Prostaglandin E_2 (PGE_2) die Natrium - Ausscheidung (HEBERT et al. 1985).

Bei Hauterkrankungen richtet sich das Interesse auf einen Einfluss der Cys - LT in der Pathogenese von Psoriasis: Bei intradermaler oder topischer Applikation von Leukotrienen wurde eine entzündete Haut oder eine epidermale Hyperplasie beobachtet (JONES et al. 1989). Ursachen hierfür sind einerseits der gesteigerte Blutfluss (KLEMP 1985), andererseits die gesteigerte Thymidin - Aufnahme in der DNA durch Cys - LT (KRAGBALLE et al. 1987). Auch spielt eine gesteigerte Proliferation der Keratinozyten (BAUER et al. 1986) eine wichtige Rolle. Der Nachweis von erhöhten Leukotrienkonzentrationen im Bereich der Läsionen bekräftigt diese Annahme (HAMMARSTRÖM et al. 1975).

Eine Behandlung mit Kortikosteroiden soll u.a. über eine Erzeugung von endogenen Inhibitoren des Phospholipasen - und Arachidonsäuremetabolismus zu einer Besserung der Symptome führen (HAMMARSTRÖM et al. 1977).

Ebenfalls gute Fortschritte in der Psoriasisbehandlung erzielte die topische Anwendung des Lipoxygenase - Hemmers RS - 43179 (LASSUS und FORSSTROM 1985).

Bei allergischen Hauterkrankungen betonten BISGAARD et al. (1985) den Einfluss von Cys - LT auf die Pathogenese.

FORD - HUTCHINSON (1985) zeigte, dass Leukotriene als potentielle Entzündungsmediatoren wirken, indem sie neben einer Leukozytenmigration auch eine erhöhte vaskuläre Permeabilität und eine Schmerzantwort induzieren können. Z. B. konnten geringe Mengen von LTB₄ in der Synovialflüssigkeit von rheumatisch veränderten Gelenken (DAVIDSON et al. 1983) und größere Mengen in der Synovia von Gichtpatienten gefunden werden (SERHAN et al. 1984).

Für die Entzündungsreaktion bei Gicht wird u.a. eine Stimulierung der Synthese von Arachidonsäuremetaboliten durch Natriumurat über neutrophile Granulozyten und Thrombozyten, in denen u. a. LTB₄ - synthetisiert wird, verantwortlich gemacht (SERHAN et al. 1984).

Bei entzündlich - purulenten peritonealen Exsudaten ist ebenso eine Erhöhung von neutrophilen Granulozyten und von LTB_4 festzustellen (KIKAWA et al. 1986), wie bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (Kolitis ulcerosa und M. Crohn) mit mukosalen Ulzerationen. Sulfosalazine und Kortikosteroide bewirken dabei im Gegensatz zu nichtsteroidalen Antiphlogistika eine Hemmung der Lipoxygenase in der Mukosa (SHARON und STENSON 1984).

Nach SPECTOR und GOETZL (1986) werden im Hypothalamus und anderen Teilen des Gehirns [Neurone, Glia, Gefäßwandbestandteile und Ependymzellen (MINAMI et al. 1991)] physiologische Mengen von Leukotrienen produziert, die bei Verletzung über Leukozyten an die entsprechenden Areale herangebracht werden. Durch ein energieabhängiges aktives Transportsystem im Plexus choroideus erfolgt ein Transfer von LTC_4 von den inneren Liquorräumen zum Blutgefäßsystem.

Neben seiner vermeintlichen Funktion als Neuromodulator, der zur schnellen Ausschüttung von LH beiträgt, zeigt LTC_4 gemeinsam mit den anderen Cys - LT besondere vasoaktive Effekte: Dazu gehören Erhöhung der Albuminpermeabilität und eine Vasokonstriktion der cerebralen Arteriolen. Diese führen zu einem vaskulären oder zellulären Hirnödem nach Ischämie, bzw. zu einem Vasospasmus. Über die Beteiligung der Cys - LT am Hirnödem existieren jedoch gegensätzliche Auffassungen (UNTERBERG et al. 1991).

IRKEC et al. (1989) stellten im Serum und im Liquor eine Erhöhung von LTC_4 - Werten bei Patienten mit Multipler Sklerose (MS), M. Behcet und Neurobehcet fest und unterstrichen die Mitwirkung bei der Pathogenese. NEU et al. (1992) fanden neben erhöhten LTB_4 - Werten ebenfalls signifikant erhöhte LTC_4 - Konzentrationen im Liquor bei MS - Patienten. Entsprechende Resultate zeigten sich auch bei DORE - DUFFY et al. (1991) bei aktiver und progressiver MS.

HAUPTS et al. (1992) entdeckten signifikant hohe LTC₄ - Werte im lumbalen Liquor cerebrospinalis bei entzündlichen Erkrankungen wie Meningitis, Polyradikulitis oder Meningoencephalitis, jedoch nicht bei Multipler Sklerose (Erstmanifestation, chronisch - progressiv und remittierend - rezidivierend).

Bei ihren Untersuchungen an Tumorgewebe von Patienten mit malignem Astrozytom stellten WINKING et al. (1992) fest, dass die spontane Freisetzung von Cys - LT mit der Ausscheidungsrate im Urin korreliert, wenn die Werte durch das Tumolvolumen, welches zuvor computertomographisch bestimmt wurde, korrigiert wurden. Nach der neurochirurgischen Tumorextirpation wurde ein deutlicher Abfall der LTE₄ - Ausscheidung im Urin verzeichnet.

Beim posthämorrhagischen Hydrozephalus von frühgeborenen Säuglingen wiesen WHITE et al. (1990) einen Zusammenhang u.a. zwischen Leukotrienerhöhung und der Indikation zur Operation nach.

Auch bei schweren Gehirnverletzungen wurden erhöhte LTC₄ - Werte im Liquor nachgewiesen (WESTCOTT et al. 1987).

BUSIJA und LEFFLER (1986) zeigten im Tiermodell eine arteriell cerebrale Vasokonstriktion nach Applikation von Cys - LT. Gleichzeitig erfolgte eine Steigerung der Konzentration von Prostaglandinen und deren Derivate. Durch Freisetzung von vasodilatativ wirkendem PGE₂ und PGI₂ wurde die Vasokonstriktion antagonisiert. PAOLETTI et al. (1988) wiesen nach Subarachnoidalblutungen einen gesteigerten Arachidonsäuremetabolismus über den Lipoxygenaseweg nach. Bei insgesamt erhöhten LTC₄ - Werten im Liquor war die Steigerung im cisternalen im Vergleich zum lumbalen Liquor stärker ausgeprägt. Dieses wurde als Teil der biologischen Antwort in den perianeurysmalen subarachnoidalen Zisternen nach der Blutung angesehen. Die höheren Cys - LT Werte bei Patienten mit Vasospasmus zeigten möglicherweise einen Zusammenhang zwischen dieser Komponente und dem Vasospasmus und oder spiegelten die Gewebsreaktion auf Entwicklung eines ischämischen cerebralen Schadens wider. WINKING et al. (1997) bekräftigten diese Studien durch den Nachweis einer positiven Korrelation

zwischen LTC₄ - Werten und dem Grad des Vasospasmus mittels Dopplersonographie bei Patienten mit klinisch manifester Subarachnoidalblutung.

Entscheidend für die Aktivierung des 5 - Lipoxygenase Syntheseweges ist der Kontakt zwischen Blut - und Gehirnzellen. Im Tiermodell konnte an Ratten gezeigt werden, dass die Leukotriensynthese im Hirngewebe durch α - Thrombin stimuliert werden kann (WINKING et al. 1996). In einer weiteren Studie an Patienten mit spontaner intracerebraler Blutung bekräftigten WINKING et al. (1998) diesen Aktivierungsprozess durch Messung der Cys - LT - Ausscheidung im Urin. Ferner zeigten sie eine signifikante Korrelation der Messwerte sowohl zum Volumen des intracerebralen Hämatoms als auch zum Volumen des Hirnödems.

Damit ergeben sich deutliche Hinweise, dass Cys - LT in der Entwicklung des posthämorrhagischen Hirnödems beteiligt sind.

1.2 Analyseverfahren für Leukotriene

Im Folgenden werden die gängigen zur Analyse von Cys - LT eingesetzten Verfahren vorgestellt. Nicht berücksichtigt wurde die Dünnschichtchromatographie (GRANSTRÖM 1982), die in der Literatur seltener zum Einsatz kam.

1.2.1 Bioassay

FELDBERG et al. (1938) charakterisierten erstmals Cys - LT als Slow reacting substance of anaphylaxis (SRS - A) während des Studiums der Effekte von Kobragift an verschiedenen Geweben:

Dabei wurde eine unbekannte Substanz auf mit Atropin vorbereitetem Meerschweinchenileum analysiert. Hierbei kam es zu einer ungewöhnlich langsamen und anhaltenden Kontraktion im Vergleich zu Histamin.

BROCKLEHURST (1973) war einer der ersten Forscher, die Meerschweinchenileum zur Bestimmung der SRS - A verwendeten.

In der Folgezeit wurden von mehreren Autoren Standardbedingungen für diese Methode definiert (PARKER et al. 1982, ORANGE et al. 1967, LIEBIG et al. 1975, COCHRANE und MÜLLER - EBERHARD 1968):

Bei 37 °C erfolgte in oxygenierter Tyrode - Lösung oder Krebs - Bikarbonat - Lösung unter geringem passiven Druck und in Anwesenheit von geeigneten selektiven Blockern die Suspension von isolierten Gewebstreifen aus Meerschweinchenileum.

Die Spezifität dieser Analyse wurde unter anderem durch die Zugabe von Antihistaminika (Mepyramin), Anticholinergika (Atropin) und β - Blockern (Timolol) gewährleistet.

Die Standardisierung erfolgte unter Verwendung von bekannten LTD₄ - Konzentrationen. Dabei wurde die kontraktile Aktivität, die den SRS - A - Leukotrienen zugeschrieben war, durch eine Serienverdünnung angegeben, um konzentrationsabhängige Effekte einer bekannten Menge von Histamin oder LTD₄ zu determinieren. Abschließend erfolgte in Gegenwart des Leukotrienrezeptorantagonisten FPL 55712 die Wiederholung des Tests auf diesem Gewebe. Eine Kontraktion war jetzt nicht mehr nachweisbar.

Eine Erweiterung dieser Methode erfolgte durch Computerisierung (FLEISCH et al. 1979) und durch Automatisierung (PONG und DEHAVEN 1983).

Mit diesem Bioassayverfahren konnte man zwar die biologische Aktivität der Cys - LT in biologischen Proben bestimmen. Jedoch war es ohne vorherige Auftrennung, z.B. mittels HPLC (CLANCY UND HUGLI 1983) nicht möglich, anhand der Muskelkontraktion auf die einzelne Substanz zu schließen. Nach GIRARD et al. (1982) wird durch die siebenfache LTC₄ und die 170fache LTE₄ - Menge eine vergleichbare Kontraktion wie bei LTD₄ erreicht.

Eine andere Form des Bioassays bot sich im Tiermodell bei Meerschweinchen durch Messung der Extravasation von Plasmaproteinen nach intravenöser Injektion von Cys - LT durch Verwendung von Evans - Blau (HUA et al. 1985), Albumin (ROKACH et al. 1984) oder über die Bestimmung eines Hämatokritanstieges (HANDLEY et al. 1986). Wie bei (GIRARD et al. 1982) zeigte LTD₄ eine höhere biologische Aktivität als LTC₄ oder LTE₄ im Hinblick auf die Extravasation (WOODWARD und LEDGARD 1985).

Verwendung fand dieses Verfahren bei der Messung von freigesetzten Leukotrienen nach Exposition mit Antigenen (z.B. Birkenpollen) oder Kalzium Ionophor A 23187 als in vivo - Bioassay der Leukotriensynthese (GARCEAU und FORD - HUTCHINSON 1987).

1.2.2 Massenspektrometrie

Sowohl beim Nachweis der Molekülstruktur durch die Arbeiten von (ORANGE et al. 1973, MURPHY et al. 1979, MORRIS et al. 1980, OHNISHI et al. 1980, FORD - HUTCHINSON et al. 1980, GIRARD et al. 1982 und DAMON et al. 1983), als auch bei der quantitativen Analyse von Produkten des Lipoxygenasestoffwechsels, spielte die Massenspektrometrie eine wichtige Rolle. Ihre Sensitivität lag im ng bis pg - Bereich.

Bei der Quantifizierung von Cys - LT verwendeten BALAZY und MURPHY (1986) eine Elektroneneinfang Gaschromatographie - Massenspektrometrie, die beim Nachweis von LTC₄ zum Einsatz kam.

Die Leukotriene wurden zuerst durch Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography (RP - HPLC), auf die in Abschnitt 1.2.4.1 noch ausführlich eingegangen wird, isoliert, anschließend getrocknet und in Methanol (MeOH) mit [¹⁸O]5 - HETE, das als interner Standard (siehe Abschnitt 1.2.4.1) fungierte, erneut gelöst. Nachfolgend erreichte man durch Entfernung des Peptidanteils des Moleküls und Umwandlung in 5 - Hydroxeicosaen Säure (5 - HEA) eine Zunahme der Flüchtigkeit. Nach der Metabolisierung zu einem Pentafluorobenzylester und Konversion zum Trimethylsilylether erfolgte die Analyse. Die Sensitivität dieses Verfahrens lag im unteren pg - Bereich für biologische Proben bei einer Wiederfindung von 75% für Cys - LT.

MAAS et al. (1983) beschrieben eine Methode für die Bestimmung von LTC₄ und LTE₄ unter Verwendung einer desorptionschemischen Ionisations- - Massenspektrometrie. Eine Derivatisierung der polaren funktionellen Gruppe ist wie bei der Elektroneneinfang Gaschromatographie - Massenspektrometrie für die Analyse notwendig. Sie betonten, dass z. B. N - Methyl - Bis - Trifluoroacetamid (MBTFA) effizient LTE₄ oder LTC₄ Dimethyl Ester in ihre Bis - TFA Derivate im ng - Bereich unter neutralen Bedingungen konvertieren kann. Die Hydroxylgruppe, die als OTFA - Gruppe derivatisiert wurde, konnte unter Aussetzung mit wasserhaltigem MeOH prompt hydrolysiert werden.

Die Verwendung der Fast Atom Bombardement (FAB) - Massenspektrometrie wurde von MURPHY et al. (1982) demonstriert. Dieses Verfahren ermöglichte den direkten Nachweis von nicht - flüchtigen Substanzen, wie z.B. LTC₄:

Biologisches LTC₄ wurde mit Kalzium Ionophor A 23187 stimuliert, nachdem es, wie auch synthetisches LTC₄ zuvor, aus biologischen Proben extrahiert wurde. Die FAB - Massenspektrometrie erfolgte nach tropfenweiser Auftragung der Proben auf einem dünnen Glycerolfilm.

TAYLOR und MORRIS (1983) beschrieben diese Methode unter Verwendung von 1 - 5 µg LTC₄ und LTD₄. Sie zeigten, dass durch radioaktive Markierung der freien Aminogruppen der Leukotrienmoleküle, die mit Acet - Anhydrid und O6 Acet - Anhydrid 1 : 1 reagierten, die Zahl der freien Aminogruppen im Molekül und damit auch die Konzentration der Substanz determiniert werden konnte.

Die Verwendung von Thermospray HPLC - Massenspektrometrie erfolgte durch TAYLOR und WATSON (1987) unter anderem für die Analyse von LTC₄, LTD₄, LTE₄ und LTB₄. Hierbei wurden die Leukotriene als negativ geladenes Ion detektiert. Die Detektionsgrenze lag bei 1 ng für jede Substanz.

1.2.3 Immunoassay

Nachdem 1980 und in der Folgezeit die Möglichkeit des Erwerbs ausreichender Mengen von künstlich hergestellten Leukotrienen bestand, konnten viele Forschungsgruppen die Reagenzien für einen Immunoassay herstellen (YOUNG und GIRARD 1989):

Bei der Entwicklung eines Nachweises für Cys - LT durch die MERCK - Gruppe (YOUNG et al. 1982, HAYES et al. 1983, ROKACH et al. 1984), wurden Konjugate von LTC₄ als Immunogene verwendet.

Zu Beginn der Entwicklung war LTC₄ von ausreichend hoher spezifischer Aktivität nicht erhältlich, so dass zwei Konjugate präpariert wurden (jedes mit komplett unterschiedlichen Proteinen und gekoppelten Agenzien), um den initialen Gebrauch der Einphasen - Immunoradioassay - Technik (SPIRA) zu ermöglichen (VOLLER et al. 1976): In dieser Technik ist das zweite Konjugat über das Protein auf Polystyren Mikrotiterplatten adsorbiert und erlaubt eine Komplettierung mit dem freien Liganden für den Antikörper. Die Entfernung des freien Antigen - Antikörper Komplexes durch Waschen erlaubt die nachfolgende Quantifizierung der Anzahl an Antikörpern, die auf dem auf Kunststoff fixierten Antigen gebunden ist. Dies erfolgt unter Einsatz eines zweiten, radioaktiven Antikörpers, der auf den ersten Antikörper gerichtet ist.

Für LTC₄ wurden Kopplungsprozeduren entwickelt, um eine Reaktion mit der freien Aminogruppe des Glutamyl - Restes zu erzeugen und eindeutige, homogene Konjugate herzustellen. Dabei wurden nicht - Peptid Kopplungsagenzien verwendet, um die Peptideinheit des LTC₄ außerhalb des Innenraumes des Carrierproteins zu stellen (YOUNG et al. 1982). Frühere Studien hatten ergeben, dass die Acylation der freien Amine von N - Acetyl LTD₄ die biologische Aktivität nicht signifikant verändern. Hierdurch kann diese Gruppe reagieren ohne die räumliche Struktur des Moleküls zu verändern (YOUNG und GIRARD 1989).

Aufgrund der starken Immunogenität des Carrierproteins wurde das verwendete keyhole - limpet – hemocyanin - Konjugat (KLH - Konjugat) als Immunogen verwendet: Kaninchen, die nach einem Standardschema immunisiert wurden, produzierten alle viel Anti - LTC₄. Die abgeleiteten Antisera wurden initial durch die SPIRA - Technik analysiert.

Nachdem [³H]LTC₄ mit suffizienter Radioaktivität erhältlich war, konnte hierfür ein Radioimmunoassay (RIA) erfolgreich entwickelt werden.

Die Kreuzreaktivität im RIA war bei den Isomeren (5S, 6R) - und (5R, 6R) - LTC₄ mit 100% am höchsten, während 11 - trans LTD₄ 60,5% und LTD₄ 55,3% aufwies. LTE₄ zeigte eine Kreuzreaktivität von 8,6%. Die Kreuzreaktivität des als interner Standard bei der HPLC verwendeten Prostaglandins B₂ (PGB₂) lag unter 0,002%.

Das funktionelle Detektionslimit lag bei 5 ng LTC₄/ml analysierter Flüssigkeit (YOUNG et al. 1982, HAYES et al. 1983, ROKACH et al. 1984).

Weitere RIA, die auf Antisera gegen LTC₄ basierten, waren in der Folgezeit der Ansatz von AEHRINGHAUS et al. (1982) mit einer Sensitivität von 20 ng LTC₄/0,6 ml und Kreuzreaktivitäten von 16% für LTD₄ und unter 1,5% für Fettsäuren, Prostaglandine und Glutathion.

WYNALDA et al. (1984) entwickelten ein Verfahren mit einer Detektionsgrenze von 0,1 ng LTC₄ pro Bestimmung, das sehr gut reproduzierbar war und die Fähigkeit besaß, hinzugegebenes LTC₄ in plättchenreichem Plasma mit einer Wiederfindung von 95% nachzuweisen. Die Kreuzreaktivität gegenüber LTD₄ und LTE₄ lag unter 2%.

Jedoch wurden aufgrund von hohen Glutathionkonzentrationen in biologischen Proben trotz einer mit 0,2% geringen Kreuzreaktivität vermehrt falsch positive Ergebnisse bestimmt.

Bei LINDGREN et al. (1983) lag eine Sensitivität von 10 pg/100ml Test - Lösung vor. Die Spezifität für LTC₄ war sehr hoch, mit signifikanten Kreuzreaktionen nur bei engen Analoga wie 11 -Trans - LTC₄ , LTC₅ und LTC₃ (jeweils 100%), während LTD₄ und LTC₄ weniger als 1% und Glutathion weniger als 0,01% aufwiesen.

Auf Antisera gegen LTD₄ basierte die Veröffentlichung von LEVINE et al. (1981). Trotz des Gebrauchs von LTD₄ als Immunogen war die Spezifität von LTC₄ höher (100% gegenüber 65% bei LTD₄). Die Kreuzreaktivität für LTE₄ betrug 46%. Unter einer HPLC - Vortrennung lag die Detektionsgrenze für LT (C₄, D₄ und E₄) bei jeweils 0,2 ng.

AHARONY et al. (1983) berichteten über einen RIA, der ausgehend von LTD₄ (100%) LTC₄ mit 59% und LTE₄ mit 57% detektierte. Die Sensitivität lag zwischen 5 und 10 ng/50 µl Testsubstanz.

Bei BEAUBIEN et al. (1984) betrug die Spezifität ebenfalls ausgehend von LTD₄ 17% für LTE₄ und 7% für LTC₄, bei einer Detektionsgrenze von 5 pg LTD₄/ml Testlösung. Durch die Kombination dieses RIA mit einer HPLC - Vortrennung, konnten die Autoren die Nützlichkeit dieser Prozedur demonstrieren, um Leukotriene, die durch PAF stimuliert wurden, aus Rattenblut zu detektieren. Auch konnte ein Nachweis von LTD₄ im menschlichen Blut und seine Metabolisierung zu LTE₄ erfolgen.

Ein RIA, das auf LTE₄ – Antisera gerichtet war, prägte den Ansatz von HOPPE et al. (1986) mit einer Sensitivität von 30 ng LTE₄ pro Bestimmung. Die Kreuzreaktivität lag ausgehend von LTE₄ (100%) bei 40% für LTC₄ und bei 13% für LTD₄.

Unter Verwendung der Antisera für den RIA entwickelte die MERCK - Gruppe ein Enzyme - Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) (MILLER et al. 1985): Dabei wurden die Polystyren Mikrotiter Platten mit dem zweiten Konjugat von LTC₄ (LTC₄ - DNP - BSA) entwickelt. Nachfolgend erfolgte eine Inkubation mit der Testprobe, bis das Äquilibrium erreicht war. Die Platten wurden gewaschen und mit einem zweiten, an Fluoreszein gebundenem Antikörper inkubiert. Danach wurde ein dritter Antikörper, Kaninchen Anti - Fluoreszein, welches an ein Alkalin Phosphatase Enzym gebunden war, dazugegeben und inkubiert. Nach erneutem Waschen wurde der Anteil von gebundenen Enzymen durch die Konversion einer bekannten Konzentration von p - Nitrophenolphosphat zu p - Nitrophenol über Spektrophotometrie bestimmt.

Eine andere ELISA - Methode, die das gleiche Antiserum von HOPPE et al. (1986) zur Grundlage hatte, wurde von PRADELLES et al. (1985) entwickelt. Die Sensitivität lag mit 40 pg/ml etwas schlechter als der RIA mit 10 pg/ml.

RIA und ELISA sind bei identischer Sensitivität sehr gut vergleichbar. Mit geringeren Kosten, durch Vermeidung des Gebrauchs von Radioaktivität und verminderter Belastung der Umwelt haben ELISA Vorteile. Sowohl die Fluoreszein - Konjugation zum zweiten Antikörper, als auch die Zeit der finalen Enzyminkubation haben den Effekt, die Sensitivität dieses Assays zu vervielfachen. Die Nachteile liegen in der Verwendung mehrerer Arbeitsschritte und in einer geringeren Spezifität im Vergleich zum RIA.

1.2.4 High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

1.2.4.1 Einführung

Zahlreiche Studien zeigen, dass HPLC eine sehr effektive Methode darstellt, um Arachidonsäuremetabolite zu separieren, zu reinigen und zu identifizieren (YOUNG und GIRARD 1989).

Die Analyse erfolgte unter anderem aus biologischen Proben wie Bronchiallavageflüssigkeit (LAM et al. 1988), Plasma (SASAI 1987, OKUBO et al. 1987), Liquor (WESTCOTT et al. 1987), Zellinkubationsmischungen (PICKETT und DOUGLAS 1985, POWELL 1987, RICHMOND et al. 1987) und Urin (SIMMET et al. 1990).

Die Trennung eines Substanzgemisches in einzelne Komponenten erfolgt in einer Säule, die aus einem Rohr besteht, das an beiden Enden mit porösen Fritten oder Sieben durch entsprechende Anschlüsse verschlossen ist. Der Inhalt enthält die stationäre Phase, die aus einem dichten Verband von ebenfalls porösen Teilchen besteht (UNGER 1989). Die am meisten verwendeten Säulengrößen auf diesem Gebiet liegen in den Dimensionen 4,6 x 250 mm und 4,0 x 390 mm und sind mit chemisch unterschiedlich beschaffenem Packungsmaterial (Körner) mit Partikeldurchmesser zwischen 3 und 10 µm gefüllt (YOUNG und GIRARD 1989). Das Flussmittel (mobile Phase) strömt durch die Körner und durch das Volumen zwischen den Körnern der Packung. Die stationäre Phase ist eine Grenzschicht an der gesamten Oberfläche der Porenwände der Körner des Packungsmaterials. Von dieser gehen Anziehungskräfte aus, die die zu analysierenden Substanzen für kurze Zeit adsorbieren, um sie dann erneut in das Flussmittel abzugeben (UNGER 1989). Demnach wird vom Flussmittel erwartet, dass die Substanzprobe im Flussmittel löslich ist, die stationäre Phase vom Flussmittel benetzt wird, sich ein Verteilungsgleichgewicht der gelösten Proben zwischen den beiden Phasen einstellt und dass die Probe wieder vollständig die Säule verlässt (REICHERT 1989).

Unter konstanten chromatographischen Bedingungen erscheint eine reine Substanz immer mit derselben Retentionszeit (Zeit von der Injektion bis zum Durchbruch des Peakmaximums auf dem Chromatogramm) (UNGER 1989).

1.2.4.1.1 UV - Absorption

Aufgrund der starken Absorption der konjugierten Polyene, zu denen die Lipoxigenaseprodukte gehören, erfolgt die Detektion durch UV - Licht.

DiHETEs und Leukotriene, die eine konjugierte Trien - Bindung mit einem Absorptionsmaximum zwischen 260 und 290 nm besitzen, werden bevorzugt in diesem Bereich detektiert (BORGEAT et al. 1990).

1.2.4.1.2 HPLC - Säulen

Bei der stationären Phase unterscheidet man grundsätzlich zwischen zwei Typen von Phasensystemen, der Normalphase mit einer polaren und der Reversed Phase (RP) mit einer unpolaren stationären Phase (JOST und BOOS 1989).

Normalphasen werden für die Trennung von nicht - polaren Metaboliten (HETES und diHETES) und von Abkömmlingen der polaren Metabolite verwendet. Dabei ist Hexan mit einem geringen Prozentanteil von 2 - Propanol und 0,01 bis 0,1 %iger Acetat - Puffer das Flussmittel der Wahl für die Analyse von nicht - polaren Metaboliten (YOUNG und GIRARD 1989).

Reversed Phasen (RP) wie Octadecyl Silica (ODS) kommen ebenfalls vermehrt bei Metaboliten der Arachidonsäure zur Anwendung. Sie erlauben eine Separierung von Komponenten mit leichten Differenzen in der Polarität, was bei Leukotrienen der Fall ist. Hingegen führen Extraktionen mit organischen Lösungen nur zur Trennung der Lipidfraktion (KUMLIN und DAHLEN 1990).

1.2.4.1.3 Flussmittel

Die Flussmittel zur Elution der polaren Metabolite (Leukotriene) enthalten zumeist 60 bis 70%igen Methanol (MeOH) in H₂O, welchem 0,02 bis 0,1%iger Acetat - Puffer zugesetzt ist (YOUNG und GIRARD 1989). Ein auf MeOH basierendes Flussmittel führt zu einer guten Trennung der Cys - LT (OSBORNE et al. 1983); die Zuführung von Essigsäure und Ammoniumhydroxid bewirkt eine Maximierung der Schärfe von eluierten Peaks und eine Steigerung der Reproduzierbarkeit durch Ionenpaarung der freien Karboxyl - und Aminogruppen von LTC₄ und LTD₄ (METZ et al. 1982). Die pH - Einstellung des Puffers zwischen 5,6 und 5,8 mit Ammoniumhydroxid führt zu einer sehr guten Trennung der Cys - LT (ABE et al. 1985). Gleichzeitig ist es wichtig, konstante Versuchsbedingungen einzuhalten, da die Retentionszeiten der Cys - LT aufgrund ihrer Peptid Seitenketten durch pH - Veränderungen stark beeinflussbar sind.

Alternativ kommt im Flussmittel auch anstelle von MeOH Acetonitril in gleichem Verhältnis zum Einsatz (YOUNG und GIRARD 1989). Trifluoroessigsäure (TFA) und Phosphorsäure werden ebenfalls als Zusatz verwendet (YU und POWELL 1995).

1.2.4.1.4 Eluat aus Cys - LT

Die Cys - LT Elution bei RP - Säulentypen mit Partikelgrößen zwischen 3 und 5 µm erfolgt in der Reihenfolge LTC₄, LTD₄ und LTE₄. Liegt der pH - Wert des Pufferanteiles des Flussmittels bei $\leq 4,0$, so findet keine Änderung in der Reihenfolge statt; auch ein interner Standard PGB₂ (siehe Abschnitt 1.2.4.1.4) bleibt bei der Elution unbeeinflusst.

Bei pH - Erniedrigung wird eine Verlängerung der Retentionszeiten beobachtet. Hier eluiert bei pH 4,0 LTD₄ nach LTE₄ (YOUNG und GIRARD 1989). Die extreme Sensitivität der Retentionszeiten der Cys - LT auf pH - Veränderungen, vor allem zwischen 3 und 5, wurde in einigen Fällen speziell verwendet, um die Selektivität für die Analyse dieser Komponenten zu erhöhen (POWELL 1985, MATHEWS et al. 1981, BORGEAT et al. 1984).

1.2.4.1.5 Quantifizierung des Cys - LT Eluats

Die quantitative Analyse erfolgt durch Peakhöhen- oder Flächenmessung: Bei der Eichung mit Hilfe eines externen Standards muss die Reinsubstanz zur Verfügung stehen. Dabei werden Eichlösungen mit abgestufter Konzentration hergestellt und mit konstantem Injektionsvolumen im System chromatographiert.

Bei der Eichung mit Hilfe eines internen Standards wird der Probenmischung eine bekannte Substanz zugesetzt, so dass alle Fehler, die bei der Probenaufbereitung, der Dosierung und der Trennung auftreten, ausgeschaltet werden. Diese soll ähnliche chromatographische Eigenschaften wie die zu bestimmende Substanz besitzen (UNGER 1989). Aufgrund dieser Eigenschaften wurden PGB₂ und 12 - Hydroxy - 5, 8, 10 - Heptadecatrien Säure (HHT) am häufigsten in dieser Funktion verwendet (YOUNG und GIRARD 1989).

1.2.4.2 Erste HPLC Verfahren zur Aufschlüsselung der SRS - A

Zur Isolierung der SRS - A entwickelten MORRIS et al. (1978) ein besonderes Procedere, welches HPLC - Techniken am Ende des Reinigungsschrittes enthielt. Die Reinigung erlaubte ihnen, durch UV - Spektroskopie das charakteristische Triplet mit einem Absorptionsmaximum von 279 nm zu identifizieren.

MURPHY et al. (1979) isolierten die SRS - A durch ein Procedere, das zwei aufeinander folgende Reversed - Phase Separationen als letzten Reinigungsschritt beinhaltet, aus Murein von Mastrozytomzellen. Damit konnten sie zeigen, dass auf der Grundlage von Isotopeninkorporationsexperimenten, Spektroskopie und chemischen Degradierungen die SRS - A ein cysteinenthaltendes Derivat der 5 - Hydroxy - 7, 9, 11, 14 - Eicosatetraen Säure ist. Hierdurch wurde mit Hilfe der HPLC die komplette Aufklärung der Struktur der SRS - A möglich.

COREY et al. (1980) entdeckten LTC₄, während LTD₄ von MORRIS et al. (1980) erschlossen wurde. Sie fanden heraus, dass die SRS - A in biologischem Material aus LTC₄, LTD₄ oder einer Mischung dieser Substanzen einschließlich LTE₄ zusammengesetzt war. Auch wurden vier unterschiedliche LTD₄ - Epimeren durch HPLC isoliert (YOUNG und GIRARD 1989).

1.2.4.3 HPLC mit vorheriger einfacher Kartuschenextraktion

Es werden Methoden beschrieben, die einen zumeist manuellen Extraktionsschritt zur Probenaufbereitung mittels Einweg Octadecyl Silyl Silica (ODS) - Kartusche nach POWELL (1980) enthalten. Diese nutzt die Differenzen in der Polarität der Metabolite bei der Trennung aus:

MATHEWS et al. (1981) waren die erste Gruppe, die ein HPLC - Procedere auf Basis einer UV - Absorption entwickelten, um Cys - LT zu trennen und zu quantifizieren: Inkubierte Zellen wurden auf einer XAD - 7 Säule filtriert, konzentriert und vorgereinigt nachdem ihnen Ethanol als Lösungsmittel und PGB₂ als interner Standard zugegeben wurde.

Über Modifikation erreichten METZ et al. (1982) eine verbesserte Reproduzierbarkeit und Sensitivität. Eine schnelle Extraktion von anderen biologischen Substanzen durch Gebrauch von Silica Mini - Säulen (Sep - Pak) führte dazu, dass LTC₄ und sein 11 - Trans - Isomer, LTD₄, LTB₄ und sein 12 - Epi - 11- Trans Isomer innerhalb einer Stunde bestimmt werden konnten. Die HPLC erfolgte durch eine ODS (5 µm, 250 x 4,6 mm) Säule, die an eine ODS -Vorsäule gekoppelt war. Das Flussmittel war zusammengesetzt aus 33% MeOH : 67% H₂O (Acetat 0,08% und Ammoniumhydroxid 0,04%, eingestellt auf pH 6,2).

KÖLLER et al. (1985) benutzten eine ähnliche Methode zur Untersuchung des Metabolismus von LT (B₄, C₄, D₄ und E₄) im menschlichen Blutplasma. Die Proben wurden in MeOH/Formaldehyd gelöst, geschüttelt und zentrifugiert. Nach Verdampfung des Lösungsmittels erfolgte die Lösung in einer Mischung aus MeOH/H₂O.

VERHAGEN et al. (1984) erlaubten mit ihrer schnellen und sensitiven Methode eine simultane Trennung und Quantifizierung von LTC₄, 11 - Trans LTC₄, LTB₄ und Metabolite und HETEs, wobei die Probenlösung, die sie aus der Zentrifugierung von neutrophilen Granulozyten erhielten, in einer C18 - RP - Extraktionssäule vorgetrennt wurde.

Über eine Vortrennung einer klaren Inkubationslösung aus menschlichen Geweben auf einer Sep - Pak C18 und auf einer Sep - Pak Silika Kartusche vor der HPLC - Bestimmung von 14C Prostaglandinen, Leukotrienen und anderen Lipoxygenaseprodukten berichteten ZIJLSTRA und VINCENT (1984). Ähnliche Extraktionsverfahren wurden auch von VERHAGEN et al. (1986) und JUBIZ et al. (1985) beschrieben.

Die Methode von ESKRA et al. (1986) beinhaltete ein schnelles und reliables Extraktionsverfahren, um Leukotriene und HETEs im Blutplasma zu trennen. Dieses wurde auch bei Serum, Synovial -, Bronchoalveolar - Peritoneal - und Tränenflüssigkeit und bei Haut,- Lungen- und Kolonbiopsiematerial erfolgreich angewendet: Zur Proteinpräzipitation wurde 1ml Acetonitril zu 0,5 ml Plasma gegeben, welches vorher mit einer Standardmischung versetzt wurde. Nach Zentrifugierung erfolgte eine pH - Einstellung mit 3,5 ml 1,0 M HCl und die nachfolgende Extraktion durch eine C18 Sep - Pak mittels 5 ml 70% Acetonitril. Die Kartusche wurde vorher mit 5 ml 20% Acetonitril konditioniert. Schließlich erfolgte nach Lösung in 0,3 ml 66% MeOH die Elution des getrockneten Extraktes auf einer kleinen Rainin Microsorb C18 - Säule (3µm, 10 x 46mm). Das Flussmittel bestand aus 80% MeOH : 20% (Trifluoroacetat 0,1% und Trimethylamin 0,05%). Die Gesamtdauer der Chromatographie betrug 10 min, wobei PGB₂ und Leukotriene bei 280 nm in der ersten Hälfte und HETEs bei 235 nm in der zweiten Hälfte detektiert wurden.

HENDEN et al. (1993) berichteten über eine einfache Methode für die Extraktion und Isolation von Dihydroxy - Leukotrienen, LTB₄, LTB₅ und Cys - LT aus menschlichem Plasma unter Gebrauch einer vorbehandelten Kartusche, die hydrophobe und ionenaustauschende Fähigkeiten besaß. Unter PGB₂ als internem Standard wurden 5 ml angesäuertes Plasma oder Acetat - Puffer mit kommerziell erhältlichen Leukotrien- Standards unter Sog durch die Kartusche gebracht.

Die absorbierten Substanzen wurden anschließend schrittweise mit Acetatpuffer, der steigende Mengen von MeOH enthielt, eluiert. Die Analyse erfolgte bei einer Dauer von 30 min durch eine ODS - Silika - Säule.

1.2.4.4 Andere HPLC - Methoden

PETERS et al. (1983) beschrieben die Quantifizierung der häufigsten Arachidonsäuremetabolite durch ein einziges chromatographisches Procedere mit nachfolgendem RIA. Aus menschlichen Lungenmakrophagen separierten sie durch HPLC neben den Hauptprodukten des Cyclooxygenase - Stoffwechselwegs auch Leukotriene und freie Arachidonsäure in einem Gang: Es wurde eine ODS - Säule verwendet bei einer Flussmittelzusammensetzung aus Acetat - Puffer (0,1% pH 3,7) und Acetonitril. Dieses wurde anstelle von MeOH verwendet, da dessen Lichtdurchlässigkeit bei 192 nm liegt, dem Absorptionsmaximum für Prostaglandine. Unter einem Flussmittel - Gradientensystem wurden die meisten Prostaglandine bei 36%, Leukotriene bei 50%, Mono HETEs bei 56% und Arachidonsäure bei 100% Acetonitril eluiert.

HENKE et al. (1984) verwendeten für die HPLC Probenaufbereitung eine Ethanol/H₂O - Lösung, die aus der Zentrifugierung einer konzentrierten und in 30% MeOH/H₂O wiederaufgelösten Mixtur resultierte. Diese einfache Verdampfungstechnik ersparte ihnen den Gebrauch von Chromatographie und anderen zeitaufwendigen Methoden. Die nachfolgende Quantifizierung erfolgte durch RIA.

Der Ansatz von ZILTENER et al. (1983) beinhaltete eine Ionenpaar - RP - HPLC: Mittels einer ODS Säule wurden LTB₄, (5 S, 12 S) - 6 - Trans - LTB₄, (5 S, 12 R) - 6 - Trans - LTB₄, LTC₄ und LTD₄ getrennt.

Das Flussmittel bestand initial aus 70% MeOH : 30% (Essigsäure 0,1% und 1 - Pentansulphonsäure 2,5 mM, eingestellt auf pH 3,9) und am Ende der Chromatographie aus 100% MeOH bei gleichem Essigsäure- und Pentansulphonsäureanteil. 1- Pentansulphonsäure diente dabei als Gegenion, das die lange Retentionszeit von LTC₄ und LTD₄ bei pH 5,7, der optimal ist für eine chromatographische Auflösung, verkürzt. Die zellfreie Lösung, die nach Zentrifugierung der Inkubationsmischung entnommen wurde, wurde vor der HPLC in einer X10 - 7 Säule vorgereinigt und nachfolgend zentrifugiert.

Ein ähnliches Prinzip verwendeten STEFFENRUD und SALARI (1988) durch den Gebrauch von Heptafluorobuttersäure als Flussmittelzusatz zur Analyse von Leukotrienen, Lipoxinen und Abkömmlingen auf der ODS - Säule.

2. Fragestellung

Bislang erfolgte die Quantifizierung der Cys - LT aus biologischen Proben zumeist durch eine HPLC mit nachfolgendem Immunoassay. Vor der HPLC wurde die Probe durch ein manuelles Extraktionsverfahren mittels einer Extraktionskartusche aufbereitet.

Neuere Methoden integrierten diesen Schritt in das HPLC - Procedere, um eine Vereinfachung der Methode und eine bessere Wiederfindung der Substanzen zu erreichen.

Die Erwartungen an die hier zu entwickelnde Methode richten sich vor allem auf die Anwendbarkeit eines HPLC - Verfahrens mit integrierter on - line Extraktion auf blutige Liquorproben.

Weitere Fragen, die sich in diesem Zusammenhang ergeben, sind:

- Wie sind die Gütekriterien dieser Methode beschaffen (Sensitivität, Spezifität, Wiederholbarkeit)?
- Wie hoch ist die Leukotrienwiederfindung?
- In wie weit ist dieses Verfahren in der Routinediagnostik einsetzbar?
- Welche klinische Relevanz besitzt diese Methode im Hinblick auf die Analyse von Cys - LT im Liquor bei Patienten mit Subarachnoidalblutung und anderen Erkrankungen des zentralen Nervensystems?

3. Material und Methoden

3.1 Begriffserläuterung

Absorption: Aufnahme von Licht bestimmter Wellenlänge durch eine Substanz beim Bestrahlen.

Chromatogramm: Aufzeichnung einer Chromatographie.

Cut-off: Das Molgewicht, das als Rückstand zurückbleibt bzw. bei einer Ultrafiltration nicht durch den Filter geht.

Detektion: Maßnahme zum Nachweis von eluierten Substanzen am Säulenende, z.B. über UV - Licht.

Detektionslimit: Geringste, noch nachweisbare Substanzmenge über Detektion. Gewöhnlich wird ein Signal to noise (S/N) - Ratio angegeben.

Diskrimination: Unerwünschte Trennung in der Aufarbeitung, z.B. nach Ultrafiltration von Leukotriensubtypen.

Dotierung: Zugabe einer bekannten Stoffmenge zu einer Probe.

Elution: Vorgang, durch den die zu trennenden Substanzen nach der Injektion von der mobilen Phase durch die Säule transportiert werden.

Flussgeschwindigkeit: Volumen, mit der das Flussmittel pro Zeiteinheit durch die Säule transportiert wird.

Flussmittel: Lösemittel bzw. Lösemittelgemisch, das die zu trennenden bzw. zu isolierenden Substanzen durch die Säule transportiert.

Leukotriensubtypen: Metaboliten der Leukotriensynthese, z.B. Cys - LT.

Peak: Elutionsprofil einer Substanz.

Peakfläche: Integral der Fläche unterhalb des Elutionsprofils einer Substanz und oberhalb der Basislinie

Retention: Verzögerung der zu trennenden Substanzen aufgrund ihrer unterschiedlichen Wechselwirkungen mit der stationären Phase.

Retentionszeit: Zeit zwischen dem Start des chromatographischen Vorgangs und dem Eluieren des Peakmaximums durch den Detektor. Die Zeiten, die im Zusammenhang mit dem Zweisäulen HPLC - Schema angegeben sind, enthalten zusätzlich eine Verweildauer, die der Durchflusszeit des jeweiligen Injektionsvolumens entspricht.

Säulenschaltung: Technik in der HPLC, bei der zwei oder mehrere Säulen durch Schaltventile miteinander verbunden sind und abwechselnd oder in Serie benutzt werden.

Signal to noise (S/N) - Ratio: Ratio der Peakhöhe zur Basislinienbreite und damit Empfindlichkeitseinheit.

3.2 Reagenzien und Standards

Die Standards der LT (C_4 , D_4 und E_4 - Mischung) und von PGB_2 (Sigma - Aldrich, Deisenhofen) wurden 20fach verdünnt. Der Einzelstandard von LTC_4 und die Standardlösungen von 20 - Trifluoroleukotrien (E_4 und B_4) [20 - TF (E_4 und B_4)] (Cayman, Ann Arbor, MI, USA) wurden in 10facher Verdünnung erstellt.

Die Lagerung der Standardlösungen erfolgte bei -20 °C im Gefrierschrank (Liebherr, Ochsenhausen).

H_2O über die Milli-Q Plus Apparatur (Millipore, Eschborn), MeOH (Rathburn, Walkerburn, UK) und alle übrigen Chemikalien (MERCK, Darmstadt) waren von über 99%iger Reinheit.

Die Flussmittel wurden durch einen austauschbaren $0,45\text{ }\mu\text{m}$ Cellulose Mikrofilter (Sartorius, Göttingen) von 47 mm Durchmesser filtriert. Für die Probenvorreinigung wurden Ultrafilter mit einem Cut - off bei 30000 Giga/mol (Amicon, Millipore, Eschborn) und Mikrofilter der Porengröße $0,22\text{ }\mu\text{m}$ (Millipore, Eschborn) verwendet.

pH - Messungen bei Flussmittel und Proben wurden über das pH - Meter pH Boy P2 (Shindengen, Tokio, Japan) durchgeführt.

3.3 Apparatur

Die HPLC - Apparatur (Abb. 3a und b) bestand aus Stickstoffdruckgefäßsystemen (3.3.1), HPLC - Säule(n) (3.3.2), UV - Detektor (3.3.3) und Integrator (3.3.4):

3.3.1 Stickstoffdruckgefäßsystem

Anstelle von Pumpen wurde das HPLC - Flussmittel durch das modifizierte Stickstoffdruckgefäßsystem JN 1 (BCMA von ERC, Mainz und Eigenkonstruktionen) über eine HPLC - Säule gebracht:

Hierbei wurde das Stickstoffgas (Messer – Griesheim, Griesheim) aus dem Druckbehälter über 1/16 inch Stahlkapillaren (Autoclave Engineers, Erie, PA, USA u.a. Hersteller) zum Flussmitteltank (Eigenkonstruktion) übergeleitet. Von dort aus erfolgte eine Weiterleitung des Flussmittels über 0.5 mm große Kapillaren (MERCK, Darmstadt) zur HPLC - Säule.

An den Übergängen zu Druckbehälter, Flussmitteltank und HPLC - Säule waren Nadelventile (SSI, State College, PA, USA) eingebaut, um Flüsse zu starten und zu stoppen.

Die Flussgeschwindigkeit wurde über einen konstanten Gasdruck aufgebaut und durch den Flussregler Liqui - Flow (Bronkhorst, Ruurlo, Niederlande) reguliert.

3.3.2 HPLC - Säulen

Die Injektion der Proben in die HPLC – Säulen (Abb. 4) erfolgte mittels Einspritzpipette (SGE, Weiterstadt) über ein Einspritzventil (Rheodyne, Cotati, CA, USA) mit 2 ml Einspritzschlaufe.

Für die Kopplung von Vor - und Hauptsäule wurde ein Schaltventil (Rheodyne, Cotati, CA, USA) mit 3,2 ml Zwischenschlaufe verwendet.

3.3.2.1 Vorsäulen

Die Chromspher 5 Bio - Matrix (Chrompack, Varian, Darmstadt) und die 2 x 20 mm, 1 x 30 mm, 4,6 x 150 mm und 4,6 x 250 mm Pinkerton (Abb. 4) (Regis - Morton, Grore, IL, USA) mit je 5 µm Partikeldurchmesser wurden bei verschiedenen Flussmittel als Vorsäulen (erste Säulen) für eine Säulenschaltung getestet.

Deren Funktion lag in einer adäquaten qualitativen und quantitativen Trennung von Cys - LT im Liquor vor der Haupttrennung in der Hauptsäule (zweite Säule).

3.3.2.2 Hauptsäule

Die Haupttrennung von Cys - LT erfolgte in der 4 x 250 mm Inertsil ODS (GL Sciences, Tokyo, Japan) (Abb. 4), bei einer konstanten Flussmittelzusammensetzung von 68% MeOH : 32% Acetat - Puffer (0,1%, pH 5,6).

3.3.3 UV - Detektor

Mittels des UV - Wellenlängendetektors SA 6503 (Severn, UK) erfolgte bei einer Wellenlänge von 280 nm die Detektion der Substanzen.

Dieser war der Hauptsäule (und in den Vorversuchen auch der Vorsäule) nachgeschaltet, wobei das Flussmittel mit den getrennten Substanzen nach dem Verlassen der Hauptsäule in den Detektor und von dort aus nach außen floss. Über ein Dreiwegehahnssystem (Eigenkonstruktion) konnten Flussmittelfraktionen aufgesammelt werden.

3.3.4 Integrator

Über eine PC - Integration, die das Signal des Detektors verarbeitete, wurden die chromatographierten und anschließend detektierten Substanzen als Chromatogramme dargestellt.

Dabei waren auf der Ordinate die relative UV - Absorption bei 280 nm und auf der Abszisse die Retentionszeit in Minuten abgebildet.

Ein Peak auf dem Chromatogramm entsprach einer Substanz.

Die Mengenerrechnung wurde bei den Vorversuchen mit dem HP 3394 A Integrator (Hewlett Packard, Bad Homburg) über Integration der Peakflächen durchgeführt. Später wurde die Winflow Radiochromatography Software für PC (JMBS Developments, Grenoble, Frankreich) angewendet.



Abb. 3a HPLC – Apparatur: Übersicht

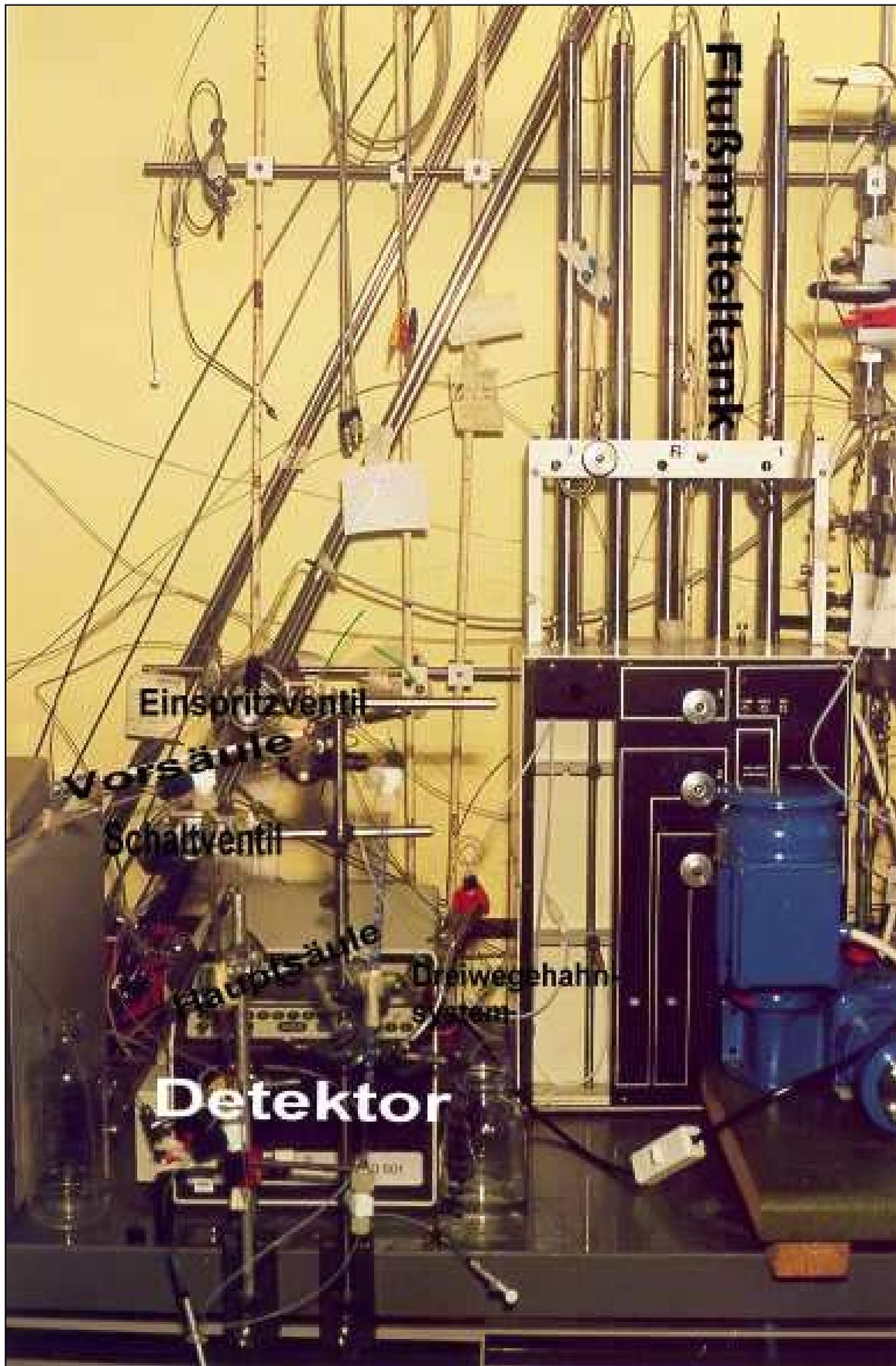


Abb. 3b HPLC – Apparatur: Detailansicht



Abb. 4 Pinkerton 4,6 x 250 mm - Säule (links) und Inertsil ODS 4 x 250 mm - Säule (rechts)

3.4 Vorversuche zum Aufbau einer HPLC - Methode

3.4.1 Variierung der Vorsäulen

Zur Optimierung der Trennung von Liquorproben wurde eine Zweischrittchromatographie in Form einer Säulenschaltung aufgebaut. Neben einer Hauptsäule (4 x 250 mm Inertsil ODS) benötigte diese Methode mindestens eine Vorsäule.

Die in Frage kommenden Vorsäulen wurden bei Flussgeschwindigkeiten zwischen 0,3 und 0,5 ml/min getestet. Sowohl Liquorproben aus einem Patientenpool für Vorversuche, als auch H₂O Proben wurden einzeln oder nach Zugabe einer bekannten Leukotrien - oder PGB₂ - Standardmenge in die Vorsäule injiziert.

Vor der Injektion wurden die Liquorproben zum Teil durch Ultrafiltration aufbereitet. Diese erfolgte durch eine 60minütige Zentrifugierung bei 4°C mit 9000 upm (Radius 12 cm).

Um Partikel von Lösungen zu entfernen wurde mittels einer Mikrofuge (Tomy Seiko Co., Tokyo, Japan) bei 5°C 10 min lang zentrifugiert.

Durch pH - Justierung der Probe auf Werte zwischen 4 und 8 vor der Injektion wurde versucht, die optimale Peakschärfe zu finden.

Die Beurteilung der Qualität der Chromatographie und der Trennleistung der Vorsäule erfolgte überdies in Abhängigkeit zum Probenvolumen.

Die Detektion der Proben erfolgte direkt nach Verlassen der Vorsäule (Abb. 5) oder in Form einer einfachen Säulenschaltung über die Hauptsäule, die über ein Schaltventil an die Vorsäule gekoppelt war (Abb. 6):

Über eine Spritze wurde die Probe in das Einspritzventil injiziert und gelangte zur 2 ml Einspritzschlaufe ("Load" - Stellung, Abb. 5, oberes Bild). Nach Wechsel des Einspritzventils in die "Inject" - Stellung (Abb. 5, unteres Bild) gelangte sie über das Flussmittel der Vorsäule zur Vorsäule und wurde nachfolgend detektiert.

Bei der Detektion über eine einfache Säulenschaltung wurde die Probe in das Einspritzventil injiziert und gelangte zur 2 ml Einspritzschleife ("Load" - Stellung, Abb. 6, Schritt 1, linkes Bild). Nach Wechsel des Einspritzventils in die "Inject" - Stellung (Abb. 6, Schritt 1, rechtes Bild) gelangte sie über das Flussmittel der Vorsäule zur Vorsäule, wo die Vortrennung erfolgte. Flussgeschwindigkeit des Vorsäulenflussmittels und Umschaltzeit des Schaltventils wurden so justiert, dass sich die Probe noch in der Vorsäule befand, um dann nach Betätigung des Schaltventils (Abb. 6, Schritt 2) über das Flussmittel der Hauptsäule auf die Hauptsäule zu gelangen. Dort erfolgte schließlich die Trennung mit nachfolgender Detektion.

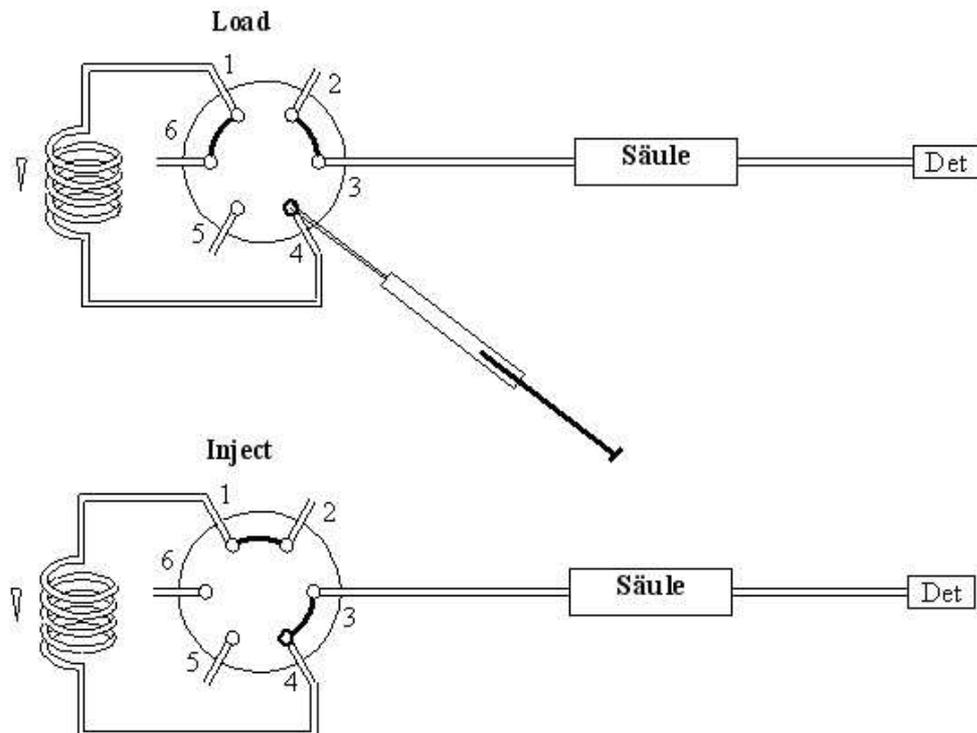


Abb. 5 Einsäulen HPLC – Schema (Det: Detektor)

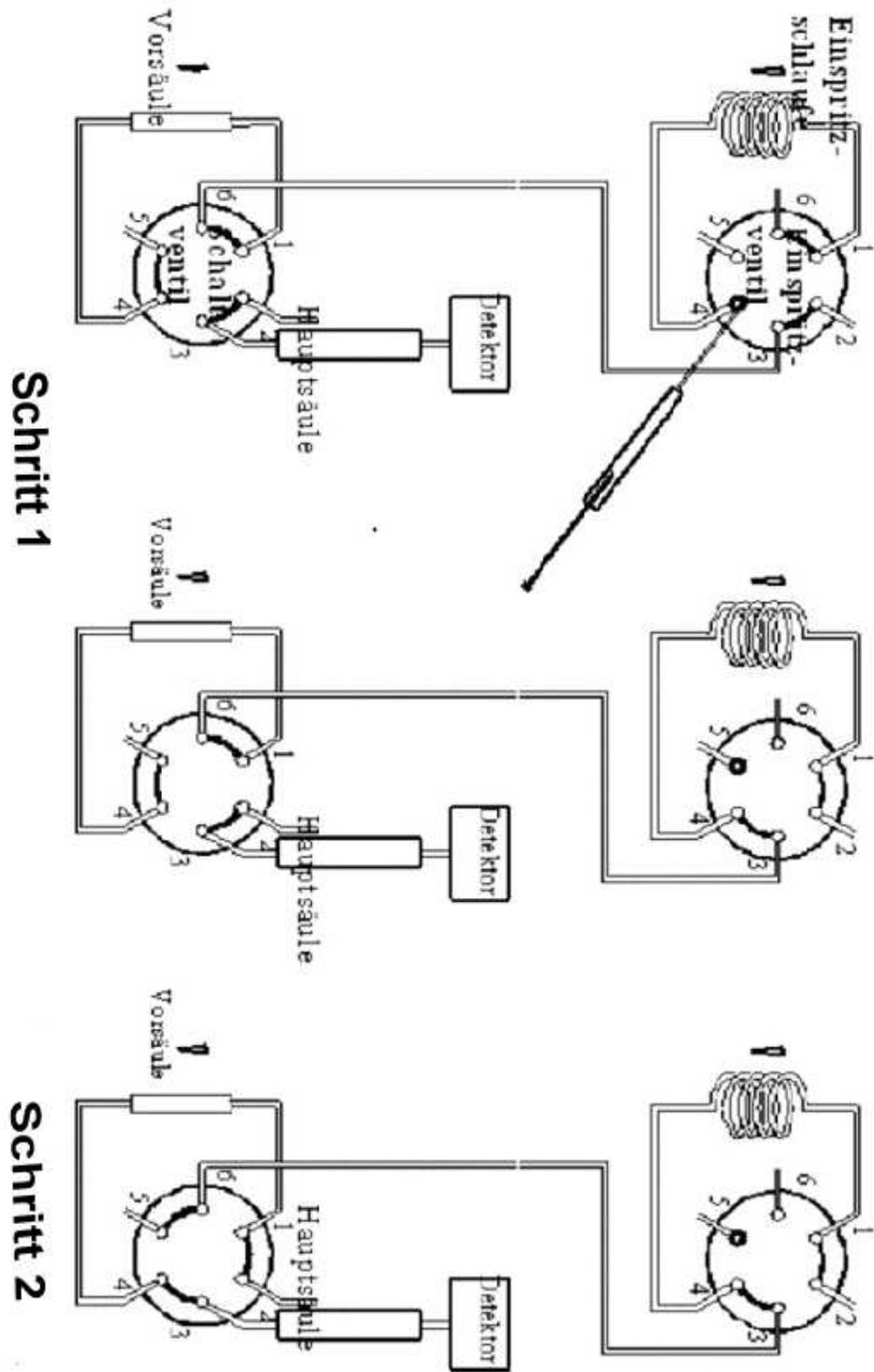


Abb. 6 Zweisäulen HPLC - Schema mit einer Vor- und einer Hauptsäule

Gütekriterien zur Beurteilung der Vorsäulen waren neben der Trennleistung auch die Wiederfindung der in der Probe enthaltenen Arachidonoide. Deren Ermittlung erfolgte entweder relativ oder absolut: Die relative Wiederfindung wurde über das Verhältnis der Peakflächen aus den dotierten Proben der verschiedenen Experimente untereinander bestimmt. Verglich man das Verhältnis der Peakflächen aus den dotierten Proben und aus Arachidonidstandard, der direkt in die Hauptsäule injiziert wurde (Abb. 5), so erhielt man die absolute Wiederfindung.

3.4.2 Variierung der Flussmittel

Um eine gute Vortrennung in der Vorsäule zu erreichen, wurde das Flussmittel über Variation von MeOH - und Acetat - Pufferanteilen optimiert. Für die Pinkerton 4,6 x 250 mm Säule wurden zusätzlich folgende wässrigen Flussmittelphasen getestet, die in einem Anteil von 45% dem MeOH beigemischt wurden: Ammoniumacetat - Karbonat - Puffer (7,5 mM, pH 5,9) und (7,5 mM, pH 6,9), Phosphat (K₂) (1mM pH 6,8), H₂O und zur Beeinflussung der Ionenstärke eine gesättigte Natriumsulfatlösung.

3.4.3 20 - TF (E₄ und B₄) als alternative interne Standards zu PGB₂

Zur Testung eines internen Standards für Patientenprobenmessungen wurden auf der Inertsil ODS 4 x 250 mm - Säule und auf der Pinkerton 4,6 x 250 mm Säule mit der Flussmittelzusammensetzung 55% MeOH : 45% wässriger Acetat - Lösung (0,1% pH 7,2) Standardlösungen von 20 - TF (E₄ und B₄) einzeln und gemeinsam mit Cys - LT - Standardlösungen bestimmt. Die Flussgeschwindigkeiten betragen jeweils 0,5 ml/min.

3.4.4 Probenaufbereitung für die Pinkerton 4,6 x 250 mm Säule

Bei der Vorbereitung zur Injektion auf die 4,6 x 250 mm Pinkerton Vorsäule wurde 1 ml Liquorprobe mit und ohne Zugabe von 200 bzw. 1000 µl MeOH ultrafiltriert. Zur Ermittlung der Wiederfindung erfolgte die Dotierung der Proben mit 20 - TFE₄ und Leukotrien - Standard - Mixtur vor der Ultrafiltration. Zum Vergleich wurde eine Standardprobe aus 1 ml H₂O hergestellt, die entweder keinen oder 200 bzw. 1000 µl MeOH - Zusatz hatte und mit 20 - TFE₄ und Leukotrien - Standard - Mixtur versetzt war. Diese Standardprobe wurde vorher nicht ultrafiltriert.

Um das nach der Ultrafiltration der Liquorprobe verlorene Volumen auszugleichen wurde zur Liquorprobe physiologische Kochsalzlösung gegeben. Bei der mit 200 µl MeOH versetzten Liquorprobe wurde 16%iges MeOH und bei der mit 1000 µl MeOH versetzten Liquorprobe 50%iges MeOH zum Volumenausgleich hinzugegeben. Nachfolgend erfolgte durch Zugabe von 150 µl 1M Acetat - Puffer (pH 5,0) eine pH - Einstellung und schließlich die Injektion der fertigen Probe in die Säule. Die mit 1000 µl MeOH versetzte Probe wurde in späteren Versuchen auf die Hälfte eingedampft.

3.5 Probenmessung mit der HPLC - Methode (Zweisäulen HPLC - Schema mit Zwischenschlaufe)

3.5.1 Untersuchungsgut

Gemessen wurden 35 Liquorproben von 10 Patienten im Alter zwischen 30 und 70 Jahren mit Subarachnoidalblutung. Die Probenentnahme erfolgte aus einer cisternalen Drainage.

Zudem wurden Liquorproben, die gesunden Personen entstammten, als Kontrollproben bestimmt.

Nach Entnahme von 2 ml Liquor erfolgte eine 10minütige Zentrifugierung bei 5°C lang mit 6000 upm (Radius 12cm). Die Proben wurden in Glasröhrchen (Sarstedt, Nümbrecht) bei - 20°C unter Zugabe von 100 µl 0,5 mM EDTA und 100 µl einer 4 - Hydroxy - TEMPO - Lösung als Oxydationsschutz aufbewahrt.

3.5.2 Aufbereitung der Patientenproben

Nach dem Auftauen auf Raumtemperatur wurde aus dem Glasröhrchen 1ml Liquor entnommen und mit 200 µl MeOH (pH 5,0) und 20 µl 20 - TFE₄ (interner Standard) versetzt. Nach Ultrafiltration wurde 150 µl 1 M Acetat - Puffer (pH 5,0) hinzugegeben.

Zur Feststellung von Volumenverlusten durch die Ultrafiltration wurde das Gewicht bestimmt. Diese wurden mit 16%igem MeOH ausgeglichen.

Der Kalibrierungsstandard wurde mit 1 ml H₂O, 200 µl MeOH, 150 µl 1 M Acetat - Puffer (pH 5,0) und jeweils 20 µl 20 - TFE₄ und Leukotrienstandardmischung erstellt.

3.5.3 Leukotrienwiederfindung

10 Proben, die aus je 1ml H₂O, 200 µl MeOH, 20 µl 20 - TFE₄ Standard und 20 µl Leukotrien - Standardmischung zusammengesetzt waren, wurden im Zweisäulen HPLC - Schema mit Zwischenschleife chromatographiert. Das gleiche Procedere erfolgte mit 10 Proben aus einem Liquorpool (zusammengesetzt aus Resten von Routineanalysen).

Beim Untersuchungsgut (Patienten und Kontrollen) erfolgte der Zusatz von 20 - TFE₄ als interner Standard.

3.5.4 Chromatographie

Die aufbereiteten Proben wurden mit Hilfe in Serie geschalteter Chromatographiesäulen und Flussmittel in der HPLC (siehe Abb. 11, Zweisäulen HPLC - Schema mit Zwischenschleife) nach den einzelnen Leukotriensubtypen aufgetrennt.

Diese wurden in einzelne Fraktionen in Polyethylen - Röhrchen (Sarstedt, Nümbrecht) aufgefangen und bei - 20 °C tiefgefroren.

Nach jeder Messreihe wurden beide Säulen jeweils für 10 min mit H₂O und mit Isopropanol gespült.

3.5.5 ELISA

Die nach der HPLC eingefrorenen Fraktionen wurden aufgetaut und deren flüssiger Anteil durch Stickstoff verdampft. Die getrockneten Proben wurden in 500 µl ELISA - Puffer aufgelöst und nach Anleitung der Firma Amersham (Little Chalfont Buckinghamshire, England) bearbeitet und ausgewertet (BIOTRAK, Leukotriene C₄/D₄/E₄ enzymeimmunoassay (EIA) system 1995).

3.5.6 Auswertung und statistische Methoden

Die Wiederfindung der Leukotriene wurde in den Messungen absolut über das Verhältnis der eingegebenen Leukotrienstandardmenge vor der Probenaufbereitung zu der erhaltenen Menge nach der HPLC im Zweisäulen HPLC - Schema mit Zwischenschlaufe bestimmt.

Als Maß für eine 100%ige Wiederfindung wurde die Integration der Peakflächen von Leukotrienstandards nach Einsäulenchromatographie auf der 4 x 250 mm Inertsil ODS - Säule verwendet.

Für die Berechnung der Leukotrienkonzentration in pg/ml wurde die prozentuale Wiederfindung bei der Umrechnungsformel der ELISA - Kits berücksichtigt.

Neben der „Signal to noise“ (S/N) - Ratio, die bei 4,0 lag erfolgte die Sensitivitätsberechnung der HPLC - Methode über die Erstellung einer Verdünnungskurve (Excel, Microsoft, Santa Rosa, USA), um die Höhe der Linearität zu bestimmen.

Die Sensitivität der ELISA - Kits wurde vom Hersteller angegeben.

Die Bestimmung der Signifikanz der Methode erfolgte durch den t - Test für unabhängige Variablen (Excel, Microsoft, Santa Rosa, USA), wobei ein $p < 0,01$ als signifikant angenommen wurde.

Mittelwerte für die Erstellung der Daten wurden aus dem Untersuchungskollektiv (Standardproben, dotierte Poolliquorproben, Patientenproben) mit dazugehöriger Standardabweichung bestimmt.

Lagen einzelne Werte außerhalb der 2 ½ - fachen Standardabweichung, so wurden diese nicht berücksichtigt.

4. Ergebnisse

4.1 Vorversuche zum Aufbau einer HPLC - Methode

4.1.1 Variierung von Vorsäulen und Flussmittel

Infolge der geringeren Retention der Pinkerton 2 x 20 mm Vorsäule im Vergleich zur Inertsil ODS 4 x 250 mm Hauptsäule, wurde als Flussmittel 20% MeOH : 80% Acetat - Puffer (0,1 %, pH 5,6) verwendet. Durch den geringen MeOH - Anteil konnten im Zweisäulen HPLC - Schema mit einer Vor- und einer Hauptsäule (Abb. 6) alle Cys - LT in der Vorsäule zurückgehalten werden. Über das Flussmittel der Hauptsäule, welches mit 68% einen höheren MeOH - Gehalt aufwies, wurden sie auf der Hauptsäule eluiert. In der Einsäulen - Chromatographie mit der Pinkerton 2 x 20 mm Vorsäule (Abb. 7) konnte die gebündelte Elution aller drei Cys - LT als ein großer Peak nach dem Wechsel auf das höherprozentige MeOH - Flussmittel gut dargestellt werden.

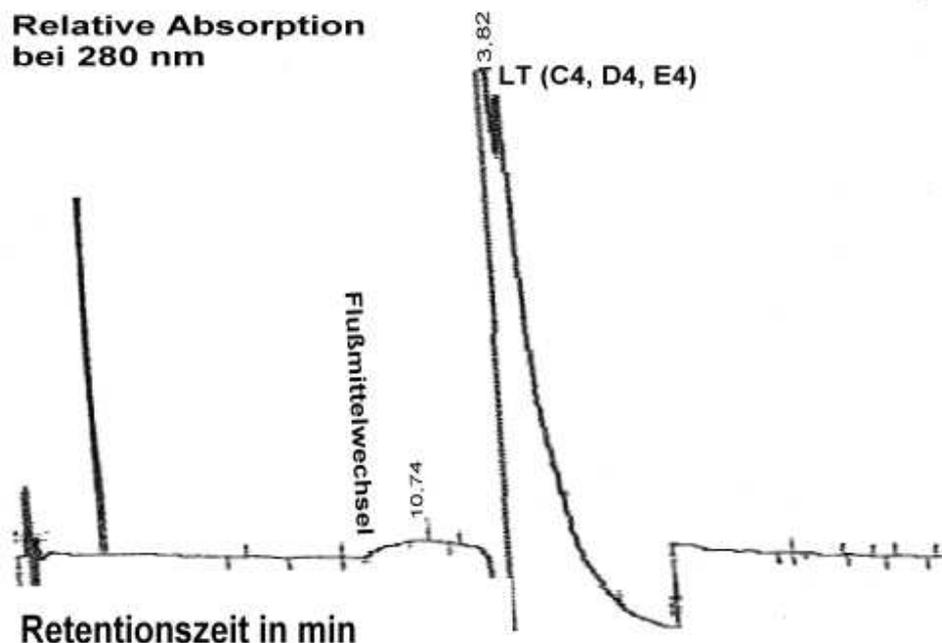


Abb. 7 Einsäulen - Chromatographie der LT (C₄, D₄ und E₄ Standard - Mischung) auf der Pinkerton 2 x 20 mm Vorsäule

Im Zweisäulen HPLC - Schema (Abb. 6) wurde bei einer Umschaltzeit zwischen 3 und 5 min die beste Wiederfindung der Cys - LT erreicht.

Ein Problem ergab sich bei der Elution von PGB₂, das anfangs als interner Standard für die Messung von Patientenproben vorgesehen war:

Mit einem 20%igen MeOH - Anteil im Flussmittel der Vorsäule wurde es auf der Pinkerton 2 x 20 mm Vorsäule schneller als alle Cys - LT retiniert, so dass eine vollständige gemeinsame Elution mit Cys - LT auf der Hauptsäule nicht möglich war.

Im Vergleich zu Standardproben war die Wiederfindung von Cys - LT in dotierten Liquorproben im Zweisäulen HPLC - Schema deutlich vermindert. Daher wurden zur Vermeidung eines möglichen Durchwascheffektes, bei dem ein Teil der zu analysierenden Probe durch die Säule fließt ohne mit dem Packungsmittel in Wechselwirkung zu treten, die Proben vor Eingabe in die Vorsäule durch Zugabe eines Acetat - Puffers auf einen pH - Wert von 5,6 justiert. Dies führte zu einer besseren Wiederfindung (Abb. 8).

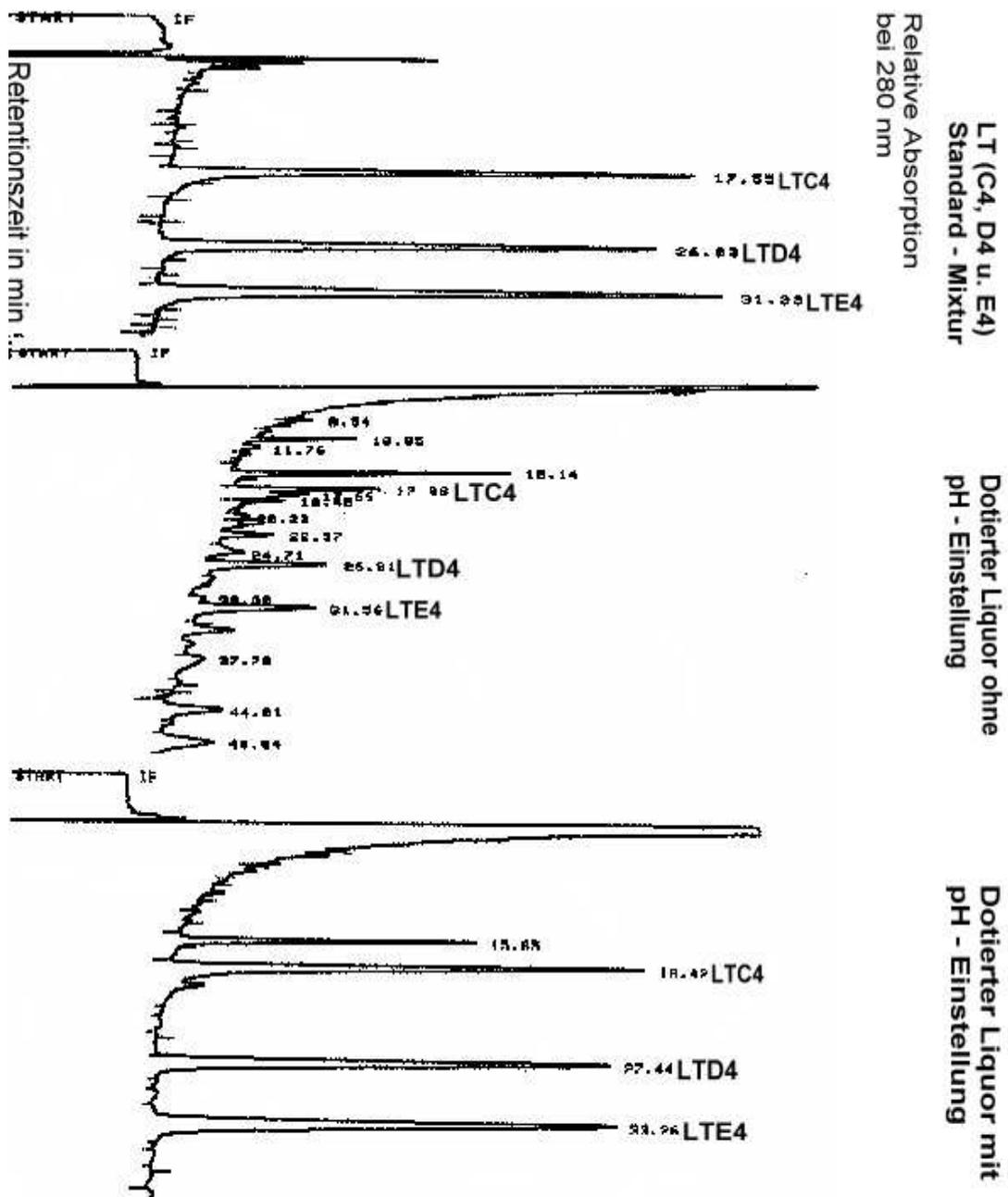


Abb. 8 Chromatographie der LT (C₄, D₄ und E₄ Standard - Mixtur) im Zweisäulensystem (Pinkerton 2 x 20 mm Vorsäule, 4 x 250 mm Inertsil ODS Hauptsäule) ohne Liquor und mit Liquor ohne und mit pH - Einstellung

Bei Liquorprobenmengen bis 200 µl zeigte die Pinkerton 2 x 20 mm Säule eine gute Bündelung der Cys - LT mit guter Matrixtrennung zu Beginn der Chromatographie. Diese gute Trennleistung konnte bei steigenden Probenmengen nicht erreicht werden. Die hohe Absorption überlagerte größtenteils den Zeitraum, in dem die Leukotrienpeaks erschienen. Auch eine initiale Ultrafiltration der Liquorproben vor der Injektion in die Vorsäule führte zu keiner ausreichenden Verbesserung des Resultats (Abb. 9).

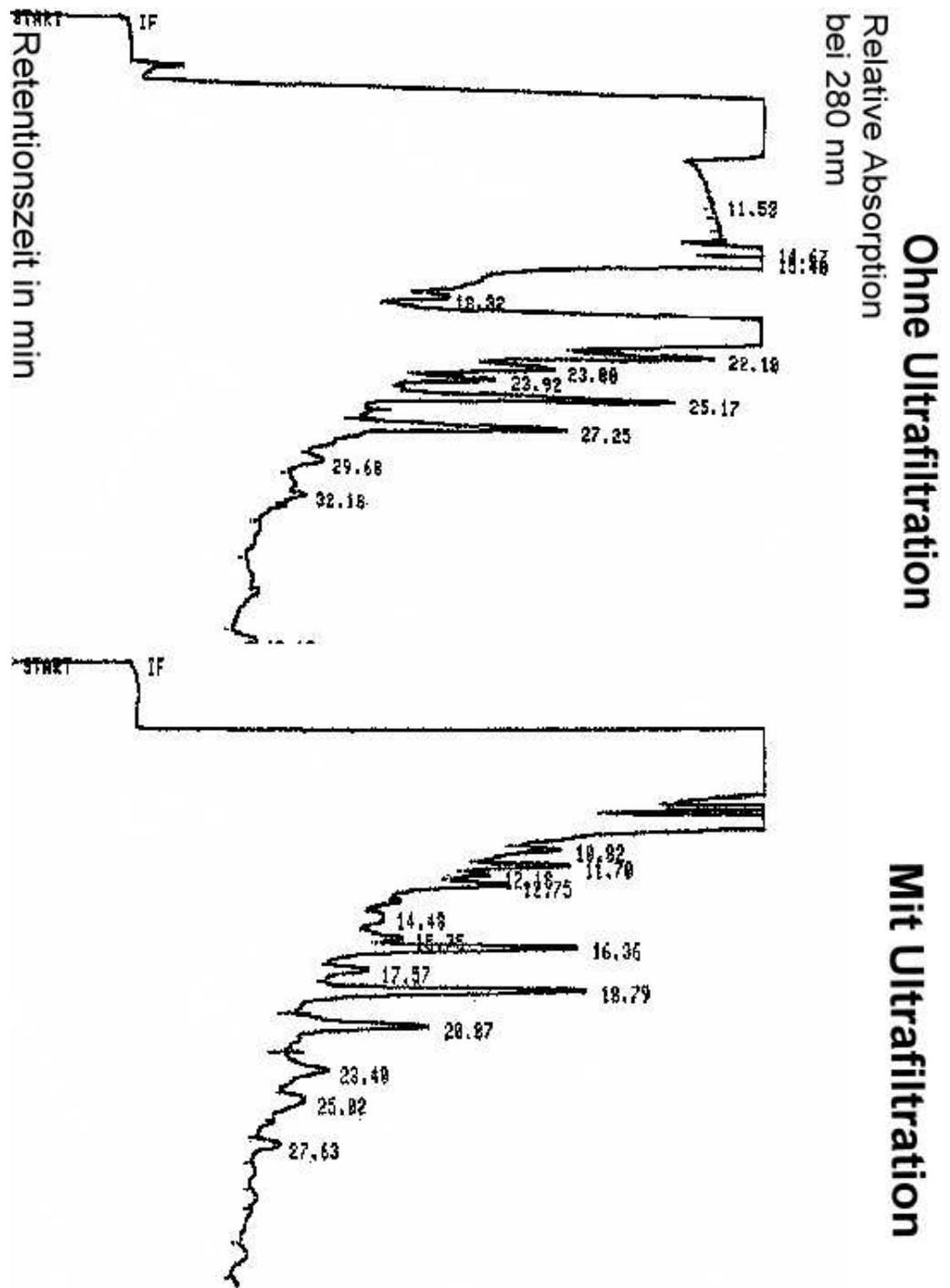


Abb. 9 Einsäulen - Chromatographie von 500 µl Liquor ohne und mit vorheriger Ultrafiltration auf der Pinkerton 2 x 20 mm Vorsäule

Daher wurden im Verlauf auch andere Vorsäulen ausprobiert, die die Trennung eines größeren Liquorproben Volumens gewährleisten:

Die Chromspher 5 Bio - Matrix - Säule zeigte bei einer Flussmittelzusammensetzung aus 2% MeOH : 98% Acetat - Puffer (0,1%, pH 5,4) die beste Trennung von Cys - LT.

In der Einsäulen - Chromatographie war deren Grundabsorption so hoch, so dass das Zeitfenster, in dem die Leukotriene erschienen, nur ungefähr bei 10 min vermutet werden konnte. Trotz der Testung mehrerer Zeiträume für die Umschaltung von Standard - bzw. dotierten Liquorproben auf die Hauptsäule im Zweisäulen HPLC - Schema konnte nur eine 30%-ige Wiederfindung erreicht werden.

Auch gestaltete sich die Matrixtrennung bei ultrafiltrierten Liquormengen ab 1 ml sowohl quantitativ als auch qualitativ schlecht, so dass diese Säule nicht als Vorsäule verwendet werden konnte.

Bei der Pinkerton 2 x 30 mm Säule, die mit dem Flussmittel 5% MeOH : 95% Acetat - Puffer (0,1%, pH 5,4) zum Einsatz kam, wurde ebenfalls eine schlechte Matrixtrennung bei Proben ab 1 ml beobachtet.

Die Bündelung der Cys - LT fiel in der Einsäulen - Chromatographie sehr breit aus, wobei der Scheitelpunkt bei 9 min lag. Im Zweisäulen HPLC - Schema wurde eine vollständige Wiederfindung erzielt.

Die Pinkerton 4,6 x 150 mm - Säule zeigte in der Einsäulen - Chromatographie bei einer Flussmittelzusammensetzung von 50% MeOH : 50% Acetat - Puffer (0,1%, pH 5,4) eine engere Bündelung von LT (C₄, D₄ und E₄) und eine unvollständige Trennung voneinander. Diese drei Substanzen wurden in der Reihenfolge LTE₄ → LTD₄ → LTC₄ eluiert.

Dasselbe Ergebnis wurde auch bei der Pinkerton 4,6 x 250 mm Säule beobachtet: Während der Flussmitteltestung zeigte sich eine ausgeprägte Empfindlichkeit der Retentionszeiten der einzelnen Cys - LT auf geringe pH - Veränderungen. Mit Erniedrigung erschienen alle Leukotriene zeitlich später und mit Erhöhung früher.

Bei einer Flussmittelzusammensetzung von 55 % MeOH : 45 % wässriger Acetat - Lösung (0,1 %, pH 7,2) und unter pH - Justierung der Probe auf pH 5,0 mittels Acetat - Puffer wurde eine gute Reproduzierbarkeit der Resultate erzielt.

LTC₄ erschien dabei isoliert und in großem zeitlichem Abstand von LTD₄ und LTE₄ entfernt auf dem Chromatogramm. Außerdem beobachtete man eine sehr gute Matrixtrennung der Liquorproben (Abb. 10).

Unter diesen Gegebenheiten konnten zwei große Sammelfractionen, (LTE₄ /LT D₄ und eine LTC₄ - Fraction) zur Weiterverwendung für die Hauptsäule gesammelt werden.

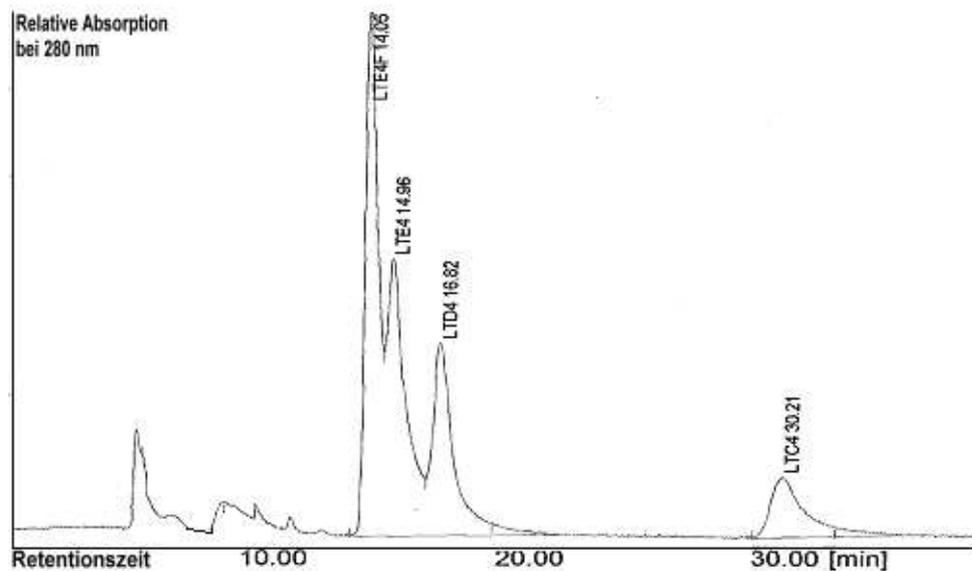


Abb. 10 Einsäulen - Chromatographie der LT (E₄, D₄ und C₄ Standard - Mixtur) auf der Pinkerton 4,6 x 250 mm - Säule

4.1.2 20 - TF (E₄ und B₄) als alternativer interner Standard zu PGB₂

PGB₂ wurde wie bei Pinkerton 2 x 20 mm Vorsäule auch in der Einsäulen - Chromatographie auf der Pinkerton 4,6 x 250 mm - Säule bei einer Flussmittelzusammensetzung von 55 % MeOH : 45 % wässriger Acetat - Lösung (0,1 %, pH 7,2) zeitlich sehr schnell eluiert. Dies erforderte die Testung von alternativen Substanzen, die bei den späteren Bestimmungen von Patientenliquorproben als interner Standard in Frage kommen:

Bei einer Flussgeschwindigkeit von 0,4 ml/min zeigte sich auf der Inertsil ODS 4 x 250 mm Säule der 20 - TFB₄ -Peak in einer Retentionszeit von 16 min vor dem LT C₄- Peak (17 min), während der 20 - TFE₄- Peak nach dem LT C₄ Peak in einer Retentionszeit von 20 min erschien.

Auf der Pinkerton 4,6 x 250 mm Säule erschien der 20 - TFE₄ - Peak bei einer Flussgeschwindigkeit von 0,4 ml/min mit 15 min zeitlich nach dem 20 - TFB₄ - Peak (13 min) und in unmittelbarer Nähe zum LTE₄ Peak bzw. auf dem LTE₄ - Peak.

Demnach bietet 20 - TFE₄ für eine Systemschaltung mit der Pinkerton 4,6 x 250 mm - Säule und der Inertsil ODS 4 x 250 mm - Säule einen adäquaten internen Standard, da es während der Chromatographie auf der Vorsäule zusammen mit LTE₄ und LTD₄ in der ersten Fraktion erscheint. Diese wird zuerst auf die Hauptsäule geleitet. LTC₄ eluiert erst mit der zweiten Fraktion. Somit wird eine Überlagerung mit 20 - TFE₄ ausgeschlossen.

4.1.3 Probenaufbereitung für die Pinkerton 4,6 x 250 mm Säule

Während der Chromatographie auf der Pinkerton 4 x 250 mm - Säule kam es durch die Viskosität der Flüssigkeiten - vor allem bei nicht - ultrafiltrierten Liquorproben - zu deutlichen Veränderungen in der Flussgeschwindigkeit und zum Teil zu Verstopfungen der Säule.

Es wurde daher eine adäquate Zeitspanne gewählt, um die Leukotriene in einem gewissen Sicherheitsabstand vor bzw. nach ihrem erwarteten Erscheinen aufzusammeln. Nach vorausgehender Ultrafiltration der Probe war die Flussgeschwindigkeit nicht eingeschränkt, gleich ob MeOH zugesetzt wurde oder nicht.

Die Wiederfindung lag bei mit 20 - TFE₄ und LT (C₄, D₄ und E₄) dotierten Liquorproben ohne MeOH - Zusatz bei 20 %.

Mit MeOH - Zusatz wurden deutlich bessere Resultate erzielt, die im Abschnitt 4.4 noch ausführlich dargestellt werden.

Bei den Liquorproben, die mit 1000 µl MeOH versetzt wurden, musste etwa die Hälfte der Probe nach der Ultrafiltration eingedampft werden, da sonst aufgrund eines Durchwascheffektes die Peaks in der Chromatographie sehr breit ausfallen würden, was die Wiederfindung verschlechterte. Durch die Verdampfung kam es zu Verschiebungen der Retentionszeiten. Dem Verfahren mit der Zugabe von 200 µl MeOH zu 1 ml Liquor mit nachfolgender Ultrafiltration wurde schließlich der Vorzug gegeben, um den zusätzlichen Schritt der Verdampfung einzusparen.

4.2 Zweisäulensystem mit Zwischenschlaufe

Aufgrund der Trenneigenschaften, die die Pinkerton 4,6 x 250 mm - Vorsäule in den Vorversuchen zeigte, wurde sie in einem Schaltsystem, das um eine Zwischenschlaufe erweitert wurde, mit der Inertsil ODS 4 x 250 mm als Hauptsäule zur Bestimmung der Leukotrienkonzentration im Liquor kombiniert:

Über die Einspritzpipette wurde die Probe in das Einspritzventil injiziert und gelangte zur 2 ml Einspritzschlaufe ("Load" - Stellung, Abb. 11, Schritt 1, linkes Bild). Nach Wechsel des Einspritzventils in die "Inject" - Stellung (Abb. 11, Schritt 1, rechtes Bild) gelangte sie mit dem Flussmittel der Vorsäule, bestehend aus 55% MeOH : 45% wässriger Acetat - Lösung (0,1 %, pH 7,2) bei einer Flussgeschwindigkeit von 0,5 ml/min zur Vorsäule. Dort erfolgte die erste Vortrennung.

Nach 12 min konnte durch Betätigung des Schaltventils von Position I auf II die erste Sammelfraktion, die aus 20 - TFE₄, LTD₄ und LTE₄ zusammengesetzt war, auf die Zwischenschlaufe gebracht werden (Abb. 11, Schritt 2). Der Einbau einer Zwischenschlaufe war notwendig, um eine gleichzeitige Vor- und Haupttrennung von Leukotriensubtypen in einem Analyseverfahren zu ermöglichen.

Bei Betätigung des Schaltventils von Position II auf I (Abb. 11, Schritt 3) nach 20 min kam die erste Sammelfraktion mit einer Flussgeschwindigkeit von 0,5 ml/min über das Flussmittel 68% MeOH : 32% Acetat - Puffer (0,1 %, pH 5,6) auf die Hauptsäule, von wo aus nachfolgend die erste Detektion erfolgte. Bei dieser zweiten Umschaltung wurde auch der Integrator gestartet.

Zwischen der 22. und 30. Minute wurde durch Anhalten der Vorsäule (über eine Schaltung des Einspritzventils in die Mittelstellung) die Vortrennung der zweiten Sammelfraktion, die aus LTC₄ bestand und sich noch in der Vorsäule befand, verzögert, um ein zeitliches Interferieren mit der Chromatographie der ersten Sammelfraktion auf der Hauptsäule zu vermeiden. Es wäre dadurch nicht möglich gewesen die zweite Sammelfraktion rechtzeitig auf die Zwischenschlaufe zu bringen und nachfolgend auf der Hauptsäule zu chromatographieren.

Nach 30 min konnte die zweite Sammelfraktion über die Schaltung des Einspritzventils in die "Inject" - Stellung durch die Vorsäule weiter getrennt werden und über die Schaltung des Schaltventils auf Position II (Abb. 11, Schritt 4) durch das Flussmittel der Vorsäule auf die Zwischenschlaufe geladen werden.

Die Chromatographie der LTC₄ - Fraktion auf der Hauptsäule erfolgte, nachdem nach 42,5 min das Schaltventil auf Position I gestellt wurde (Abb.11, Schritt 3).

Die vier Einzelproben wurden nach Detektion zu folgenden Zeiten über ein Dreiwegehahnsystem gesammelt: 20 - TFE₄ zwischen 48,5 und 53 min, LTD₄ zwischen 53 und 59 min, LTE₄ zwischen 59 und 67 min und LTC₄ zwischen 95 und 110 min.

Nach der letzten Probensammlung wurde die Integration gestoppt und das Einspritzventil wieder für die nächste Probeneingabe, die nach 120 min wieder erfolgen konnte, in die "Load" - Stellung zurückgeschaltet.

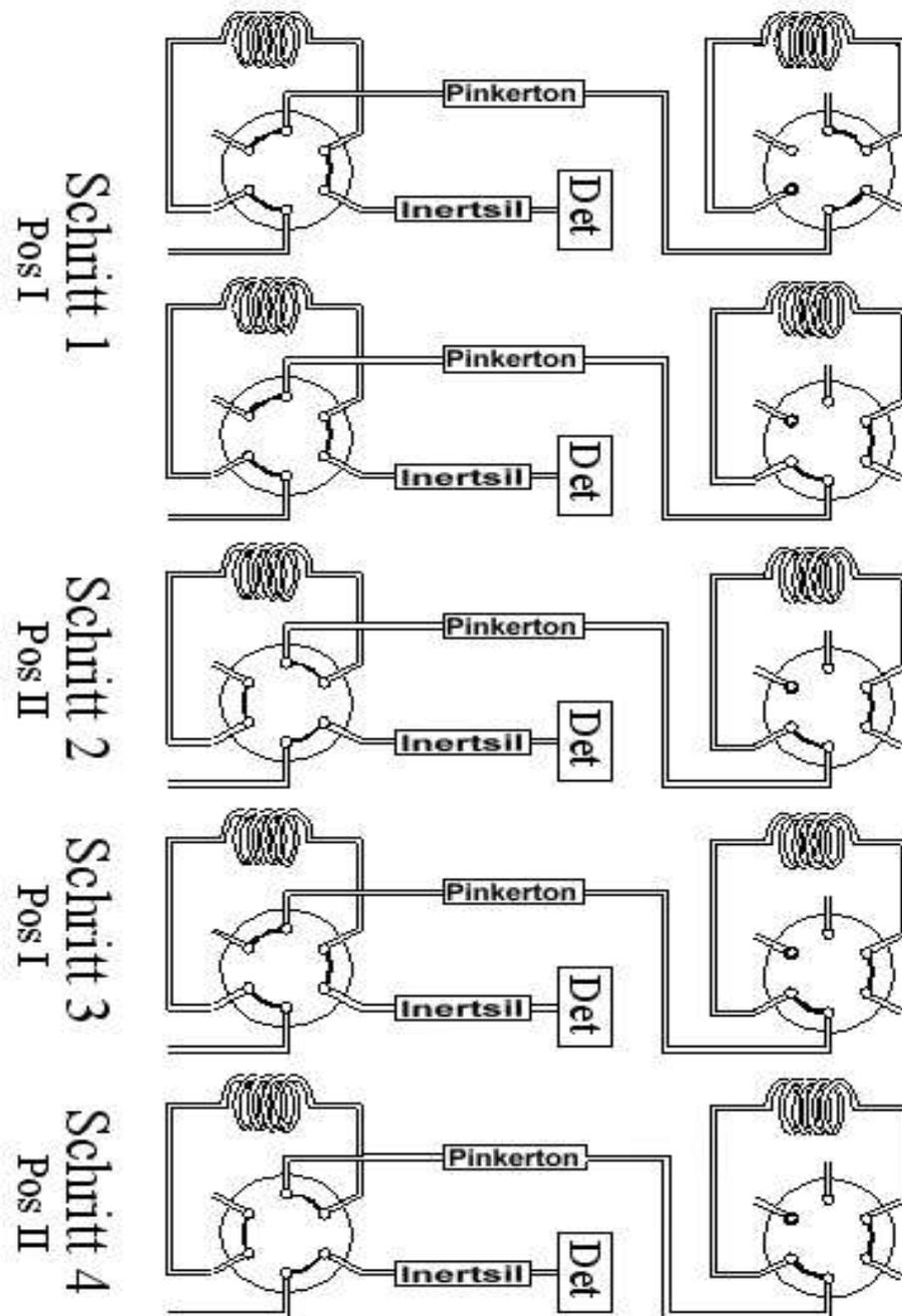


Abb. 11 Zweisäulen HPLC - Schema mit Zwischenschlaufe. (Pink.: Pinkerton-Säule, Inertsil: Inertsil-Säule, Det.: Detektor, Pos.: Position)

In Tabelle 1 werden die einzelnen Schritte der Methode detailliert dargestellt:

Zeit (min)	Ereignis:
00,00	Flussgeschwindigkeit Pinkerton 4,6 x 250 mm - Säule bei 0,5 ml/min
00,00	Flussgeschwindigkeit Inertsil ODS 4 x 250 mm - Säule bei 0,5 ml/min
00,00	Schaltventil auf Position I
00,00	Einspritzventil in "Load" - Stellung
00,01	Probeneingabe in Einspritzventil
00,02	Einspritzventil in "Inject" - Stellung
12,00	Schaltventil auf Position II
20,00	Schaltventil auf Position I
20,01	Integratorstart
22,00	Einspritzventil in Mittelstellung (Stop der Flussgeschwindigkeit der Pinkerton - Säule)
45,00 - 48,50	Aufdrehen des Dreiwegehahns des Abfallbehälters der Inertsil - Säule, Probensammlung vor dem ersten Peak
48,51 - 53,00	Probensammlung 20 - TFE ₄
53,01 - 59,00	Probensammlung LTD ₄
59,01 - 67,00	Probensammlung LTE ₄ , Abdrehen des Dreiwegehahns
95,00 - 100,00	Aufdrehen des Dreiwegehahns, Probensammlung vor dem LTC ₄ - Peak
100,01 - 110,00	Probensammlung LTC ₄ , Abdrehung des Dreiwegehahns
110,01	Integratorstop
110,02	Einspritzventil in "Load" - Stellung, Re - Equilibration der Pinkerton - Säule
120,00	Nächste Probeneingabe, Re - Equilibration der Inertsil - Säule, Fortsetzung des Programmzyklus

Tabelle 1 HPLC - Programm

Typische Chromatogramme dieser Methode werden in Abb. 12 und in Abb.13 gezeigt:

In Abb. 12 wird das Chromatogramm einer Standardprobe, die bei den Probemessungen als Kalibrierungsstandard zum Einsatz kam, dargestellt. Auffallend ist eine gute Trennung von 20 - TFE₄, LTE₄ und LTD₄ mit Isolierung von LTC₄. Ein typisches Chromatogramm einer aufbereiteten Patientenliquorprobe mit einer guten Matrixtrennung zu Beginn der Chromatographie und der Darstellung von Cys - LT im Bereich des Detektionslimits zeigt Abb. 13.

Durch die jeweils 10minütige Spülung beider Säulen mit H₂O und mit Isopropanol am Ende jeder Testreihe ergaben sich keine Qualitätseinschränkungen bei den nachfolgenden Chromatographien.

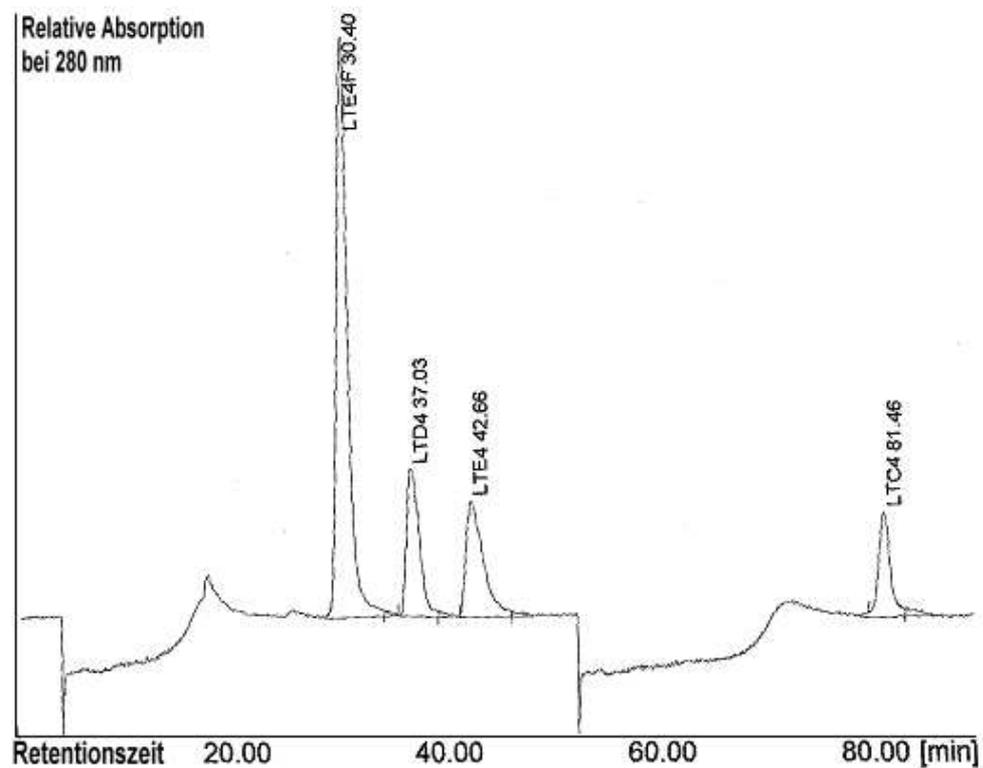


Abb. 12 HPLC von 20 - TFE₄ und von LT (C₄, D₄ und E₄) - Standard im Zweisäulen HPLC - Schema mit Zwischenschlaufe.

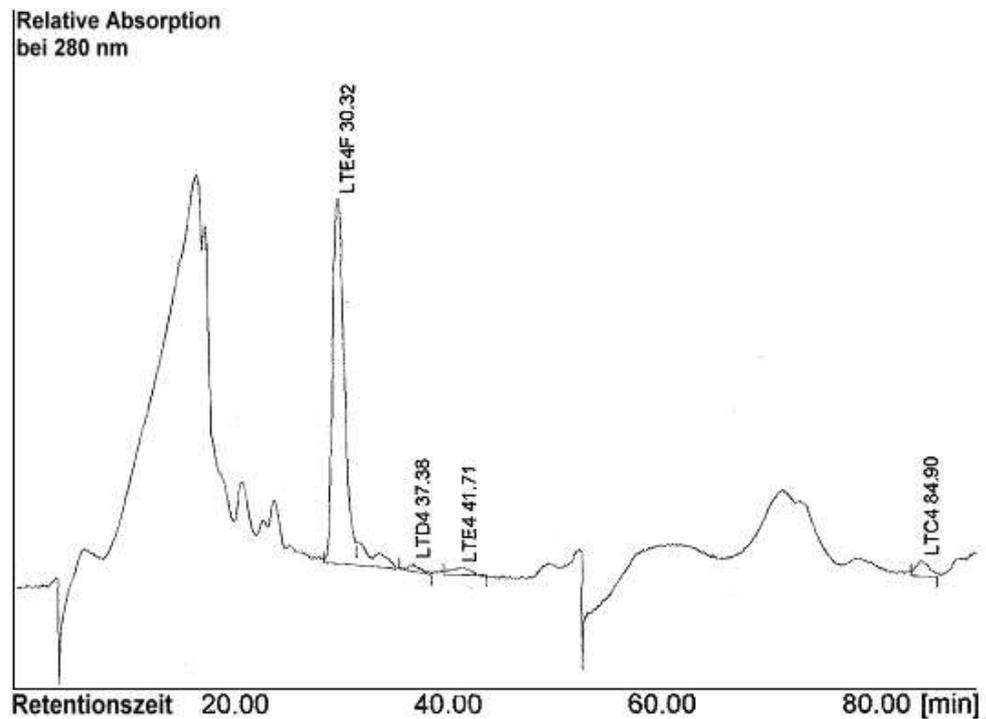


Abb. 13 HPLC einer typischen Patientenliquorprobe mit 20 - TFE₄ als interner Standard im Zweisäulen HPLC - Schema mit Zwischenschlaufe.

4.3 Sensitivität der Analysemethode (Zweisäulen HPLC - Schema mit Zwischenschlaufe und ELISA)

Das Detektionslimit lag bei 0,5 ng pro Injektion bei einem "Signal to Noise" - Ratio (S/N) von 4,0. Durch die nachfolgende ELISA - Bestimmung wurde die Sensitivität auf 10 pg/ml erhöht .

4.4 Linearität

Die Verdünnungskurve ergab eine lineare Regressionsgerade mit $r = -0,98$ (Abb. 14). Abb. 14 zeigt die in das Zweisäulen HPLC - Schema mit Zwischenschlaufe eingegebene LT - Menge (Ordinate) in Abhängigkeit zu der durch Peakflächenintegration berechneten Menge (Abszisse). Dabei liegt die geringste noch bestimmbare Menge bei 0,5 ng.

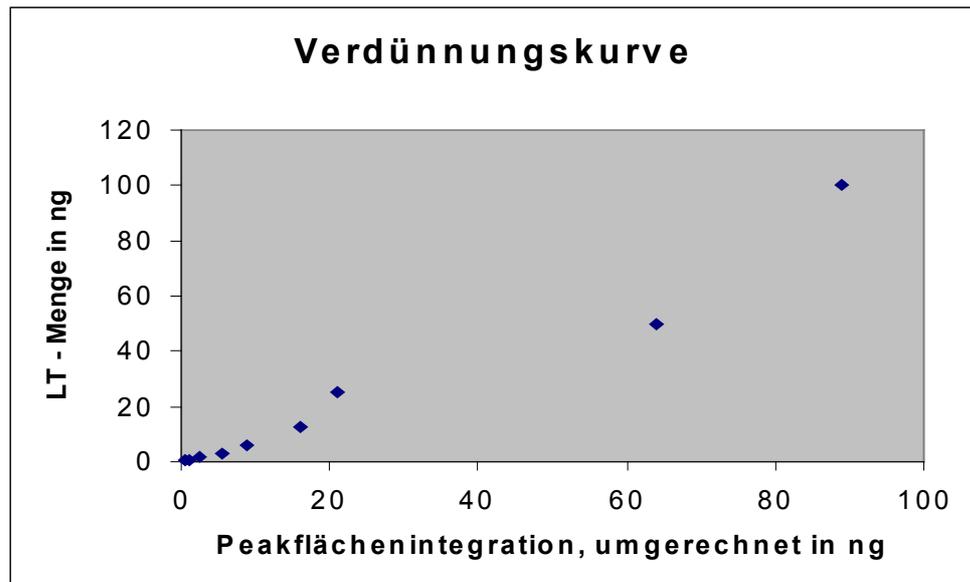


Abb. 14 Verdünnungskurve

4.5 Leukotrienwiederfindung, Wiederholbarkeit und Spezifität der HPLC - Methode

Die Wiederfindung der Leukotriene nach Probenaufbereitung und Chromatographie von Standardproben ($n = 10$) lag bei insgesamt $88,8 \pm 5,2\%$ der ursprünglich hinzugegebenen Menge (Tabelle 2).

Der Leukotriennachweis von dotierten Liquorproben aus einem Pool ($n = 10$) lag dagegen nach Ultrafiltration bei insgesamt $71,9 \pm 3,6\%$ des hinzugegebenen Standards (Tabelle 2).

Insgesamt gesehen war die Präzision dieser Messungen bei den einzelnen Subtypen, sowohl bei den Standard-, als auch bei den dotierten Liquorproben bei Standardabweichungen zwischen 2,7 und 5,9 % gut (Tabelle 2).

Damit ergab sich eine gute Reproduzierbarkeit der HPLC - Methode mit Zweisäulen HPLC - Schema und Zwischenschlaufe bei der Analyse von Cys - LT, sowohl in H₂O, als auch in gepooltem Liquor. Insgesamt lag die Spezifität dieser Analysemethode bei $p < 0,01$.

Beim Vergleich der Wiederfindungsraten unter den einzelnen Leukotriensubtypen in Tabelle 2 fiel auf, dass der Verlust im Verhältnis äquivalent war. Dies sprach gegen eine Diskrimination dieser Substanzen bei der Ultrafiltration. Somit wurde 20 - TFE₄ als interner Standard für die Bestimmung von Cys - LT im Patientengut verwendet.

Tabelle 2 zeigt die Wiederfindung aller vier Leukotriensubtypen der dotierten Standard- und Liquorproben aus einem Pool im Einzelnen und im Gesamten:

Dotierte Proben	Wiederfindung nach HPLC				Gesamt (% ± s)
	20 - TFE ₄ (% ± s)	LTE ₄ (% ± s)	LTD ₄ (% ± s)	LTC ₄ (% ± s)	
Standardproben (n=10)	87,6 ±5,2	91,5±5,5	86,7±4,1	89,5±5,9	88,8±5,2
Liquorproben aus Pool nach Ultrafiltration (n=10)	71,2±5,2	73.2±3,5	70,8±2,7	72,3±3,0	71,9±3,6
Liquorproben von Patienten und Kontrollen nach Ultrafiltration (n=40)	75,5±18,8				

Tabelle 2 Wiederfindung der einzelnen Leukotriene in Prozent ± Standardabweichung im Zweisäulen HPLC - Schema mit Zwischenschlaufe.

4.6 Auswertung der Messergebnisse

Im Vergleich zu den Kontrollproben (n = 5) zeigten die Messungen von Patienten mit Subarachnoidalblutung (n = 35) erhöhte Werte von LTC₄ (Abb. 15). Zudem stellten sich erhebliche intraindividuelle Schwankungen der einzelnen Werte dar (Tabelle 3).

Ebenso wie bei den 10 dotierten Liquorproben aus einem Pool konnten sich die guten Wiederfindungsraten auch bei 20 - TFE₄ im Patientengut (n = 35) und bei den Kontrollproben (n = 5) mit Durchschnittswerten von 75,5 ± 18,6% bestätigen (Tabelle 2).

Die Kreuzreaktivität von 20 - TFE₄ mit dem ELISA - Kit der Firma Amersham betrug 20% im Vergleich zu LTC₄ und zu LTD₄ (jeweils 100%).

	LTC ₄ pg/ml ± s	LTD ₄ pg/ml ± s	LTE ₄ pg/ml ± s
Kontrollprobe (n = 5)	147 ± 45	176 ± 108	128 ± 66
Patientenprobe(n=35)	459 ± 516	187 ± 146	206 ± 128

Tabelle 3 Mittelwerte der Leukotriene in Pikogramm pro Milliliter ± Standardabweichung

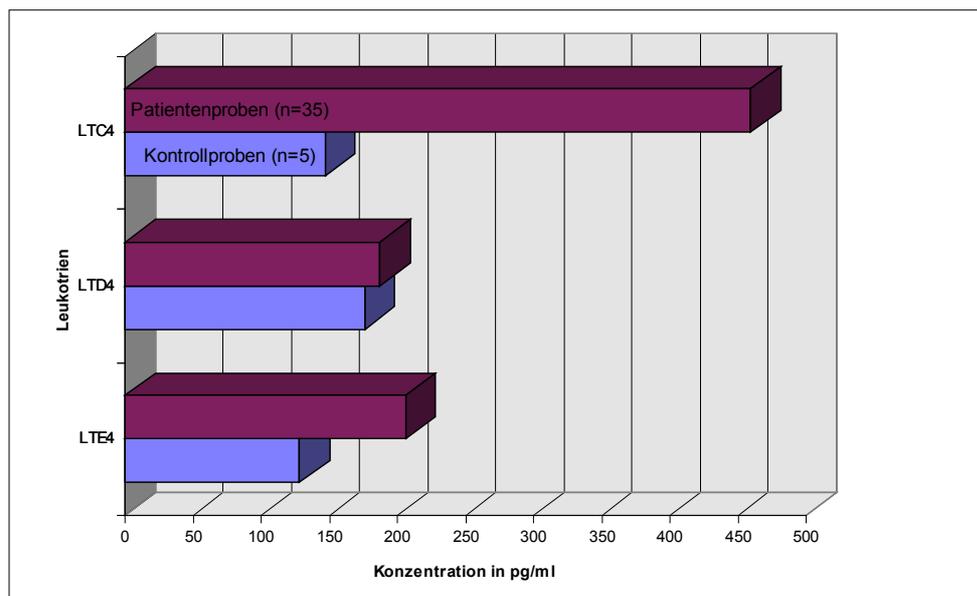


Abb. 15 Darstellung der Messergebnisse im Balkendiagramm

5. Diskussion

5.1 Vorsäulen

Die anfangs verwendete Pinkerton 2 x 20 mm Säule zeigte aufgrund der guten Bündelung der Leukotriene bei großen Liquorvolumina eine Einschränkung der Trennqualitäten, so dass immer längere Säulen dieses Typs getestet wurden.

Im Vergleich zu den von den meisten Autoren verwendeten RP - ODS - Säulen (YOUNG und GIRARD 1989), eluierten die Cys - LT bei den verwendeten Pinkerton - Säulen im Gegensatz zur Inertsil ODS 4 x 250 mm - Säule in den Versuchen immer in umgekehrter Reihenfolge.

Ein entscheidender Vorteil der Pinkerton 4,6 x 250 mm Säule war, dass sie LTC₄ isoliert von den anderen Leukotriensubtypen eluierte. Besonders der Nachweis dieses Subtyps spielt nach PAOLETTI et al. (1988) eine wichtige Rolle in der Pathophysiologie des cerebralen Vasospasmus. Weiterhin vorteilhaft war die sehr gute Matrixtrennung zu Beginn der Chromatographie, auch bei Probenvolumina von 1 ml.

Von Nachteil war der breite Ausfall der Leukotrien - Peaks auf dem Chromatogramm und die schlechte Auftrennung von 20 - TFE₄, LTE₄ und LTD₄. Diese Säulen kamen deshalb nur als Vorsäulen zur Verwendung. Die drei Substanzen wurden als scharf abgegrenzter Block für die nachfolgende Haupttrennung eluiert.

Der pH Einfluss des Flussmittels auf die Retentionszeiten der Cys - LT konnte sowohl bei den RP - ODS - Säulen (YOUNG und GIRARD 1989) als auch bei der Pinkerton 4,6 x 250 mm Säule nachgewiesen werden.

Obwohl der pH - Wert des Flussmittels bei 7,2 (wässrige Phase vor der Vermischung) und damit deutlich höher lag, als bei den meisten Anwendungen mit RP - ODS - Säulen (YOUNG und GIRARD 1989), konnte erst bei diesem Wert eine gute Reproduzierbarkeit der Ergebnisse erzielt werden. Vermutlich liegt die Erklärung in ionenaustauschenden Mechanismen, die sehr stark vom pH - abhängig sind.

Durch pH - Justierung der Probe vor Injektion in die HPLC - Säule wurde wie bei ESKRA et al. (1986) eine gute Reproduzierbarkeit der Messergebnisse erreicht.

Bei einem Proben - pH von 5,0 konnte die beste Wiederfindung an Cys - LT erzielt werden.

5.2 20 - TF (E₄ und B₄) als alternativer interner Standard

PGB₂ wurde aufgrund ähnlicher chromatographischer Eigenschaften wie Cys - LT (YOUNG und GIRARD 1989) und einer mit 0,002 % im Vergleich zu Cys - LT (100 %) geringen Kreuzreaktivität im Immunoassay (MILLER et al. 1985, ROKACH et al. 1984) in der HPLC bevorzugt als interner Standard verwendet.

Im Verlauf fand PGB₂ als interner Standard keine Anwendung, da es auf der Pinkerton 2 x 20 mm Säule im Vergleich zu den Cys - LT stärker retiniert wurde.

Sein Absorptionsmaximum bei der UV - Detektion liegt im Vergleich zu Cys - LT bei einer Wellenlänge von 280 nm niedrig (BORGEAT und PICARD 1988). Hierdurch müssen größere Mengen Substanz verwendet werden.

Ein weiterer Nachteil von PGB₂ ist, dass es in biologischen Proben natürlich vorkommt. Z.B. wurde es in embryonalen Lungenfibroblasten nachgewiesen (SHINDO et al. 1988).

Es besteht die Möglichkeit, dass es bei der Chromatographie biologischer Proben in unbekannter Menge mit den Cys - LT miteluiert wird und sich auf den internen Standard aufaddiert. Dieses würde eine falsch - hohe Wiederfindung von PGB₂ bedeuten und dadurch eine zu niedrige Cys - LT - Konzentration.

Aufgrund ihrer Trien - Bindung besitzen 20 - TF (E₄ und B₄) wie auch die natürlichen Cys - LT im Gegensatz zu PGB₂ ein Absorptionsmaximum um 280 nm (BORGEAT et al. 1990). Damit werden sie bei der Detektion im Bereich dieser Wellenlänge empfindlicher erfasst.

Ein Vorkommen dieser künstlichen Derivate wurde im menschlichen Organismus bislang nicht beschrieben. Damit wäre eine falsch - niedrige Wiederfindung ausgeschlossen.

Von diesen zwei als interner Standard in Frage kommenden Substanzen stellte sich heraus, dass 20-TFE₄ im Gegensatz zu 20-TFB₄ auf der Pinkerton 4,6 x 250 mm Säule innerhalb eines sehr kurzen Zeitintervalls mit LTE₄ und LTD₄ eluiert wurde. Zusammen mit LTE₄ und LTD₄ bildete 20-TFE₄ als frühes Eluat eine Sammelfraktion für die nachfolgende Bestimmung auf der Hauptsäule. Das kleine Probenvolumen dieses frühen Eluates ermöglichte auf der 4 x 250 mm Inertsil ODS - Hauptsäule eine exzellente Basislinientrennung aller Cys – LT, einschließlich LTC₄, das später als zweite Sammelfraktion bestimmt wurde. Unger (1989) betonte die Wichtigkeit eines kleinen Probenvolumens für die Qualität der Chromatographie, da diese durch große Probenvolumina aufgrund von Peakverbreiterungen reduziert wird.

Ein weiterer Punkt, der bei den Experimenten beobachtet wurde, war eine Kreuzreaktivität von 20-TFE₄ mit 20 % der Aktivität von LTC₄ und LTD₄ im ELISA. Bei einer schlechten Vortrennung mittels HPLC könnte dies zu falsch - hohen Ergebnissen bei der nachfolgenden LT - Quantifizierung durch den Immunoassay führen.

Im Vergleich zu dem von vielen Autoren verwendeten radioaktiven internen Standard [³H]LTC₄ gestaltet der Einsatz von 20-TFE₄ die beschriebene Methode preiswerter und umweltschonender (keine radioaktive Kontamination)(VANALSTYNE und SPAETHE 1992).

5.3 Probenaufbereitung zur Gewährleistung einer konstanten Flussgeschwindigkeit

Nach Subarachnoidalblutungen breiten sich Blutbestandteile, die z.B. aus Lipiden und Proteinen zusammengesetzt sind, im Liquor aus.

Diese Bestandteile sind trotz vorangegangener Zentrifugierung bei ungenügender Aufbereitung dieser Proben vor HPLC mitverantwortlich, dass die Vorsäule bei den Vorversuchen Flussunregelmäßigkeiten zeigte oder verstopfte. Nach YU und POWELL (1995) können die Ablagerungen aus biologischen Proben am Füllmaterial der Säulen zu Veränderungen ihrer Eigenschaften führen.

Nach Ultrafiltration der Liquorproben vor der HPLC konnten einwandfreie Flussverhältnisse ohne Verstopfungen der Säule erreicht werden. Die Wiederfindung der Leukotriene lag jedoch nur bei 20%. Der Grund dafür könnte darin liegen, dass Leukotriene in biologischen Proben zu einem hohen Anteil an Proteinen gebunden sind (GOFFINET und NGUYEN 1987). Dadurch können sie bei der Ultrafiltration gemeinsam mit den Proteinen im Filter zurückgehalten werden.

Um die Wiederfindung zu erhöhen, wurde der Liquorprobe vor Ultrafiltration zusätzlich MeOH zugesetzt. Das schuf eine adäquate Löslichkeit der Cys - LT, die damit einwandfrei ultrafiltriert werden konnten.

Der MeOH - Anteil der aufbereiteten Liquorprobe musste dabei einerseits hoch genug gewählt werden, um nach der Ultrafiltration eine gute Wiederfindung der Leukotriensubtypen zu erreichen; andererseits durfte dieser nicht zu hoch ausfallen, da es dadurch zu einer qualitativ schlechteren Chromatographie in der Vorsäule kam. Diese machte sich bei der Pinkerton 4,6 x 250 mm - Säule durch Peakverbreiterungen und Verschiebungen in den Retentionszeiten der Leukotriensubtypen bemerkbar. Für die nachfolgende Fraktionierung zur Haupttrennung in der Hauptsäule wäre das Probenvolumen der beiden Sammelfraktionen zu groß gewesen, was eine Qualitätseinschränkung in der Chromatographie nach sich gezogen hätte (Durchwascheffekt).

Eine Alternative, um dieses Problem zu umgehen, ist die Verdampfung des MeOH - Anteils im Flussmittel nach der Trennung durch die Vorsäule. Hierdurch würde eine Volumenreduktion erreicht.

Nachfolgend könnten die aufbereiteten Fraktionen auf der Hauptsäule bestimmt werden.

Der Nachteil dieses Verfahrens ist ein zusätzlicher Arbeitsschritt und damit verbunden auch ein höherer Zeitaufwand sowie schlechtere Wiederfindungsraten durch weitere Substanzverluste.

Daher wurde bei der Aufbereitung der Proben nach Ultrafiltration der Substanzverlust durch 16%igem MeOH ausgeglichen. Hierdurch wurden Verschiebungen der Retentionszeiten im Vergleich zu nicht ultrafiltrierten Standardproben vermieden.

5.4 Vergleich von HPLC - Methoden mit integriertem Extraktionsschritt

Durch Kombination der beiden Säulen Pinkerton 4,6 x 250 mm und Inertsil ODS in einem Zweisäulen HPLC - Schema mit Zwischenschleife wurde bei Liquorproben eine gute Matrixtrennung mit guter Trennung von 20 - TFE₄, LTE₄ und LTD₄ bei einer Isolierung von LTC₄ erreicht.

Die Einbeziehung der Extraktionssäule in ein Schaltsystem gelang u.a. auch RICHMOND et al. (1987). Sie integrierten einen on - line Extraktionsschritt mit einer Brownlee RP - Vorsäulenkartusche. Über eine analytische ODS - Säule erfolgte die nachfolgende Separation. Die 70minütige Prozedur automatisierte die Konzentrierung und Reinigung großer Volumina biologischer Flüssigkeiten von 15 - 20 ml vor Fraktionierung und UV - Analyse. Plasmaproben konnten mit diesem System nicht fraktioniert werden, da präzipitiertes Protein die zu ladende Säule blockierte.

BORGEAT et al. (1990) entwickelten ein automatisiertes Schaltsystem, das zur Probenaufbereitung eine Vorsäule und eine ODS Resolve C18 Guard Pak Extraktionssäule verwendete. Die HPLC - Analyse erfolgte über eine radiale Resolve C18 Kompressionskartusche (10 µm, 5 x 100 mm) und über eine Resolve C18 Stahlsäule (5 µm, 3,9 x 150 mm). Die Extraktion von biologischen Proben wurde nach dem Prinzip anderer Mehrsäulenextraktionsmethoden (PICKETT und DOUGLAS 1985, POWELL 1987) durch Vor - und Extraktionssäule durchgeführt. Über ein Gradientensystem wurden die einzelnen Substanzklassen der Lipoxygenase - und einiger wichtiger Cyclooxygenaseprodukte eluiert. Dabei durchfloss die Probe gemeinsam mit dem Flussmittel, das aus H₂O, MeOH, Acetonitril, Dimethylsulfoxid, H₃PO₄ und NH₄OH mit pH 4,6 zusammengesetzt war, nacheinander Vor - und Extraktionssäule und gelangte schließlich auf die Hauptsäule.

Das Gradientensystem wurde entwickelt, um die ionischen Interaktionen zwischen den freien Silanolen im C18 - Support der Hauptsäule und den Aminogruppen der Cys - LT vorteilhaft auszunutzen (RUANE und WILSON 1988): Bei einem Flussmittel - pH um 3 wurden die Cys - LT in der Säule stark retiniert, wobei der organische Anteil des Flussmittel erhöht werden musste, um diese zu eluieren. Vorteil dieser Methode war die Gruppentrennung der Cys - LT in weniger als 30 min. Obwohl sie sehr elegant war, benötigte sie einige Pumpen und Ventile zusätzlich zum Standard HPLC - System. Das machte die Extraktion relativ kompliziert und teuer. Problematisch war auch, dass die Retentionszeit von LTC₄ mit dem Gebrauch der Säule stetig zunahm. Dieses führte zu Peakverbreiterungen und schlechter Messbarkeit.

Durch die Spülung der Säule mit H₂O : MeOH : Acetonitril : H₃PO₄ (30% : 26% : 44% : 0,06%) zwischen den Anwendungen wurde dieses Problem behoben. Dieses Verfahren wurde erfolgreich bei denaturierten Suspensionen von neutrophilen Granulozyten, Lungenperfusaten aus Meerschweinchen, Peritoneallavageflüssigkeit von Mäusen und Blutplasma angewendet.

TAGARI et al. (1989) entwickelten eine Meßmethode, in der LTC₄ und LTE₄ nach einer Gesamtdauer von 50 min von 10 ml normalen und pathologischen Urinproben durch eine automatisierte HPLC - Methode nach einer einfachen Probenaufbereitung getrennt wurden.

Als Vorsäule wurde eine Sep - Pak C18 - Kartusche verwendet, als Hauptsäule eine Waters NovaPak (4 µm, 3,9 x 150 mm). Die Elution der Substanzen erfolgte bei einer Flussmittelzusammensetzung von 60% MeOH : 40% Acetat - Puffer (0,1, pH 5,4). Zur Anwendung kam diese Methode mit nachfolgendem RIA bei Patienten mit kardialer Ischämie und zeigte bei LTE₄ - Werten zwischen 8 und 388 pg/ml bis zu 50 Mal höhere Konzentrationen als bei gesunden Patienten (17 ± 5 pg/ml).

In einer Weiterentwicklung dieser Methode führten NICOLL - GRIFFITH et al. (1990) bei Urinproben von Asthmapatienten vor und nach Antigenexposition eine säulenumschaltende Technik ein, in der eine frische Vorsäule für jede Probe vor HPLC verwendet wurde. Damit wurde einem Problem begegnet, in welcher es durch wiederholte Extraktionen biologischer Proben auf einer Vorsäule oder Kartusche zu Veränderungen ihrer Eigenschaften infolge irreversibler Absorption an Matrixkomponenten kam. Dies konnte in der HPLC - Säule zur Druckerhöhung, zur Verminderung der Extraktionsfähigkeiten und zu Kreuzkontaminationen zwischen den einzelnen Proben führen. Dieses Verfahrens war in der Analyse von relativ großen Probenvolumina oder Proben mit signifikant hohem Anteil an verunreinigenden Substanzen nützlich.

Bei annähernd gleicher Sensitivität zur Methode von TAGARI et al. (1989) wurden nach Antigenexposition deutlich erhöhte LTE₄ - Werte gemessen.

Die Methode von VANALSTYNE und SPAETHE (1992) beschrieb eine schnelle automatisierte on-line Extraktion und Fraktionierung von Plasmaleukotrienen und 12-HETEs durch HPLC. Sie wurde entwickelt, um kleine Volumina (40 µl) von durch MeOH gelöstem Plasma zu fraktionieren. Das Verfahren enthielt u.a. eine RP - 18 Silica Newguard - Brownlee (7 µm, 3,2 x 15 mm) als Vorsäule zur on - line Extraktion des methanolischen Plasmas. Arachidonsäuremetaboliten wurden über eine Beckmann Ultrasphere ODS-Säule (5 µm, 4,6 x 250 mm) getrennt und durch ein nachfolgendes ELISA quantifiziert.

Die Flussmittelzusammensetzung bestand bei der Haupttrennung aus 60%

MeOH : 40% (Phosphorsäure 0,004 mM und Na₄ EDTA 1,5 mM, eingestellt auf pH - Wert 3,3). Während 12 - HETE und LTC₄ gut getrennt wurden, erfolgte eine Koelution von LTE₄ und LTD₄ mit schlechter Trennung von LTB₄.

5.5 Leukotrienwiederfindung und Wiederholbarkeit der Methode

Die Wiederfindungsraten von 20 - TFE₄ im Patientenliquor zeigten ähnlich gute Werte wie die Standardproben. Die höhere Standardabweichung bei den Patientenproben betont individuelle Schwankungen bei den unterschiedlichen Proben. Dafür könnte möglicherweise der erhöhte Proteingehalt in Abhängigkeit vom Zeitpunkt bzw. von der Schwere des Blutungsereignisses eine Erklärung sein.

Die Sensitivität der HPLC - Methode mit Zweisäulen HPLC - Schema mit Zwischenschlaufe, die laut UV - detektierter Verdünnungskurve (Abb. 14) bei 0,5 ng pro nachgewiesenem Leukotrien liegt, unterscheidet sich von den anderen in dieser Arbeit aufgeführten HPLC - Methoden nur unwesentlich.

ESKRA et al. (1986) wiesen bei gleichem S/N - Ratio von 4,0 mit UV - Detektion bei einer Verdünnungskurve mit $r = 0,99$ mit 0,3 ng pro nachgewiesenem Leukotrien noch die höchste Sensitivität auf.

Die Technik der UV - Detektion in der HPLC ist in Hinblick auf die Sensitivität ein limitierender Faktor und als alleinige Methode zur Bestimmung von Cys - LT aus biologischen Proben nicht geeignet, da sich die bislang gemessenen Werte um den unteren Pikogramm - bis oberen Nanogrammbereich pro ml bewegen wie z. B. bei WINKING et al. (1997) und (1998) oder bei PAOLETTI et al. (1988).

Daher wurde der HPLC ein Immunoassay nachgeschaltet. Hiermit erhöhte sich die Sensitivität des Leukotriennachweises auf 10 pg/ml. Der alleinige Nachweis von Cys - LT mittels Immunoassay ist nicht möglich, da aufgrund der nicht unwesentlichen Kreuzreaktivität in den gängigen RIA und ELISA für Leukotriene in biologischen Proben wie Liquor eine vorausgehende Trennung dieser Substanzen mittels HPLC unerlässlich bleibt (VANALSTYNE und SPAETHE 1992).

5.6 Kritik der Methode

Die besondere Abhängigkeit der Retentionszeiten von Cys - LT vom pH - Wert des Flussmittelpuffers und von der stationären Phase der HPLC - Säulen im Vergleich zu den übrigen Eicosanoiden spielen in der HPLC eine zentrale Rolle:

Neben YOUNG und GIRARD (1989), die die Reihenfolge der Elution von Cys - LT in Abhängigkeit zur pH - Einstellung des Flussmittelpuffers untersuchten, machten YU und POWELL (1995) dafür die positiv geladene Aminogruppe dieser Substanzen verantwortlich. Diese kommt zusätzlich zu der negativ geladenen Karboxylgruppe, die bei allen Eicosanoiden vorhanden ist, vor.

Weitere Aspekte, die bei der HPLC zu einer Optimierung der Trennung von Cys - LT führen, sind Zugaben von verschiedenen sauren Zusätzen zum Flussmittel (z.B. Essigsäure, TFA oder Phosphorsäure) und der Gebrauch unterschiedlicher Säulen.

Z.B ist bei den ODS - Säulen die Trennqualität unter anderem vom End - Capping und vom Carbon - Gehalt des Füllmaterials abhängig.

Die Pinkerton 4,6 x 250 mm Säule besitzt in ihrem Füllmaterial eine Restricted Access Mobile Phase, die aus dem Tripeptid Diol-Gly-Phe-Phe (GFF - S5 - 80) besteht (PERRY et al. 1992). Dieses bietet vor allem bei der Trennung von peptidhaltigen Substanzen aufgrund von Wechselwirkungen Vorteile (MERILUOTO und ERIKKSON 1988, PINKERTON und KOEPLINGER 1988).

Diese Wechselwirkungen sind zu vergleichen mit der Ionenpaar RP - HPLC nach ZILTENER et al. (1983) oder STEFFENRUD und SALARI (1988).

Unter anderem wird diese Säule für die Medikamentenanalyse im Serum verwendet. So z.B. beim Nachweis von Paracetamol und Salicylat (DAWSON et al. 1988), von Methylxanthinen (RAINBOW et al. 1989, TAGLIARO et al. 1990), von Antikonvulsiva wie Phenytoin, Phenobarbital und Carbamazepin (RAINBOW et al. 1990) und von Warfarin (SHIBUKAWA et al. 1990). Die Probeneingabe erfolgte bei diesen Anwendungen direkt ohne besondere Aufbereitung in die Säule, wobei diese entweder als Vor - oder als Hauptsäule zum Einsatz kam.

Während der Vortrennung von Liquorproben kam es bei der Pinkerton 4,6 x 250 mm Säule ohne Anwendung des Flussreglers zu Flussverlangsamungen, die eine zusätzliche Ultrafiltration notwendig machten. Nachdem dieses Verfahren auch mit Flussregler beibehalten wurde, wäre zur Verbesserung der Leukotrienwiederfindung noch zu erwägen, wie bei YU und POWELL (1995) die Probe mit 30% MeOH bei -80°C einzufrieren und das präzipitierte Material durch Zentrifugierung zu entfernen, um die Trennqualitäten der Säule beizubehalten.

Die Vortrennung von biologischen Proben mittels manueller Kartuschenextraktion zeigte Nachteile durch einen hohen zeitlichen Aufwand als Folge vieler Arbeitsschritte (Konditionierung der Kartusche, Extraktion und abschließende Verdampfung der Probe). Hierdurch kam es zu Schwankungen an Wiederfindungsraten für Cys - LT:

Insgesamt wiesen die Wiederfindungsraten in Plasmaproben bei guter Präzision Werte um 50% auf, wie bei HENDEN et al. (1993). ZAKRZEWSKI et al. (1989) gaben für LTC₄ nur 38%, für LTD₄ 25% und für LTE₄ 30% Wiederfindung an, während ESKRA et al. (1986) mit 68%, 77% und 51% insgesamt höher lagen.

PGB₂ zeigte bei den meisten Autoren hohe Wiederfindungsraten von über 80% (HENDEN et al. 1993, ESKRA et al. 1986).

Die Wiederfindungsraten waren bei der Analyse der Leukotriensubtypen im Zweisäulen HPLC - Schema mit Zwischenschlaufe höher als bei den Verfahren mit manueller Kartuschenextraktion und vergleichbar mit anderen on - line HPLC - Analyseverfahren für Leukotriene:

Bei Urinproben erreichten TAGARI et al. (1989) für [³H]LTC₄ , [³H]LTE₄ und LTE₄ 68%, 70% und 86% Wiederfindung, während NICOLL - GRIFFITH et al. (1990) 71%, 82% und 51 bis 74% angaben.

VANALSTYNE und SPAETHE (1992) lagen mit [³H]LTC₄ bei 90%. Ähnlich hohe Wiederfindungsraten wiesen BORGEAT et al. (1990) mit 87% auf, wobei der geringe Materialverlust nicht auf die Oberflächenabsorption der Säulen zurückgeführt werden konnte, sondern auf die vorherige Probenaufbereitung. Bei der Methode mit Zweisäulen HPLC - Schema und Zwischenschlaufe wäre somit bei einer reibungslosen Chromatographie der Hauptverlust durch die Ultrafiltration zu erklären.

Ein weiterer Vorteil der Methode mit Zweisäulen HPLC - Schema und Zwischenschlaufe im Vergleich zu manuellen Kartuschenextraktionen und einigen anderen on - line Extraktionsverfahren für Leukotriene ist, dass mit nur 1 ml Liquor ein geringes Probenvolumen erforderlich ist. Damit wäre bei einer eingeschränkten Probenverfügbarkeit, z.B. durch lumbale Liquorgewinnung, Abhilfe geschaffen.

Darüber hinaus ist die Gesamtdauer der Analyse im Vergleich zu den manuellen Kartuschenextraktionen und die Anzahl der Arbeitsschritte geringer, da eine zunehmende Zahl von Einzelschritten bei der Analyse biologischer Proben zu Verlusten führt (KUMLIN et al. 1995).

Bei den Patientenmessungen von Cys - LT durch das Zweisäulen HPLC - Schema mit Zwischenschlaufe und nachfolgendem ELISA kam es zu starken Schwankungen, insbesondere von LTC₄ (Abschnitt 4.5). Im Vergleich zu den Kontrollproben fand sich insgesamt eine deutliche Erhöhung. In der Literatur finden sich ähnliche Resultate, wie z.B. bei PAOLETTI et al. (1988), die bei Patienten mit Subarachnoidalblutung erhöhte LTC₄ - Werte zwischen 270 und 3200 pg/ml angaben, während bei Kontrollpatienten durchschnittlich 100 pg/ml gemessen wurden.

Dabei waren die Ergebnisse deutlich in Richtung der Fälle verschoben, die einen Vasospasmus der Cerebralarterien aufwiesen.

Die Standardabweichungen bei den Patientenproben waren wie erwartet im Vergleich zu den Kontrollproben erhöht. Zu ähnlich hohen Werten kamen WINKING et al. (1997) bei der Untersuchung von immunoreaktiven Cys - LT im Liquor cerebrospinalis, die mit der Zu - bzw. Abnahme des cerebralen Vasospasmus korrelierten.

Ebenfalls hohe Messwerte zeigten WHITE et al. (1990) mit 1200 pg/ml bei der Bestimmung der Gesamtleukotriene von frühgeborenen Kindern mit posthämorrhagischem Hydrozephalus.

Bei Patienten mit cerebraler Ischämie hatten AKTAN et al. (1991) LTC₄ - Werte im Liquor um 500 pg/ml bestimmt.

5.7 Schlussfolgerungen

In dieser Arbeit wird eine Analysemethode dargestellt, die sich aus kombinierten HPLC - Säulen zusammensetzt, und mit der Cys - LT im Liquor cerebrospinalis gemessen werden. Dabei wurde LTC₄, das bei Subarachnoidalblutungen und anderen Hirnerkrankungen im Hinblick auf die Entwicklung eines Vasospasmus besondere Relevanz zeigt, besonders gut von den übrigen Cys-LT getrennt.

Dieses Verfahren weist eine gute Reproduzierbarkeit, Sensitivität und Spezifität auf und besitzt mit 20-TFE₄ einen adäquaten internen Standard.

Gegenüber HPLC - Methoden mit manueller Kartuschenextraktion ist dieses Verfahren aufgrund der Vortrennung über eine Chromatographie in einer 250 mm Säule überlegen. Zudem ist die Durchführbarkeit schneller und die Wiederfindungsraten sind insgesamt besser.

Vergleicht man es mit anderen HPLC - Methoden, die einen integrierten Extraktionsschritt enthielten (TAGARI et al. 1989, BORGEAT et al. 1990, NICOLL - GRIFFITH et al. 1990, VANALSTYNE und SPAETHE 1992), so sind die Gütekriterien von ähnlich guter Qualität.

An erster Stelle der Leukotrien - Analyse im Liquor steht die Verlaufsdagnostik, über die Aussagen zur Prognose von Erkrankungen gemacht werden könnten. Aus therapeutischer Sicht wäre z. B. bei Subarachnoidalblutungen eine Indikationsstellung für eine pharmakologische Therapie mittels Leukotrienantagonisten zu erwägen, um dem Vasospasmus der Cerebralarterien entgegenzuwirken. Studien am Tiermodell von YOKOTA et al. (1987) und von KOBAYASHI et al. (1992) zeigten bereits einen Erfolg bei der Prävention der Entwicklung eines verzögerten cerebralen Vasospasmus.

5.8 Ausblick

Bei Automatisierung von Probeneinspritzung, Ventilfunktion und Probensammlung wäre auch ein Gebrauch der Methode mit Zweisäulen HPLC - Schema und Zwischenschleife in der klinischen Routinediagnostik möglich.

Eine Ausweitung der Analytik von Cys - LT ist auch auf andere Untersuchungsmaterialien wie Blutplasma oder Urin (über die Einführung eines zusätzlichen Reinigungsschrittes) denkbar. Als leicht zu gewinnendes Untersuchungsmaterial wäre der Urin nützlich, um die gesamte Körperproduktion an Cys - LT in Form von LTE_4 zu messen (ÖRNING et al. 1985). Neuerdings existiert die Auffassung, dass aufgrund eines Abbaus der Cys - LT Metaboliten zu LTE_4 der LT (C_4 und D_4) - Gehalt im Urin vernachlässigbar gering ist, so dass eine HPLC zur Probenaufbereitung nicht erforderlich erscheint (QIU et al. 1996). Dabei ist noch unklar, welches Analyseverfahren am besten dafür geeignet erscheint. Nach WESTCOTT et al. (1998) kommen ein Immunoassay ohne vorherige Probenaufbereitung oder eine Trennung mittels Immunoaffinitäts - Harz dafür in Frage.

6. Literaturverzeichnis

Abe M, Kawazoe Y, Shigematsu N: Influences of salts on high performance liquid chromatography of leukotrienes. *Anal-Biochem* (1985), 144(2): 417- 422

Aehringhaus U, Wölbling RH, König W, Patrono C, Peskar BM, Peskar BA: Release of leukotriene C4 from human polymorphonuclear leucocytes as determined by radioimmunoassay. *FEBS-Lett* (1982), 146: 111-114

Aharony D, Dobson P, Bernstein PR, Kusner EJ, Krell RD, Smith JB: Determination of SRS-A release from guinea-pig lungs by a radioimmunoassay. *Biochem-Biophys-Res-Commun* (1983), 117: 574-579

Aktan S, Aykut C, Ercan S: Leukotriene C4 and Prostaglandin E2 Activities in the Serum and Cerebrospinal Fluid During Acute Cerebral Ischemia. *Prostaglandins-Leukotrienes-and-Essential-Fatty-Acids* (1991), 43: 247-249

Balazy M, Murphy RC: Determination of sulfidopeptide leukotrienes in biological fluids by gas chromatography/mass spectrometry. *Anal-Chem* (1986) 58(6): 1098-1101

Baud L, Sraer J, Perez J, Nivez MP, Ardaillou R: Leukotriene C4 binds to human glomerular epithelial cells and promotes their proliferation in vitro. *J-Clin-Invest* (1985), 76: 374-377

Bauer FW, van-de-Kerkhof PC, Maassen-de-Groot RM: Epidermal hyperproliferation following the induction of microabscesses by leukotriene B4. *Br-J-Dermatol* (1986), 114: 409-412

Beaubien BC, Tippins JR, Morris HR: Leukotriene biosynthesis and metabolism detected by the combined use of HPLC and radioimmunoassay. *Biochem-Biophys-Res-Commun* (1984), 125: 97-104

Bisgaard H, Ford-Hutchinson AW, Charleson S, Taudorf E: Production of leukotrienes in human skin and conjunctival mucosa after specific allergen challenge. *Allergy* (1985), 40: 417-423

Borgeat P, Fruteau de Lacos B, Rabinovitch H, Picard S, Braquet P, Hebert J, Laviolette M: Eosinophil-rich human polymorphonuclear leukocyte preparations characteristically release leukotriene C4 on ionophore A23187 challenge. *J-Allergy-Clin-Immunol* (1984), 74: 310-315

Borgeat P, Picard S: 19-Hydroxyprostaglandin B2 as an internal standard for on-line extraction-high-performance liquid chromatography analysis of lipoxygenase products. *Anal-Biochem* (1988), 171: 283-289

Borgeat P, Picard S, Vallerand P, Bourgoïn S, Odeimat A, Sirois P, Poubelle PE: Automated on-line extraction and profiling of lipoxygenase products of arachidonic acid by high-performance liquid chromatography. *Methods-Enzymol* (1990), 187: 98-116

Brocklehurst WE: In: Weir DM (Hrsg.): *Handbook of Experimental Immunology*; 2. Auflage Blackwell Scientific; Oxford; (1973) 43.1-43.12

Busija DW, Leffler CW: Leukotrienes increase levels of prostanoids in cerebrospinal fluid in piglets. *Prostaglandins* (1986), 32: 803-811

Chapnick BM: Divergent influences of leukotrienes C4, D4, and E4 on mesenteric and renal blood flow. *Am-J-Physiol* (1984), 246: H518-524

Clancy RM, Hugli TE: The extraction of leukotrienes (LTC4, LTD4, and LTE4) from tissue fluids. The metabolism of these mediators during IgE-dependent hypersensitivity reactions in lung. *Anal-Biochem* (1983), 133: 30-39

Cochrane CG, Müller-Eberhard HJ: The derivation of two distinct anaphylatoxin activities from the third and fifth components of human complement. *J-Exp-Med* (1968), 127: 371-386

Corey EJ, Clark DA, Goto G, Marfat A, Mioskowski C, Samuelsson B, Hammarström S: Stereospezifische Total Synthese einer "Slow - reacting Substance" of Anaphylaxis, Leukotriene C₁. *Nature J-AmChem-Soc* (1980), 102: 1436-1439

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

Damon M, Chavis C, Godard P, Michel FB, Crastes de Paulet A: Purification and mass spectrometry identification of leukotriene D₄ synthesized by human alveolar macrophages. *Biochem-Biophys-Res-Commun* (1983), 111: 518-524

Davidson EM, Rae SA, Smith MJ: Leukotriene B₄, a mediator of inflammation present in synovial fluid in rheumatoid arthritis. *Ann-Rheum-Dis* (1983), 42: 677-679

Dawson CM, Wang TWM, Rainbow SJ, Tickner TR: A Non-Extraction HPLC Method for the Simultaneous Determination of Serum Paracetamol and Salicylat: *Ann-Clin-Biochem* (1988), 25: 661-667

Dore-Duffy P, Ho SY, Donovan C: Cerebrospinal fluid eicosanoid levels: endogenous PGD₂ and LTC₄ synthesis by antigen-presenting cells that migrate to the central nervous system. *Neurology* (1991), 41: 322-324

Drazen JM, Venugopalan CS, Austen KF, Brion F, Corey EJ: Effects of leukotriene E on pulmonary mechanics in the guinea pig. *Am-Rev-Respir-Dis* (1982), 125: 290-294

Eskra JD, Pereira MJ, Ernest MJ: Solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography analysis of lipoxygenase pathway products. *Anal-Biochem* (1986), 154: 332-337

Feldberg W, Holden HF, Kellaway CH: Formation of lysocithin and of muscle-stimulating substance by snake venoms. *J-Physiol* (1938), 94: 232-248

Feuerstein G: Autonomic Pharmacology of Leukotrienes. *J-Auton-Pharmac* (1985), 5: 149-168

Fleisch JH, Zaborowsky BR, Cerimele BJ, Spaethe SM: Computerization of a bioassay: quantitation of slow reacting substance of anaphylaxis (SRS-A). *J-Pharmacol-Exp-Ther* (1979), 209: 238-243

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

Ford-Hutchinson AW: Leukotrienes: their formation and role as inflammatory mediators. *Fed-Proc* (1985), 44: 25-29

Garceau D, Ford-Hutchinson AW: Role of leukotrienes in allergen-induced vascular permeability changes in the guinea-pig conjunctiva. *Adv-Prostaglandin-Thromboxane-Leukot-Res* (1987), 17A: 167-170

Girard Y, Larve M, Jones TR, Rokach J: Synthesis of the sulfones of Leukotriene C-4, D4 and E4. *Tetrahedron-Lett* (1982), 23: 1023-1026

Goffinet A, Nguyen A: Leukotriene C4 binding sites in mouse brain: pharmacological characteristics. *Eur-J-Pharmacol* (1987) 140(3):343-347

Goldman DW, Goetzl EJ: Specific binding of leukotriene B4 to receptors on human polymorphonuclear leukocytes. *J-Immunol* (1982), 129: 1600-1604

Granström E: Two-dimensional thin-layer chromatography of prostaglandins and related compounds. *Methods-Enzymol* (1982), 86: 493-511

Hagmann W, Denzlinger C, Keppler D: Production of peptide leukotrienes in endotoxin shock. *FEBS-Lett.* (1985), 180: 309-313

Hagmann W, Denzlinger C, Keppler D: Role of peptide leukotrienes and their hepatobiliary elimination in endotoxin action. *Circ-Shock* (1984), 14: 223-235

Hamel R, Ford-Hutchinson AW, Lord A, Cirino M: Bronchoconstriction induced by N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine in the guinea pig, involvement of arachidonic acid metabolites. *Prostaglandins* (1984), 28: 43-56

Hammarström S, Hamberg M, Samuelsson B, Duell EA, Stawiski M, Voorhees JJ: Increased concentrations of nonesterified arachidonic acid, 12L-hydroxy-5,8,10,14-eicosatetraenoic acid, prostaglandin E₂, and prostaglandin F₂α in epidermis of psoriasis. *Proc-Natl-Acad-Sci-USA* (1975), 72: 5130-5134

Hammarström S, Hamberg M, Duell EA, Stawiski MA, Anderson TF, Voorhees JJ: Glucocorticoid in inflammatory proliferative skin disease reduces arachidonic and hydroxyeicosatetraenoic acids. *Science* (1977), 197 :994-996

Handley DA, Farley C, Deacon RW, Saunders RN: Evidence for distinct systemic extravasation effects of platelet activating factor, leukotrienes B₄, C₄, D₄ and histamine in the guinea pig. *Prostaglandins-Leukot-Med* (1986), 21: 269-277

Haupts M, Smektala K, Finkbeiner T, Simmet T, Gehlen W: Immunoreactive leukotriene C₄ levels in CSF of MS patients. *Acta-Neurol-Scand* (1992), 85: 365-367

Hayes EC, Lombardo DL, Girard Y, Maycock AL, Rokach J, Rosenthal AS, Young RN, Zamboni R, Zweerink HJ: Measuring leukotrienes of slow reacting substance of anaphylaxis: development of a specific radioimmunoassay. *J-Immunol* (1983), 131: 429-433

Hebert RL, Lamoureux C, Sirois P, Braquet P, Plante GE: Potentiating effects of leukotriene B₄ and prostaglandin E₂ on urinary sodium excretion by the dog kidney. *Prostaglandins-Leukot-Med* (1985), 18: 69-80

Henden T, Strand H, Borde E, Semb AG, Larsen TS: Measurements of Leukotrienes in Human Plasma by Solid Phase Extraction and High Performance Liquid Chromatography. *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids* (1993), 49: 851-854

Henke DC, Kouzan S, Eling TE: Analysis of leukotrienes, prostaglandins, and other oxygenated metabolites of arachidonic acid by high-performance liquid chromatography. *Anal-Biochem* (1984), 140: 87-94

Hoppe U, Hoppe EM, Peskar BM, Peskar BA: Radioimmunoassay for leukotriene E4. Use for determination of total sulfidopeptide-leukotriene release from rat gastric mucosa. *FEBS-Lett* (1986), 208: 26-30

Hua XY, Dahlen SE, Lundberg JM, Hammarström S, Hedqvist P: Leukotrienes C4, D4 and E4 cause widespread and extensive plasma extravasation in the guinea pig. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch-Pharmacol* (1985), 330: 136-141

Irkec C, Ercan S, Irkec M: Leukotrienes and neurological diseases. *Mikrobiyol-Bul* (1989), 23: 342-347

Jones TR, Davis C, Daniel EE: Pharmacological study of the contractile activity of leukotriene C4 and D4 on isolated human airway smooth muscle. *Can-J-Physiol-Pharmacol* (1982), 60: 638-643

Jones TR, Letts G, Chan CC, Davies P: Pharmacology And Pathophysiology Of Leukotrienes. In: Rokach J (Hrsg.): *Leukotrienes and Lipoxygenases; Bioactive Molecules*, Band 11, Elsevier; Amsterdam, Oxford, New York; (1989) 308-403

Jost W, Boos KS: Phasensysteme. In: Unger KK (Hrsg.): *Handbuch der HPLC; Teil 1- Leitfaden für Anfänger und Praktiker*, GIT Verlag; Darmstadt; (1989) 60-77

Jubiz W, Nolan G, Kaltenborn KC: An improved technique for extraction identification and and quantification of Leukotrienes. *J-Liq-Chromatogr* (1985), 8: 1519-1526

Keppler D, Huber M, Baumert T, Guhlmann A: Metabolic inactivation of leukotrienes. *Adv-Enzyme-Regul* (1989), 28: 307-319

Keppler D: The Heinrich-Wieland Prize presentation. Metabolism and analysis of leukotrienes in vivo. *Klin-Wochenschr* (1988), 17: 997-1005

Kikawa Y, Shigematsu Y, Sudo M: Leukotriene B₄ and 20-OH-LTB₄ in purulent peritoneal exudates demonstrated by GC-MS. *Prostaglandins-Leukot-Med* (1986), 23: 85-94

Klemp P: Regulation of local subcutaneous blood flow in patients with psoriasis and effects of antipsoriatic treatment on subcutaneous blood flow. *J-Invest-Dermatol* (1985), 85: 175-178

Kobayashi H, Ide H, Handa Y, Aradachi H, Arai Y, Kubota T: Effect of leukotriene antagonist on experimental delayed cerebral vasospasm. *Neurosurg* (1992), 31: 550-555

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

Kragballe K, Voorhees JJ, Goetzi EJ: Inhibition by leukotriene B₅ of leukotriene B₄-induced activation of human keratinocytes and neutrophils. *J-Invest-Dermatol* (1987), 88: 555-558

Kumlin M: Analytical methods for the measurement of leukotrienes and other eicosanoids in biological samples from asthmatic subjects. *J - Chromatogr A* (1996), 725: 29-40

Kumlin M, Dahlen SE: Characteristics of formation and further metabolism of leukotrienes in the chopped human lung. *Biochim-Biophys-Acta* (1990), 1044: 201-210

Kumlin M, Stensvad F, Larsson L, Dahlen B, Dahlen SE: Validation and application of a new simple strategy for measurements of urinary leukotriene E4 in humans. *Clin-Exp-Allergy* (1995), 25: 467-479

Lam S, Chan H, LeRiche JC, Chan-Yeung M, Salari H: Release of leukotrienes in patients with bronchial asthma. *J-Allergy-Clin-Immunol* (1988), 81: 711-717

Lassus A, Forsstrom S: A dimethoxynaphthalene derivative (RS-43179 gel) compared with 0.025% fluocinolone acetonide gel in the treatment of psoriasis. *Br-J-Dermatol* (1985), 113: 103-106

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

Liebig R, Bernauer W, Peskar BA: Prostaglandin, slow-reacting substance, and histamine release from anaphylactic guinea-pig hearts, and its pharmacological modification. *Naunyn-Schmiedeberg's-Arch-Pharmacol* (1975), 289: 65-76

Lindgren JA, Hammarström S, Goetzl EJ: A sensitive and specific radioimmunoassay for leukotriene C4. *FEBS-Lett* (1983), 152: 83-88

Maas RL, Lawson JA, Brash AR, Oates JA: Derivatization and analysis of leukotrienes by desorption - chemical ionization mass spectrometry at subnanomole level. *Adv-Prostaglandin-Thromboxane-Leukot-Res* (1983), 11: 229-234

Maclouf J, Murphy RC, Henson PM: Transcellular sulfidopeptide leukotriene biosynthetic capacity of vascular cells. *Blood* (1989), 74: 703-707

Marom Z, Shelhamer JH, Bach MK, Morton DR, Kaliner M: Slow reacting substances, leukotrienes C4 and D4 increase the release of mucus from human airways in vitro. *Am-Rev-Respir-Dis* (1982), 126: 449-451

Mathews WR, Rokach J, Murphy RC: Analysis of leukotrienes by high-pressure liquid chromatography. *Anal-Biochem* (1981), 118: 96-101

Meriluoto JAO, Eriksson JE: Rapid Analysis of Peptide Toxins in Cyanobacteria. *J- Chromatogr* (1988), 438: 93-99

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

Miller DK, Sadowski S, DeSousa D, Maycock AL, Lombardo DL, Young RN, Hayes EC: Development of enzyme-linked immunosorbent assays for measurement of leukotrienes and prostaglandins. *J-Immunol-Methods* (1985), 81: 169-185

Minami N, Tani E, Yokota M, Maeda Y, Yamaura I: Immunohistochemistry of leukotriene C4 in experimental cerebral vasospasm. *Acta-Neuropathol-Berl* (1991), 81: 401-407

Misson J, Clark W, Kendall MJ: Therapeutic advances: leukotriene antagonists for the treatment of asthma. *Journal-of-Clinical-Pharmacy-and-Therapeutics* (1999), 24: 17-22

Morris HR, Taylor GW, Piper PJ, Sirois P, Tippins JR: Slow-reacting substance of anaphylaxis: purification and characterisation. *FEBS-Lett* (1978), 87: 203-206

Morris HR, Taylor GW, Rokach J, Girard Y, Piper PJ, Tippins JR, Samhoun MN: Slow reacting substance of anaphylaxis, SRS-A, assignment of the stereochemistry. *Prostaglandins* (1980), 20: 601-607

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

Murphy RC, Mathews WR, Rokach J, Fenselau C: Comparison of biological-derived and synthetic leukotriene C4 by fast atom bombardment mass spectrometry. *Prostaglandins* (1982), 23(2): 201-206

Neu I, Mallinger J, Wildfeuer A, Mehlber L: Leukotrienes in the cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients. *Acta-Neurol-Scand* (1992), 86: 586-587

Nicoll-Griffith D, Zamboni R, Rasmussen JB, Ethier D, Charleson S, Tagari P: BIO-Fully Automated Sample Treatment high-performance liquid chromatography and radioimmunoassay for leukotriene E4 in human urine from asthmatics. *J-Chromatogr* (1990), 526: 341-354

O'Byrne PM: Why does airway inflammation Persist? Is it Leukotrienes? *Am-J-Resp-Crit-CareMed* (2000), 161(3):186-187

Örning L, Kaijser L, Hammarström S: In vivo metabolism of leukotriene C4 in man: urinary excretion of leukotriene E4. *Biochem-Biophys-Res-Commun* (1985), 130: 214-220

Ohnishi H, Kosuzume H, Kitamura Y, Yamaguchi K, Nobuhara M, Suzuki Y, Yoshida S, Tomioka H, Kumagai A: Structure of slow-reacting substance of anaphylaxis (SRS-A). *Prostaglandins* (1980), 20: 655-666

Okubo T, Takahashi H, Sumitomo M, Shindoh K, Suzuki S: Plasma levels of leukotrienes C4 and D4 during wheezing attack in asthmatic patients. *Int-Arch-Allergy-Appl-Immunol* (1987), 84: 149-155

Orange RP, Murphy RC, Karnovsky ML, Austen KF: The physicochemical characteristics and purification of slow-reacting substance of anaphylaxis. *J-Immunol* (1973), 110: 760-770

Orange RP, Valentine MD, Austen KF: Release of slow - reacting substance of anaphylaxis in the rat: polymorphonuclear leukocyte. *Science* (1967), 157: 318-319

Osborne DJ, Peters BJ, Meade CJ: The separation of leukotrienes and hydroxyeicosatetraenoic acid metabolites of arachidonic acid by high performance liquid chromatography (HPLC). *Prostaglandins* (1983), 26: 817-32

Paoletti P, Gaetani P, Grignani G, Pacchiarini L, Silvani V, Roriguez y Baena R: CSF leukotriene C4 following subarachnoid hemorrhage. *J-Neurosurg* (1988), 69: 488-493

Parker CW, Huber MM, Falkenhein SF: Pharmacologic characterization of slow-reacting substances. *Methods-Enzymol* (1982), 86: 655-667

Perry JA, Invergo B, Wagner H, Szczerba TJ, Rateike J: An Improved Internal Surface Reversed Phase. *J-Liq-Chromatogr* (1992), 15: 3343-3352

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

Pickett WC, Douglas MB: Automated extraction and HPLC resolution of lipoxygenase and cyclooxygenase products utilizing high pressure column switching. *Prostaglandins* (1985), 29: 83-90

Pinkerton TC, Koeplinger KA: High - Performance Liquid Chromatography. Separation of Peptides on a Diol - Gly - Phe - Phe Tripeptide - Bonded Phase. *J-Chromatogr* (1988), 458: 129-145.

Pirotzky E, Bidault J, Burtin C, Gubler MC, Benveniste J: Release of platelet-activating factor, slow-reacting substance, and vasoactive amines from isolated rat kidneys. *Kidney-Int* (1984), 25: 404-410

Pong SS, DeHaven RN: Characterization of a leukotriene D4 receptor in guinea pig lung. *Proc-Natl-Acad-Sci-USA* (1983), 80: 7415-7419

Powell WS: Precolumn extraction and reversed - phase high - pressure liquid chromatography of prostaglandins and leukotrienes. *Anal-Biochem* (1987), 164: 117-131

Powell WS: Rapid extraction of oxygenated metabolites of arachidonic acid from biological samples with octadecyl silyl silica. *Prostaglandins* (1980), 20: 947-957

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

Pradelles P, Grassi J, Maclouf J: Enzyme immunoassays of eicosanoids using acetylcholine esterase as label: an alternative to radioimmunoassay. *Anal-Chem* (1985), 57: 1170-1173

Qiu DW, Hui KP, Lee CW, Lim TK, Tan WC: Simplified method for measuring urinary leukotriene E-4. *Journal-of-Chromatography-B-Biomedical-Applications* (1996), 677: 152-155

Rainbow SJ, Dawson CM, Tickner TR: Direkt Serum Injection High - Performance Liquid Chromatographic Method for the Simultaneous Determination of Phenobarbital, Carbamazepine and Phenytoin. *J-Chromatogr* (1990), 527: 389-396

Rainbow SJ, Dawson CM, Tickner TR: Non-Extraction HPLC Method for the Simultaneous Measurement of Theophylline and Coffeine in Human Serum. *Ann-Clin-Biochem* (1989), 26: 527-532

Reichert K: Fließmittel. In: Unger KK (Hrsg.): *Handbuch der HPLC; Teil 1- Leitfaden für Anfänger und Praktiker*, GIT Verlag; Darmstadt; (1989) 32-41

Richmond R, Turner NC, Maltby N, Heavey D, Vial J, Dollery CT, Taylor GW: Single-step procedure for the extraction and purification of leukotrienes B₄, C₄ and D₄. *J-Chromatogr* (1987), 417: 241-251

Rokach J, Hayes EC, Girard Y, Lombardo DL, Maycock AL, Rosenthal AS, Young RN, Zamboni R, Zweerink HJ: The development of sensitive and specific radioimmunoassays for leukotrienes. *Prostaglandins-Leukot-Med* (1984), 13: 21-25

Ruane RJ, Wilson ID: Ion-pair-reversed-phase thin-layer chromatography of basic drugs using sulphonic acids. *J-Chromatogr* (1988), 441: 355-360

Sakuma Y, Tsunoda H, Katayama S, Abe S, Yamatsu I, Katayama K: Determination of plasma leukotrienes in antigen - induced bronchoconstrictive guinea pigs. *Prostaglandins* (1991), 41: 315-329

Salari H, Borgeat P, Steffenrud S, Richard J, Bedard PM, Hebert J, Pelletier G: Immunological and non-immunological release of leukotrienes and histamine from human nasal polyps. *Clin-Exp-Immunol* (1986), 63: 711-717

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

Samuelsson B, Dahlen SE, Lindgren JA, Rouzer CA, Serhan CN: Leukotrienes and lipoxins: structures, biosynthesis, and biological effects. *Science* (1987), 237: 1171-1176

Samuelsson B: Leukotrienes: mediators of immediate hypersensitivity reactions and inflammation. *Science* (1983), 220: 568-575

Sarau HM, Mong S, Foley JJ, Wu HL, Croke ST: Identification and characterization of leukotriene D4 receptors and signal transduction processes in rat basophilic leukemia cells. *J-Biol-Chem* (1987), 262: 4034-4041

Sasai K: Plasma immunoreactive leukotriene C4 levels in patients with Kawasaki disease. *Jpn-J-Allergol* (1987), 36: 1086-1093

Schulz R, Seeger W: Release of leukotrienes into the perfusate of calcium-ionophore stimulated rabbit lungs. Influence of 5-lipoxygenase inhibitors. *Biochem-Pharmacol* (1986), 35: 183-193

Serhan CN, Lundberg U, Weissmann G, Samuelsson B: Formation of leukotrienes and hydroxy acids by human neutrophils and platelets exposed to monosodium urate. *Prostaglandins* (1984), 27: 563-581

Sharon P, Stenson WF: Enhanced synthesis of leukotriene B₄ by colonic mucosa in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* (1984), 86: 453-460

Shibukawa A, Nagao M, Kuroda Y, Nakagawa T: Stereoselective Determination of Free Warfarin Concentration in Protein Binding Equilibrium Using Direct Sample Injection and an On - Line Chromatographic System. *Anal-Chem* (1990), 62: 712-716

Shindo N, Saito T, Murayama K: Rapid quantifikation of 11 prostanoids by combined capillary column gas chromatography and negative ion chemical ionization mass spectrometry: application to prostanoids released from normal human embryonic lung fibroblasts W138 in a culture medium. *Biomed-Environ-Mass-Spektrom* (1988), 15: 25-32

Simmet T, Luck W, Winking M, Delank WK, Peskar BA: Identification and characterization of cysteinyl -leucotriene formation in tissue slices from human intracranial tumors: evidence for their biosynthesis under in vivo conditions. *J-Neurochem* (1990), 54(6): 2091-2099

Sjölander A, Grönroos E: Leukotriene D₄-induced signal transduction. *Ann N-Y-Acad-Sci* (1994), 744: 155-160

Spector R, Goetzl EJ: Leukotriene C₄ transport and metabolism in the central nervous system. *J-Neurochem* (1986), 46: 1308-1312

Spector R, Goetzl EJ: Role of concentrative leukotriene transport systems in the central nervous system. *Biochem-Pharmacol* (1986), 35: 2849-2853

Steffenrud S, Salari H: Reversed-phase ion-interaction chromatography of leukotrienes, lipoxins and related compounds. *J-Chromatogr* (1988), 427:1-7

Stimler NP, Bach MK, Bloor CM, Hugli TE: Release of leukotrienes from guinea pig lung stimulated by C5ades Arg anaphylatoxin. *J-Immunol* (1982), 128: 2247-2252

Tagari P, Ethier D, Carry M, Korley V, Charleson S, Girard Y, Zamboni R: Measurement of urinary leukotrienes by reversed-phase liquid chromatography and radioimmunoassay. *Clin-Chem* (1989), 35: 388-391

Tagliaro F, Dorizzi R, Frigerio A, Marigo M: Non-Extraction HPLC Method for the Simultaneous Measurement of Dyphylline and Doxofylline in Serum. *Clin-Chem* (1990), 36: 113-115

Taniguchi N, Mita H, Saito H, Yui Y, Kajita T, Shida T: Increased generation of leukotriene C4 from eosinophils in asthmatic patients. *Allergy* (1985), 40: 571-573

Taylor GW, Morris HR: Lipoxygenase pathways. *Br-Med-Bull* (1983), 39(3): 219-222

Taylor GW, Watson D: Biomedical applications of thermospray liquid chromatography-mass spectrometry. *J-Chromatogr* (1987), 394: 135-146

Unger KK: Auswertung. In: Unger KK (Hrsg.):*Handbuch der HPLC; Teil 1- Leitfaden für Anfänger und Praktiker*, GIT Verlag; Darmstadt; (1989) 96-98

Unterberg A, Schmidt W, Wahl M, Ellis EF, Marmarou A, Baethmann A: Evidence against leukotrienes as mediators of brain edema. *J-Neurosurg* (1991), 74: 773-780

VanAlstyne EL, Spaethe SM: Rapid method for automated on-line extraction and fractionation of plasma leukotrienes and 12-hydroxy-5,8,10,14-eicosatetraenoic acids by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J-Chromatogr* (1992), 579: 37-43

Verhagen J, Walstra P, Veldink GA, Vliegthart JF, Bruynzeel PL: Separation and quantitation of leukotrienes by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Prostaglandins-Leukot-Med* (1984), 13: 15-20

Verhagen J, Wassink GA, Kijne GM, Vietor RJ, Bruynzeel PLB: Rapid, simple and efficient extraction of arachidonic acid metabolites, including the sulphidopetide leukotrienes LTC₄ and LTD₄, using octadecyl reversed-phase extraction. *J-Chromatogr* (1986) 378: 208-214

Voller A, Bidwell D and Bartlett A, In: Rose NR and Friesmann H, (Hrsg.): *Manual of Clinical Immunology*; American Society for Microbiology; Washington DC; (1976) 506-512

Watanabe T, Shimizu T, Miki I, Sakanaka C, Honda Z, Seyama Y, Teramoto T, Matsushima T, Ui M, Kurokawa K: Characterization of the guinea pig lung membrane leukotriene D₄ receptor solubilized in an active form. Association and dissociation with an islet-activating protein-sensitive guanine nucleotide-binding protein. *J-Biol-Chem* (1990), 265: 21237-21241

Weiss JW, Drazen JM, Coles N, McFadden ER Jr, Weller PF, Corey EJ, Lewis RA, Austen KF: Bronchoconstrictor effects of leukotriene C in humans. *Science* (1982), 216: 196-198

Westcott JY, Maxey KM, MacDonald J, Wenzel SE: Immunoaffinity resin for purification of urinary leukotriene E₄. *Prostaglandins-and-Other-Lipid-Mediators* (1998), 55: 301-321

Westcott JY, Murphy RC, Stenmark K: Eicosanoids in human ventricular cerebrospinal fluid following severe brain injury. *Prostaglandins* (1987), 34:877-887

White RP, Leffler CW, Bada HS: Eicosanoid levels in CSF of premature infants with posthemorrhagic hydrocephalus. *Am-J-Med-Sci* (1990), 299: 230-235

Williams JD, Czop JK, Austen KF: Release of leukotrienes by human monocytes on stimulation of their phagocytic receptor for particulate activators. *J-Immunol* (1984), 132: 3034-3040

Winking M, Deinsberger W, Joedicke A, Boeker DK: Cysteinyl-leukotriene levels in intracerebral hemorrhage: an edema-promoting factor? *Cerebrovasc-Dis* (1998), 8: 318-326

Winking M, Heldt RM, Simmet T: Thrombin stimulates activation of the cerebral 5 -lipoxygenase pathway during blood-brain cell contact. *J-Cereb Blood-Flow-Metab* (1996), 16: 737-745

Winking M, Lausberg G, Simmet T: Malignancy dependent formation of cysteinyl-leukotrienes in human brain tumor tissues and its detection in urine; in Pisco K, Klinger M, Brock M (eds): *Neurosurgical Standards, Cerebral Aneurysms, Malignant Gliomas*. *Adv-Physiol Berlin*, Springer, (1992), 20: 334-335

Winking M, Mueller HW, Deinsberger W, Joedicke A, Boeker DK: Levels of immunoreactive cysteinyl-leukotrienes in CSF after subarachnoid haemorrhage correlate with blood flow-velocity in TCD. *Acta Neurochir* (1997), 139: 764-769

Woodward DF, Ledgard SE: Effect of LTD₄ on conjunctival vasopermeability and blood-aqueous barrier integrity. *Invest-Ophthalmol-Vis-Sci* (1985), 26: 481-485

Woodward DF, Weichman BM, Gill CA, Wasserman MA: The effect of synthetic leukotrienes on tracheal microvascular permeability. *Prostaglandins* (1983), 25: 131-142

Wynalda MA, Brashler JR, Bach MK, Morton DR, Fitzpatrick FA: Determination of leukotriene C4 by radioimmunoassay with a specific antiserum generated from a synthetic hapten mimic. *Anal-Chem* (1984), 56: 1862-1865

Yokota M, Tani E, Maeda Y, Kokubu K: Effect of 5-lipoxygenase inhibitor on experimental delayed cerebral vasospasm. *Stroke* (1987), 18: 512-518

Young RN, Girard Y: Assay Methods For Various Lipoxygenase Products. In: Rokach J (Hrsg.): *Leukotrienes and Lipoxygenases; Bioactive Molecules*, Band 11, Elsevier; Amsterdam, Oxford, New York; (1989) 209-307

Young RN, Kakushima M, Rokach J: Studies on the preparation of conjugates of leukotriene C4 with proteins for development of an immunoassay for SRS-A (1). *Prostaglandins* (1982), 23: 603-613

Yu W, Powell WS: Analysis of Leukotrienes, Lipoxins and Monooxygenated Metabolites of Arachidonic Acid by Reversed - Phase High - Pressure Liquid Chromatography. *Anal-Biochem* (1995), 226: 241-251

Zakrzewski JT, Sampson AP, Evans JM, Barnes NC, Piper PJ, Costello JF: The biotransformation in vitro of cysteinyl leukotrienes in blood of normal and asthmatic subjects. *Prostaglandins* (1989), 37: 425-444

Zijlstra FJ, Vincent JE: Determination of leukotrienes and prostaglandins in [¹⁴C] arachidonic acid labelled human lung tissue by high-performance liquid chromatography and radioimmunoassay. *J-Chromatogr* (1984), 311: 39-50

Ziltener HJ, Chavillaz PA, Jörg A: Leukotriene formation by eosinophil leukocytes. Analysis with ion-pair high pressure liquid chromatography and effect of the respiratory burst. *Hoppe-Seylers-Z-Physiol-Chem* (1983), 364: 1029-1037

7. Abkürzungsverzeichnis

BSA	Bovine Serum Albumin
cAMP	Zyklo - Adenosinmonophosphat
Cys - LT	Cysteinyl - Leukotriene
DNP	N - (2,4 - Dinitro - 5 - Flouorophenyl)
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme - Linked Immuno Sorbent Assay
FAB	Fast Atom Bombardement
Fc	Fragment crystalline
FMPL	N - Formyl - Methionyl - Leucyl - Phenylalanin
Gp	G Protein
G'p	Verändertes G Protein
HEA	Hydroxyeicosanoensäure
HETE	Hydroxyeisosateranoensäure
HHT	Heptadecatrienoische Säure
IP ₃	Inositoltrisphosphat
ISRP	Internal Surphase Reversed Phase
K Da	Kilo Dalton
KLH	Keyhole Limpet Hemocyanin
LH	Luteinisierendes Hormon
LO	Lipoxygenase
LT	Leukotrien
MBFTA	N - Methyl - Bis - Trifluoroacetamid
MeOH	Methanol
ODS	Octadecyl Silyl Silica
PAF	Thrombozytenaktivierender Faktor
PIP ₃	Phosphaditylinositolbiphosphat
PLC	Phospholipase C
PG	Prostaglandin
RIA	Radioimmunoassay
RP	Reversed Phase
RPM	Rounds per minute
SPIRA	Solid Phase Immunoradioassay
SRS - A	Slow reacting substance of anapylaxis

TEMPO	2,2,6,6 - Tetramethylpiperidin - 1 - oxyl
TF	Trifluoroleukotrien
TFA	Trifluoroessigsäure
UPM	Umdrehungen pro Minute

8. Zusammenfassung

Zur Messung von LTC₄, LTD₄ und LTE₄ im Liquor cerebrospinalis bei Patienten mit Subarachnoidalblutung wurde ein HPLC - Verfahren entwickelt, das den ersten Extraktionsschritt durch eine Vorsäule ersetzt, die durch ein Schaltsystem an die Hauptsäule gekoppelt wird.

Davor erfolgte lediglich eine einfache Aufbereitung durch Zugabe von MeOH und 20 - TFE₄ als interner Standard zur Probe sowie eine nachfolgende Ultrafiltration.

Nach Testung mehrerer Säulen wurde die Pinkerton 4,6 x 250 mm bei einer Flussmittelzusammensetzung von 55% MeOH : 45% wässriger Acetat - Lösung (0,1%, pH 7,2) als Vorsäule zur 4 x 250 mm Inertsil ODS - Hauptsäule mit einer Flussmittelzusammensetzung von 68% MeOH : 32% Acetat - Puffer (0,1%, pH 5,6) verwendet. Die abschließende Elution der Substanzen erfolgte in der Reihenfolge 20 - TFE₄, LTE₄, LTD₄ und LTC₄. Dabei wurde LTC₄, das bei Subarachnoidalblutungen und anderen Hirnerkrankungen im Hinblick auf die Entwicklung eines Vasospasmus besondere Relevanz zeigt, besonders gut getrennt.

Nach Sammlung von Fraktionen wurde deren Quantifizierung mittels eines ELISA durchgeführt.

Bei 35 Liquorproben von 10 Patienten mit Subarachnoidalblutung, die aus unterschiedlichen Zeitpunkten nach dem Ereignis stammten, waren LTC₄, LTD₄ und LTE₄ mit 459 ± 516 pg/ml, 187 ± 146 pg/ml und 206 ± 128 pg/ml im Vergleich zu den 5 Kontrollproben mit 147 ± 45 pg/ml, 176 ± 108 pg/ml und 128 ± 128 erhöht.

Diese Tendenz zeigte sich vor allem für LTC₄ auch bei anderen Autoren.

Je 10 mit internem Standard und Cys - LT dotierte H₂O und Liquorproben aus einem Pool zeigten durchschnittliche Wiederfindungsraten von $88,8 \pm 5,2\%$ bzw. $71,9 \pm 3,6\%$, während die 20 - TFE₄ - Werte im Patientenliquor bei $75,5 \pm 18,6\%$ lagen. Die Spezifität des Verfahrens wies beim t - Test für unabhängige Variablen ein $p < 0,01$ auf.

Aufgrund der geringen Diskrimination der Leukotriensubtypen nach der Ultrafiltration und des fehlenden Vorkommens von 20 - TFE₄ im menschlichen Organismus konnte 20 - TFE₄ als Maß für den Substanzverlust herangezogen werden.

Die Sensitivität für die zu bestimmenden Cys - LT lag nach einer Verdünnungskurve bei 0,5 ng/Injektion und war damit im unteren Bereich der bei biologischen Proben vorkommenden Konzentrationen. Durch den ELISA wurde sie auf 10 pg/ml angehoben.

Bei insgesamt guter Sensitivität, Spezifität und Reproduzierbarkeit wäre durch eine Automatisierung von Probeneinspritzung, Ventilfunktion und Probensammlung auch eine Anwendbarkeit dieser Methode in der Routinediagnostik gegeben. Eine Analyse von Plasma und unter entsprechender Aufbereitung auch von Urin ist denkbar.

Das Verfahren ist gegenüber HPLC - Methoden mit manueller Kartuschenextraktion aufgrund der Vortrennung über eine Chromatographie in einer Vollsäule überlegen. Zudem ist die Durchführbarkeit schneller und die Wiederfindungsraten sind insgesamt besser.

Die klinische Konsequenz einer Leukotrienbestimmung im Liquor könnte neben der Verlaufsdagnostik auch therapeutische Schritte beinhalten (z.B. Gabe von Leukotrienantagonisten bei Vasospasmus der Cerebralgefäße).

9. Summary

A HPLC procedure for the measurement of LTC₄, LTD₄ and LTE₄ in cerebrospinal fluid of patients with subarachnoid hemorrhage was developed, which replaces the usual extraction step through the addition of methanol and internal standard (20-TFE₄), an ultrafiltration, and a pre-column, which was coupled via a switching valve system to the main column.

After evaluating several columns the Pinkerton 4,6 x 250 mm with a mobile phase composition of 55% MeOH : 45% aqueous acetate solution (0,1%, pH 7,2) was used as pre-column to the 4 x 250 mm Inertsil ODS main-column with a mobile phase composition of 68% MeOH : 32% acetate – buffer (0,1%, pH 5,6). The elution sequence was, respectively: 20-TFE₄, LTE₄, LTD₄ and LTC₄.

LTC₄, which shows special relevance in subarachnoid haemorrhage and other brain diseases in regard to the development of a vasospasm, was especially well separated.

After collection of their fraction the quantification was accomplished by means of an ELISA.

In 35 samples of cerebrospinal fluid from 10 patients with subarachnoid haemorrhage, obtained at different times after the event, LTC₄, LTD₄ and LTE₄ were 459 ± 516 pg/ml, 187 ± 146 pg/ml and 206 ± 128 pg/ml, respectively. In comparison the 5 reference samples were lower: 147 ± 45 pg/ml, 176 ± 108 pg/ml and 128 ± 128 pg/ml, respectively.

This tendency was most pronounced for LTC₄ as reported by other authors as well.

10 samples of H₂O and cerebrospinal fluid from a pool, each spiked with internal standard and Cys-LT, showed average recoveries of 88,8 ± 5,2% and 71,9 ± 3,6%, while the 20-TFE₄ values in cerebrospinal fluid of patients were 75,5 ± 18,6 %. The specificity of the procedure in the t-test for independent variables showed a p of < 0,01.

Based on the low discrimination of the leucotriene subtypes after the ultrafiltration, and the missing occurrence of 20-TFE₄ in the human organism, 20-TFE₄ could be used as an indicator for the material loss.

According to a dilution curve the sensitivity for the determined Cys-LT was about 0,5 ng/injection, and was thereby, in the lower range of the concentrations occurring with biological samples. It was improved to 10 pg/ml by the ELISA.

The good sensitivity, specificity, and reproducibility of this method would make it useful for routine diagnostics if sample injection, valve function, and sample collection were automated. An analysis of plasma, and under suitable preparation also of urine, is conceivable.

Compared to HPLC methods with cartridge extraction this method is superior due to a pre-separation by a full-sized column. Furthermore, it is faster and the recovery rates are higher.

The clinical consequence of a leucotriene analysis in the cerebrospinal fluid could be to allow therapeutic steps (e.g. application of leucotriene antagonists in cerebral vasospasm) besides the progress diagnostics.

10. Danksagung

Herrn Prof. Dr. M. Winking (Neurochirurgische Klinik der Justus - Liebig Universität Gießen) danke ich sehr für die Überlassung des Themas und für die Betreuung der Arbeit.

An Herrn Prof. Dr. K. Böker geht mein Dank für die Ermöglichung zur Durchführung der Arbeit.

Besonderen Dank auch an Herrn Dr. H. W. Mueller und seine Mitarbeiter des ehemaligen Liquorlabors der Neurochirurgischen Klinik der Justus - Liebig Universität Gießen für die Unterstützung bei der Durchführung des experimentellen Teils der Arbeit.

Für die Einführung in die statistischen Verfahrensweisen und die hilfreiche Unterstützung bei der statistischen Auswertung danke ich dem Institut für Medizinische Informatik der Justus - Liebig Universität Gießen, insbesondere Herrn Dr. R.-H. Bödeker.

Schließlich geht mein Dank auch an die Zentrale Biotechnische Betriebseinheit des Strahlencentrums der Justus - Liebig Universität Gießen, in der der größte Teil der praktischen Arbeit stattfand.

11. Lebenslauf

Name: Mourtzis
 Vorname: Alexandros
 Geburtsdatum: 02.12.1970
 Geburtsort: Darmstadt
 Eltern: Antoine Mourtzis, Charalampia Mourtzis.
 geb. Staniou

1977 - 1981: Grundschule in Darmstadt
 1981 - 1983: Förderstufe in Seeheim bei Darmstadt
 1983 - 1990: Gymnasium in Seeheim bei Darmstadt
 Abschluss mit Abitur

10. 1990: Immatrikulation an der Justus - Liebig
 Universität Gießen für den Studiengang
 Humanmedizin

09. 1992: Ärztliche Vorprüfung in Gießen
 08. 1993: Erstes Staatsexamen in Gießen
 04. 1996: Zweites Staatsexamen in Gießen
 04. 1997: Drittes Staatsexamen in Wetzlar

07. 1997- 12. 1997: Arzt im Praktikum in der kinderchirurgischen
 Abteilung des Kinderkrankenhauses
 St. Marien in Landshut

01. 1998 - 12. 1998: Arzt im Praktikum an der Universitäts-
 Kinderklinik in Ulm

09. 1999 – 04. 2002: Assistenzarzt an der Kinderklinik des
 Klinikums Obergöltzsch / Rodewisch

05. 2002 – 10. 2004: Assistenzarzt an der Klinik für Kinder- und
 Jugendmedizin des Klinikums Heidenheim

seit 03. 2004: Facharzt für Kinder- und Jugendmedizin
 seit 12. 2005: Facharzt an der Kinder- und Jugendklinik des
 Södra Älvsborgs Sjukhus Borås /Schweden

Borås, den 01.07.2005

Alexandros Mourtzis

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