

# Funktionelle durchflußzytometrische Untersuchungen an Thrombozyten – eine Übersicht

## Functional flow cytometry investigations of thrombocytes – A review

J. Neumüller<sup>1</sup>, Makyieh Tohidast-Akrad<sup>1</sup>, M. Fischer<sup>2</sup>, W. R. Mayr<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Ludwig Boltzmann Institut für Rheumatologie und Balneologie, Wien-Oberlaa

<sup>2</sup> Zentrallabor des Krankenhauses der Stadt Wien-Lainz

<sup>3</sup> Klinische Abteilung für Blutgruppenserologie der Universität Wien

### Zusammenfassung:

*In dieser Übersicht wird die Verwendbarkeit der Durchflußzytometrie (DFZ) für Untersuchungen an Thrombozyten als Hilfe bei der Diagnose thrombozytärer Erkrankungen (Krankheiten mit defizienter Expression „thrombozytenspezifischer“ GP (GP: Glykoproteine) und autoimmuner sowie alloimmuner Thrombasthenien) behandelt. Außerdem wird auf die Möglichkeit funktioneller Studien in der Grundlagenforschung und bei der Patientenüberwachung hingewiesen. Zu Beginn werden die apparativen Erfordernisse und die Methodik der DFZ sowie die geeignete Präparationstechnik der Thrombozyten für die DFZ besprochen. Anschließend folgt eine Zusammenfassung der „thrombozytenspezifischen“ GPs und der HLA Klasse I Antigene, die teils als integrale Membran-GP, teils jedoch nur in adsorbierter Form an der Thrombozytenmembran nachweisbar sind. In diesem Zusammenhang werden eigene DFZ-Untersuchungen über die Expression von „thrombozytenspezifischen“ GP und HLA Klasse I Antigenen bei Lagerung der Thrombozyten in Zitratpuffer bei pH 7,2 sowie nach Behandlung mit Chloroquin bei pH 7,2 oder pH 5 (2 Stunden) oder mit Zitronensäure bei pH 3 (10 Minuten) diskutiert. Durch diese Behandlung kann die Antigenität der HLA Klasse I Antigene reduziert oder ausgelöscht werden, während die „thrombozytenspezifischen“ GPs nahezu unverändert bleiben. Es konnte mithilfe von monoklonalen Antikörpern gegen die native schwere Kette der HLA Klasse I Antigene (die jedoch nicht mit dem gesamten Heterodimer reagieren) gezeigt werden, daß es bei der Chloroquin- oder Zitronensäurebehandlung hauptsächlich zu einer Abspaltung des  $\beta_2$ -Mikroglobulins kommt, sodaß neue Epitope an der nativen schweren Kette des HLA Klasse I Moleküls für diese Antikörper erkennbar werden. Diese Methodik des HLA-Antigen-„Strippings“ kann zur Differenzierung von Allo- oder Autoantikörpern gegen HLA Klasse I Antigene bzw. thrombozytenspezifische Antigene verwendet werden. Abschließend werden Methoden zur Erkennung der Signaltransduktion bei der Thrombozytenaktivierung besprochen. Zu diesem Zweck kann entweder die Membranassoziation des GPs GMP140, das in „ruhenden“ Thrombozyten nur in den  $\alpha$ -Granula vorliegt, oder der intrazelluläre  $Ca^{2+}$ -Influx bestimmt werden.*

### Schlüsselwörter:

Thrombozyten – HLA Antigene – „thrombozytenspezifische“ Glykoproteine – Durchflußzytometrie

### Summary:

*The present review paper discusses the use of flow cytometry for investigations of platelets in the diagnosis of disorders (disorders with deficient expression of „thrombocyte specific“ GPs (GPs: glycoproteins) and autoimmune as well as alloimmune thrombopenias). Furthermore the use of flow cytometry for basic research and patient-monitoring is summarized. First the apparatus requirements and the methodology of flow cytometry as well as the appropriate preparatory techniques are mentioned, followed by an overview of „thrombocyte specific“ GPs and the significance of HLA class I antigens for platelets. HLA class I antigens are partially inserted into the cell membrane and partially only passively adsorbed. Our own results, obtained by flow cytometry, regarding the expression of „platelet specific“ GPs and HLA class I antigens on platelets, incubated in citrate buffer at pH 7.2 and after treatment with chloroquine at pH 7.2 or pH 5 (for 2 hrs)*

or with citric acid at pH 3 (for 10 min), indicated that chloroquine and citric acid reduced the antigenicity of HLA class I antigens while the antigenicity of platelet specific GPs remained unaltered. We were also able to show that when using monoclonal antibodies against the native heavy chain of HLA class I antigens, which do not recognize the whole heterodimer, the treatment of platelets with chloroquine or citric acid mainly leads to a splitting of the  $\beta_2$ -microglobulin from the heavy chain of the HLA class I molecule. Thus the heavy chain becomes accessible to these antibodies. This method of HLA class I antigen „stripping“ makes it possible to discriminate between antibodies against HLA class I antigens and antibodies against „thrombocyte specific“ antigens. Finally, flow cytometric methods for the investigation of signal transduction in platelet activation are discussed, whereby either the expression of an  $\alpha$ -granule GP (GMP140) on the cell membrane of platelets or the increase in intracellular  $Ca^{2+}$  ions can be determined.

### Keywords:

thrombocytes – HLA antigens – „thrombocyte specific“ glycoprotein – flow cytometry

Die Erforschung „thrombozytenspezifischer“ Membran-GP sowie deren Bedeutung für die Aktivierung von Thrombozyten ist für die Gerinnungsdiagnostik, die Transfusionsmedizin, die Leukämieforschung sowie für das Verständnis pathologischer Gefäßveränderungen von Bedeutung [1–9]. Dazu hat die Einführung der DFZ-Technik einen wesentlichen Beitrag geleistet. In dieser Übersicht sollen die Methodik der DFZ, die Bedeutung der „thrombozytenspezifischen“ Membran-GP und „thrombozytenspezifischer“ Antikörper sowie DFZ Thrombozytenfunktionstests besprochen werden. Außerdem wird über eigene vergleichende Untersuchungen hinsichtlich des Einflusses von Chloroquin- oder Zitronensäurebehandlung menschlicher Blutplättchen auf die Antigenität von HLA Klasse I Dimermolekülen und „thrombozytenspezifischer“ GP berichtet.

### *Durchflußzytometrie (DFZ)*

Die DFZ ist im letzten Jahrzehnt zu einer unerläßlichen Methode im Bereich der immunologischen Forschung geworden. Sie ermöglicht unter anderem eine Quantifizierung der Bindung polyklonaler und monoklonaler Antikörper an entsprechende zelluläre Bindungsstellen. Diese Antikörper werden entweder als direkt fluorochromierte Konjugate, biotinyliert oder unkonjugiert mit entsprechenden 2.-Stufe-Reagenzien verwendet (fluorochromierte Anti-Immunglobulin-Konjugate, die gegen das Immunglobulin des primären Antikörpers gerichtet sind, bzw. fluorochromierte Avidin- oder Streptavidinkonjugate). Zwischen Biotin und Avidin bzw. Streptavidin besteht eine hohe Affinität. Daher sind biotinylierte Antikörper in Kombination mit konjugiertem Avidin oder Streptavidin für den Nachweis schwach exprimierter Antigene oder bei schwacher Affinität der Antikörper zum betreffenden Antigen sehr gut geeignet. Nach Möglichkeit ist die Verwendung direkt konjugierter Antikörper den 2-Stufenmethoden vorzuziehen, da sie aufgrund kürzerer Präparationsdauer eine höhere Lebensfähigkeit der Zellen und eine Quantifizierung der Antigendichte an der Zelloberfläche gewährleisten.

Als Fluorochrome kommen vor allem Fluoresceinisothiocyanat (FITC), Phycocerythrin (PE), und Peridinin-Chlorophyll (PerCP) in Frage. Mithilfe der Standardausdrüstung eines geeigneten DFZs (in eigenen Untersuchungen wurde ein FACScan (Becton & Dickinson, Mountain View,

USA) verwendet), können bei Lichtanregung mittels Argonlaser (Wellenlänge: 488 nm) fünf Parameter erhoben werden: Vorwärtstreulicht (FSC), 90° Seitentreulicht (SSC), Grünfluoreszenz (FL1) und zwei Rotfluoreszenzbereiche (FL2 bei Verwendung von PE und FL3 bei Verwendung von PerCP). Die zu untersuchenden Zellen müssen als Einzelzellen in Suspension in Pufferlösung lebend oder fixiert (meist mit Paraformaldehyd) vorliegen. Um reproduzierbare Meßergebnisse zu erhalten, bewährt sich die Kalibration des DFZs mit monomorphen Latexkügelchen (Durchmesser z.B. 7,1  $\mu$ m), die sich jedoch aus 5 unterschiedlichen Populationen genau definierter Fluorochrombelastung zusammensetzen [10]. In eigenen Untersuchungen wurden zu diesem Zweck Quantum-1000-beads (Flow Cytometric Cooperation, Res. Triangle Park, USA) verwendet (Abb. 1). Nach dieser Einstellung des DFZs ist aufgrund der geringen Größe der Thrombozyten eine Erhöhung der Empfindlichkeit des Detektors für beide Scatter-Signale vorzunehmen.

Zur Darstellung von Thrombozyten aus dem peripheren Blut mittels DFZ sind bestimmte präparative Schritte zu beachten [11, 12]. Es ist vor allem notwendig, weitgehend die Aggregation der Thrombozyten zu vermeiden, um sie im Zweifachhistogramm (FSC $\times$ SSC) als distinkte Zellpopulation erkennen zu können. Die Blutabnahme sollte in speziellen Zitrat-beschichteten Röhrchen (ACD-Röhrchen) erfolgen, um Blutgerinnung und Aggregation zu hemmen. Eine hundertprozentige Abtrennung der Thrombozyten von den anderen Blutzellen ist nicht notwendig, eine starke Anreicherung jedoch erforderlich. Zu diesem Zweck können Thrombozyten-Zentrifugen oder Flotationsmittel eingesetzt werden. Nach eigener Erfahrung hat sich die Verwendung von Ficoll Hypaque (Pharmacia, Uppsala, Schweden) in einer Verdünnung von 1:5 mit Zitratpuffer (0,15 M  $C_6H_5Na_3O_7$  in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS), pH 7,2) bewährt. In diesem Medium verbleiben die Thrombozyten nach 10minütiger Zentrifugation bei 400 $\times$ g im Überstand und können durch weiteres dreifaches Waschen mittels 10minütiger Zentrifugation bei 400 $\times$ g mit einer Reinheit von etwa 90–95% gewonnen werden. Für die Markierung der Thrombozyten mit fluorochromierten Antikörpern sollten Sättigungsexperimente durchgeführt werden (Abb. 2), um jenes Thrombozyten/Antikörper-Verhältnis herauszufinden, bei dem eine Sättigung der Antigen-Bindungsstellen erreicht wird. Höhere

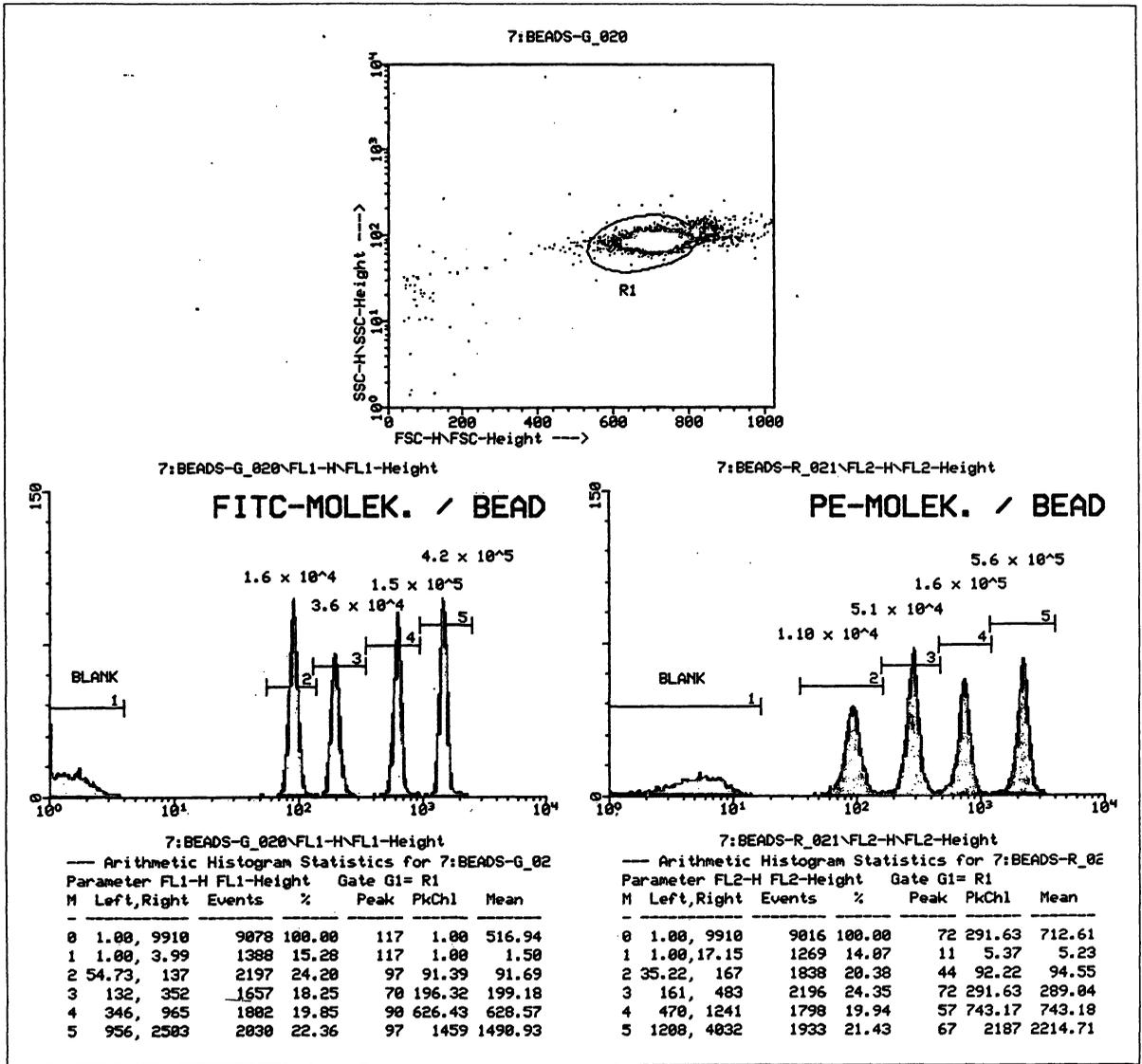


Abb. 1: DFZ-Darstellung von 5 Gruppen von Latexkügelchen gleicher Größe, aber unterschiedlicher Fluorochromierung, in Form von Einfachhistogrammen. Die erste Gruppe von Kügelchen ist nicht mit Fluorochromen beladen. Die Beladung mit Fluoresceinisothiocyanat oder Phycoerythrin ist über den weiteren Gruppen in den Histogrammen für Grünfluoreszenz (FL1) oder Rotfluoreszenz (FL2) angegeben.

gung der Antigen-Bindungsstellen erreicht wird. Höhere Konzentrationen an Antikörper können zu deren verminderten Bindung an die Oberflächenantigene der Thrombozyten führen.

DFZ-Untersuchungen können an frischen [13] oder tiefgefrorenen, mit einem Cryoprotectans versehenen Thrombozyten [14, 15] vorgenommen werden.

„Thrombozytäre“ Oberflächenantigene

Der DFZ-Nachweis thrombozytärer Oberflächenantigene ist einerseits für die Diagnose „thrombozytenspezifischer“ Defizienzen, wie dem Bernard ‚Soulier‘ Syndrom und der Glanzmann’schen Thrombasthenie [1, 12–16], sowie andererseits für die Differenzierung von Erkrankungen vorteilhaft, die durch Antikörper gegen „thrombozytenspezifische“ Antigene oder gegen HLA Klasse I Antigene hervorgerufen werden (alloimmune neonatale Thrombopenie [17, 18], Posttransfusions-Purpura [19, 20] und autoimmune thrombozytopenische Purpura [21–23]).

a) „Thrombozytenspezifische“ GP gehören einer Gruppe von Adhäsionsmolekülen an, die auch an anderen Zellen vorkommen. Diese befinden sich vor allem auch an Granulozyten, Monozyten/Makrophagen, Endothelzellen und

Fibroblasten und sind bei der Gefäßanlagerung und Gewebeinwanderung lymphoider und myeloider Zellen im Bereich von Entzündungen von Bedeutung [siehe Übersicht in 24, 25]. Die sog. „thrombozytenspezifischen“ GP (GP Ia, Ib, Ic, IIa, IIb, IIIa etc.) sind für die Adhäsion, Aggregation und für die Immunogenität der Thrombozyten verantwortlich. GPIb besitzt eine starke Affinität zu GPIX und ist der wichtigste Rezeptor für den von Willebrand Faktor (vWF), wodurch die Thrombozytenadhäsion an pathologisch veränderte Gefäßwände ermöglicht wird. GPIa ist in die Kollagen-aktivierte Thrombozytenaktivierung involviert. An nicht aktivierten Thrombozyten ist es nur schwach exprimiert [26]. GPIb ist das wichtigste Sialoglycoprotein an der Thrombozytenoberfläche [27–29]. Die Fähigkeit zur Thrombozytenadhäsion ist beim hereditär bedingten Bernard-Soulier-Syndrom aufgrund der fehlenden oder defizienten Expression von GPIb eingeschränkt. Auch der Thrombin-Rezeptor GPV wird bei dieser Erkrankung nicht oder nur vermindert exprimiert. Zu den  $\beta_2$ -Integrinen zählt der GP-Komplex IIb/IIIa, der von großer Bedeutung für die Thrombozytenfunktion ist [30–36]. GPIIb/IIIa fällt unter jene Integrine, die speziell die Aminosäuresequenz Arginin-Glycin-Asparaginsäure (RGD-Sequenz) erkennen [37, 38]. Der GP-Komplex IIb/IIIa fungiert an aktivierten Thrombozyten als Rezeptor für Fibrinogen, Fibronektin, Vitronektin und vWF [31]. Auch Thrombospondin bindet schwach an GP IIb/IIIa, wobei jedoch eine stärkere Bindung an die Rezeptoren VnR und GPIV erfolgt [39, 40]. Die Bildung eines GPIIb/IIIa-Fibrinogen-Thrombospondin-Komplexes führt zu einer irreversiblen Thrombozyten-Aggregation. GPIIb/IIIa liegt als Heterodimer vor und ist Kalzium-abhängig. Die Komplexbildung von  $Ca^{2+}$  führt zu seiner Dissoziation [41]. Neben ihrer Funktion bei der Thrombozyten-Aggregation spielen die erwähnten Liganden des aktivierten GPIIb/IIIa-Komplexes weitere wichtige biologische Rollen. Fibronektin, als adhäsives Glycoprotein vermittelt die Bindung zwischen dem Kollagen des nach Zerstörung des Endothels exponierten Subendotheliums und dem aktivierten GPIIb/IIIa-Komplex. Zusätzlich befindet sich auch noch ein weiterer Fibronektin-Rezeptor an Thrombozyten, der GP-Komplex Ic/IIa. Er ist auch an nicht aktivierten Thrombozyten vorhanden [34]. Die Bedeutung der Interaktion zwischen Vitronektin und dem GP-Komplex IIb/IIIa scheint in der Adhäsion der Thrombozyten und der Thrombusbildung bei Einwirkung starker Scherkräfte zu liegen [5, 42].

Wie bereits erwähnt, können die Liganden von GPIIb/IIIa mit Ausnahme kleiner, synthetisch hergestellter RGD-Peptide aus sterischen Gründen nur an den aktivierten GP-Komplex binden. Als Konsequenz einer Aktivierung von Thrombozyten tritt eine Konformationsänderung der oberflächlichen Domänen des GP-Komplexes auf, so daß auch die größeren Liganden ihre Bindungsstellen erreichen können [34].

Bei einer hereditären Erkrankung, der Glanzmann'schen Thrombasthenie, bei der die Thrombozytenaggregation beeinträchtigt ist, wird GPIIb/IIIa nicht oder nur fehlerhaft exprimiert. In der sog. Cam-Variante der Glanzmann'schen Thrombasthenie, bei der eine defektive RGD-Bindung nachgewiesen wurde, besteht eine Punktmutation an der Position 119 Asp-Tyr des GPIIIa [12].

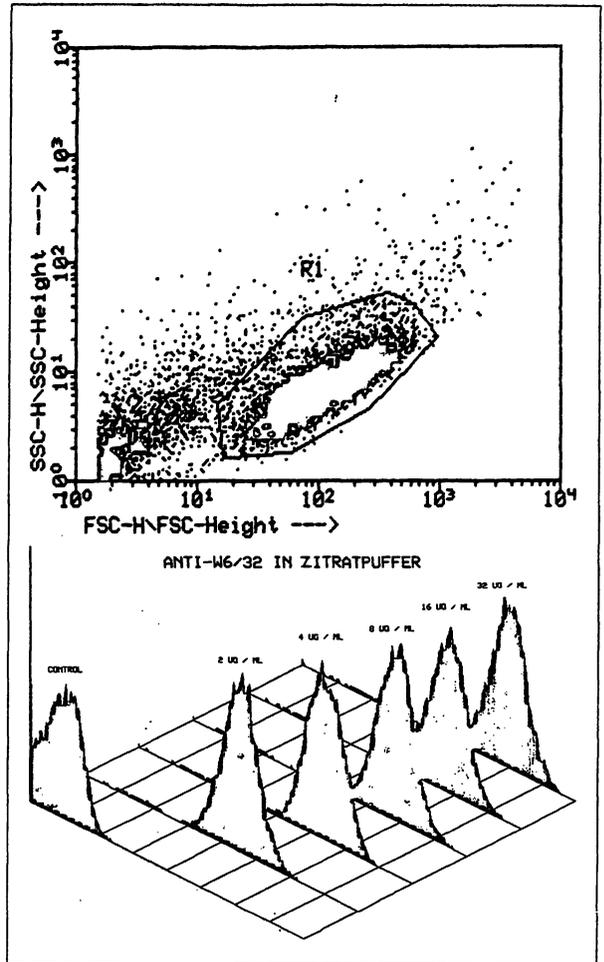


Abb. 2: Antikörper-Saturierungsexperiment mit Thrombozyten unter Verwendung des monoklonalen anti-HLA Klasse I Antikörpers (Klon B9.12.1, Fa. Immunotech, Marseille, Frankreich). In der oberen Bildhälfte ist ein Zweifachhistogramm (FSC×SSC) gemeint, das die Position eines Thrombozytenfensters um die lebenden Zellen verdeutlichen soll. In der unteren Bildhälfte ist in dreidimensionaler Darstellung eine Serie von Messungen mit verschiedenen Antikörperkonzentrationen (Angabe über den Gruppen) zu sehen. Bei dieser Serie wurde eine Antigensättigung bei 10  $\mu$ g/ml erreicht.

Außer dem GPIIb/IIIa bilden noch andere Moleküle der Integrinfamilie GP-Komplexe: GPIa/IIa und GPIc/IIa [siehe Übersicht in 1].

Für die Differentialdiagnostik autoimmuner und alloimmuner Thrombopenien ist es notwendig, die Spezifität der gegen Thrombozyten gerichteten Antikörper herauszufinden. Diese können entweder gegen Epitope auf „thrombozytenspezifischen“ GP [43–45] oder gegen HLA Klasse I Moleküle [46–48] gerichtet sein. Die Antigene auf „thrombozytenspezifischen“ GP wurden in der HPA- (human platelet antigens) Nomenklatur kategorisiert [49]. Die meisten dieser Epitope sind auf dem GPIIb/IIIa-Komplex lokalisiert. Die HPA-Nomenklatur umfaßt folgende Spezifi-

täten: HPA-1a (Zw<sup>a</sup>, PI<sup>A1</sup>) und HPA-1b (Zw<sup>b</sup>, PI<sup>A2</sup>) Epitope auf GPIIb; HPA-2a (Ko<sup>a</sup>) und HPA-2b (Ko<sup>b</sup>, Sib<sup>a</sup>) Epitope auf GPIb; HPA-3a (Bak<sup>a</sup>, Lek<sup>a</sup>) und HPA-3b Bak<sup>b</sup>) Epitope auf GPIIb; HPA-4a (Pen<sup>a</sup>, Yuk<sup>b</sup>) und HPA-4b (Pen<sup>b</sup>, Yuk<sup>a</sup>) Epitope auf GPIIa sowie HPA-5a (Br<sup>a</sup>, Zav<sup>b</sup>) und HPA-5b (Br<sup>b</sup>, Zav<sup>a</sup>, Hc<sup>a</sup>) Epitope auf GPIa.

IgG-Alloantikörper, die plazentagängig und gegen fötale HPA oder HLA Klasse I Antigene gerichtet sind, treten bei der alloimmunen neonatalen Thrombozytopenie auf [17, 43, 44, 50, 51]. In der Hälfte der Fälle lassen sich diese Antikörper schon in der ersten Schwangerschaft nachweisen. Kurz nach der Geburt treten beim Neugeborenen schwere Gerinnungsstörungen und deren Folgeerscheinungen auf. Als besonders gefährlich erweisen sich dabei intracraniale Blutungen.

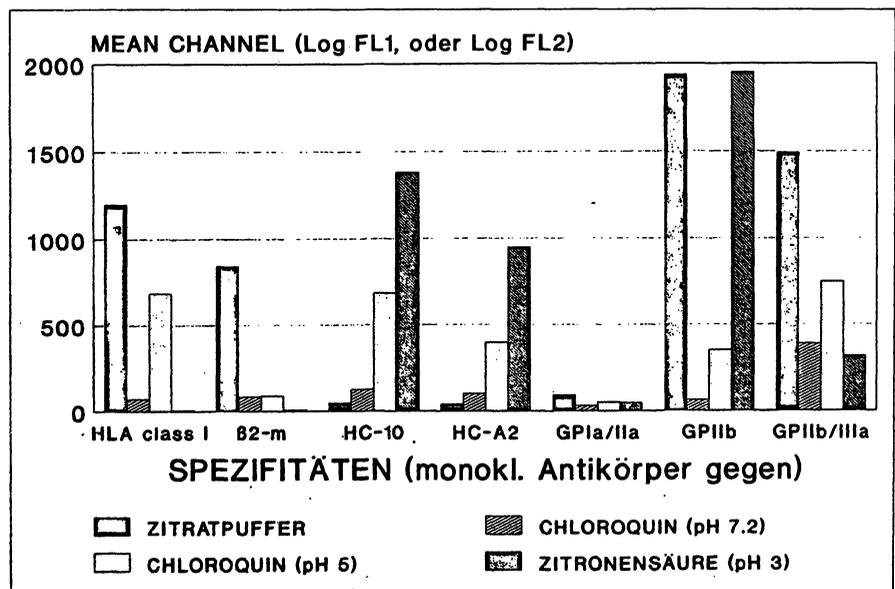
Obwohl bei der Posttransfusions-Purpura häufig anti-HLA Alloantikörper gefunden werden, ist deren pathogenetische Bedeutung im Vergleich zu der der Anti-HPA Antikörper fragwürdig. Die Erkrankung tritt häufig bei Frauen in mittlerem Alter auf, die mit allogenen Thrombozyten während einer Geburt und/oder nach Bluttransfusion in Kontakt gekommen waren. Sie kommt mitunter jedoch auch bei Frauen, die noch keine Kinder geboren haben und bei Männern vor. Schon nach 5–10 Tagen können erste Blutungen auftreten. Als weitere Komplikationen sind eine schwere hämorrhagische Diathese oder intracraniale Blutungen anzuführen [1]. Der Pathomechanismus dieser Erkrankung, bei der nicht nur die transfundierten, sondern auch autologe Thrombozyten zerstört werden können, wurde bisher nicht ausreichend abgeklärt. Es wird angenommen, daß Zw<sup>a</sup>-positive transfundierte Thrombozyten Zw<sup>a</sup> negative Patienten immunisieren und Zw<sup>a</sup> in löslicher Form ins Blutplasma abgeben, das entweder an die autologen, Zw<sup>a</sup>-negativen Thrombozyten adsorbiert wird, so daß diese von den neu gebildeten Antikörpern erkannt werden oder daß sich Immunkomplexe bilden, die eben-

falls an autologe Thrombozyten gebunden werden. Die Bindung der Alloantikörper an Thrombozyten führt zu deren Zerstörung und Phagozytose nach Komplementaktivierung [52, 53]. Als weitere Ursache für die Pathogenese der Posttransfusions-Purpura wurde die vorübergehende Bildung kreuzreagierender Antikörper diskutiert, die mit Oberflächenantigenen autologer Thrombozyten reagieren und ebenfalls nach Komplementaktivierung zur Zerstörung der autologen Thrombozyten führen könnten [54].

Alloantikörper gegen Thrombozyten treten mitunter auch bei Patienten auf, die aufgrund eines Knochenmarkdefekts mehrfach transfundiert worden sind. Aus den gleichen Gründen wie bei der Posttransfusions-Purpura kommt es in der Folge zur Zerstörung der transfundierten Thrombozyten.

**b) HLA Klasse I Antigene** sind Heterodimere, die einerseits aus einer schweren Kette mit einem extrazellulären Anteil, der aus den Domänen  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  und  $\alpha_3$  zusammengesetzt ist, aus einem transmembranen und einem zytoplasmatischen Anteil sowie aus dem extrazellulär nicht-kovalent gebundenem  $\beta_2$ -Mikroglobulin bestehen. Durch eine genetisch bedingte multiple Allelie ist bei den HLA Klasse I Antigenen ein starker Polymorphismus vorhanden. Die verschiedenen Alloantigene sind durch unterschiedliche Aminosäuresubstitutionen im Bereich der Domänen  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  charakterisiert [55]. HLA Klasse I Antigene sind teilweise so wie an kernhaltigen Zellen in der Thrombozytenmembran verankert, teilweise aber nur aufgrund der „Klebrigkeit“ der Thrombozyten-Glycocalix aus dem Blutplasma adsorbiert [56, 57]. In fluoreszenzmikroskopischen und DFZ-Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß eine zweistündige Behandlung von Thrombozyten mit Chloroquin bei pH 5 [58–63] oder eine zehnminütige Behandlung mit Zitronensäure bei pH 3 [64, 65] zu einer Ablösung der adsorbierten HLA Antigene, zu einer Abspaltung des  $\beta_2$ -Mikroglobulins und vermutlich auch zur teilweisen Frag-

Abb. 3: Vergleich der Sättigungspunkte für die Bindung von Antikörpern gegen HLA Klasse I,  $\beta_2$ -Mikroglobulin, gegen die native schwere Kette der HLA Klasse I Antigene und gegen „thrombozytenspezifische“ Glykoproteine nach Inkubation in Zitratpuffer bei pH 7,2, sowie nach Chloroquin-Behandlung bei pH 7,2, pH 5 oder nach Behandlung mit Zitronensäure bei pH 3. Als Meßeinheit gilt die mittlere Fluoreszenzintensität.



mentierung der schweren Kette führt. Da die meisten polyklonalen Antikörper (auch die Allo- und Autoantikörper gegen thrombozytäre HLA Antigene) nur das gesamte Heterodimer erkennen [66], führt die Abspaltung des  $\beta_2$ -Mikroglobulins zum Verlust der HLA-Antigenität. In eigenen Untersuchungen konnte unter Verwendung spezieller monoklonaler Antikörper, die gegen die schwere Kette des HLA Klasse I Moleküls gerichtet sind (HC-10 [67], und HC-A2 [68]), und nicht mit dem gesamten Heterodimer reagieren, gezeigt werden, daß Chloroquin- oder Zitronensäurebehandlung zwar die HLA-Klasse I Antigenität für herkömmliche monoklonale Antikörper (wie z. B. des Klon W6/32) reduziert oder gänzlich entfernt, jedoch die membranständigen schweren Ketten für diese Antikörper zugänglich macht (Abb. 3). Da anzunehmen ist, daß bei Chloroquin- oder Zitronensäurebehandlung adsorbierte HLA Klasse I Antigene von der Thrombozytenmembran entfernt werden, ist die Freilegung der schweren Kette dieser Moleküle ein Zeichen dafür, daß membranständige HLA Klasse I Moleküle in mit der DFZ bestimmbarer Menge auf Thrombozyten vorhanden sind.

Wie erwähnt, ermöglicht die Chloroquin- oder Zitronensäurebehandlung eine Unterscheidung zwischen Antikörpern gegen „thrombozytenspezifische“ Antigene und Antikörpern gegen HLA Klasse I Antigene. Ursprünglich wurde zu diesem Zweck ein fluoreszenzmikroskopischer oder ein ELISA Nachweis an Thrombozyten eingeführt [58–61]. Bei dieser Methode werden Thrombozyten aus EDTA-Blut isoliert und 2 Stunden mit 200 mg/ml Chloroquindiphosphat in EDTA/PBS bei pH 5 behandelt. Nach Waschen mit EDTA/PBS werden sie mit Patientenserum, die Allo- oder Autoantikörper gegen Thrombozyten beinhalten, inkubiert, erneut gewaschen, mit einem FITC- bzw. Enzym-konjugierten Antikörper inkubiert und im Fluoreszenzmikroskop bzw. nach Reaktion in Substratlösung im ELISA-Reader untersucht. Als Kontrolle werden Thrombozyten, die nicht mit Chloroquin vorbehandelt worden waren, eingesetzt. Falls die antithrombozytären Antikörper im Blut von thrombopenischen Patienten gegen HLA-Antigene gerichtet sind, reagieren sie im Gegensatz zu Anti-HPA Antikörpern nur mit unbehandelten, nicht aber mit Chloroquin-behandelten Thrombozyten. Bei der Immunfluoreszenzmethode wird nach der Chloroquinbehandlung eine 2minütige Fixierung der Thrombozyten mit 1% Formaldehyd vorgenommen.

Die DFZ ist jedoch durch ihre Quantifizierbarkeit diesen Methoden überlegen. Mit DFZ können lebende Zellen ohne einen aldehydbedingten Verlust an Antigenität untersucht werden. Bei den eigenen Untersuchungen konnten die Ergebnisse früherer Arbeiten [64, 65] bestätigt werden, wonach die Zitronensäurebehandlung bei pH 3 der Chloroquinbehandlung bei pH 5 überlegen ist, da sie gegenüber der letzteren Methode anstatt 2 Stunden nur 10 Minuten in Anspruch nimmt. Dadurch werden die Thrombozyten lebensfähiger erhalten. Bevor bei der DFZ-Messung tote Thrombozyten gänzlich aus dem Thrombozytenfenster des Streulicht-Doppelhistogramms verschwinden, stören sie diese durch hohe Eigenfluoreszenz. Außerdem führt die Chloroquinbehandlung im Gegensatz zur Zitronensäurebehandlung zur Aktivierung eines Teils der Thrombozyten und zu deren Aggregation.

### DFZ-Untersuchungen der Thrombozytenaktivierung

Wie aus dem vorher Beschriebenen verständlich, ist die DFZ außer für die Unterscheidung zwischen HLA- und „thrombozytenspezifischen“ Antikörpern vor allem für die Diagnose der erwähnten hereditären Defizienzen in der Expression thrombozytenspezifischer GP von Vorteil. Die DFZ eignet sich aber besonders für die Durchführung von Experimenten, bei der die Interaktion der einzelnen Membranrezeptoren an Thrombozyten mit ihren Liganden studiert werden sollen. So kann die Bindung von Liganden und deren Inhibition durch spezifische Antikörper untersucht werden. Durch quantitative DFZ kann die Aktivierung von Thrombozyten aufgrund der Bindung der Liganden Fibrinogen und vWF sowie durch die verstärkte Bindung von Fibronektin und Vitronektin dargestellt werden. Da die thrombozytären Oberflächenrezeptoren mit dem Zytoskeletton in Verbindung stehen, führt die Bindung der erwähnten Liganden zu einer Signaltransduktion [69–72], die mit einem verstärkten Calciuminflux verbunden ist. Dieses Phänomen kann mit der DFZ unter Verwendung spezieller Fluoreszenzproben, die von den Thrombozyten aufgenommen werden (Fura-2, Quin-2 und Indo-1), nachgewiesen werden. Indo-1 ist nach Möglichkeit den beiden anderen Proben vorzuziehen, da es zu einer 30fach stärkeren Fluoreszenz angeregt werden kann, eine schwächere Affinität zu  $Ca^{2+}$  und eine bessere Selektivität gegenüber  $Mg^{2+}$ -Ionen und Schwermetallen hat [73]. Bei einer UV-Laserlichtanregung bei 355 nm resultiert unter Verwendung einer geeigneten Filterkombination der Anstieg des intrazellulären  $Ca^{2+}$  in einer Verschiebung der Emission von 405 zu 485 nm. Als Maß für das intrazelluläre  $Ca^{2+}$  kann der Quotient der Fluoreszenzintensitäten 405/485 nm verwendet werden [74]. Steht jedoch nur ein Argon-Laser mit einer Anregungswellenlänge von 488 nm zur Verfügung, können auch brauchbare Ergebnisse mit der Probe Fluo-3 erzielt werden [75]. Der Anstieg intrazellulärer  $Ca^{2+}$ -Ionen wird bei dieser Methode anhand der Fluoreszenzintensitätszunahme bei 525 nm bestimmt. Aufgrund einer Signaltransduktion verändern sich das intrazelluläre  $Ca^{2+}$  und der pH-Wert innerhalb von 30 Sekunden [74].

Eine weitere Möglichkeit der Bestimmung der Thrombozytenaktivierung besteht im Nachweis der Expression des GMP140 (CD62), das in „ruhenden“ Thrombozyten nur intrazellulär in den  $\alpha$ -Granula vorhanden ist. Bei der Thrombozytenaktivierung kommt es zu einer Sekretion und Membranassoziation des GMP140. Membrangebundenes GMP140 kann infolgedessen durch entsprechende monoklonale Antikörper (z. B. SZ51 [76] und fluorochromierte 2.-Stufe-Antikörper nachgewiesen werden. Diese Methode wurde bei Untersuchungen der Dysfunktion von Thrombozyten, die durch Antibiotika verursacht worden war [77], oder bei der Feststellung des Aktivierungsgrades von Apherese-Thrombozytenkonzentraten [78, 79] angewandt. Ebenso konnte mit der DFZ anhand der verstärkten Expression von GPIb und GPIIb/IIIa an der Oberfläche der Thrombozyten von Diabetikern gezeigt werden, daß im Blut diesen Patienten vermehrt große und aktivierte Thrombozyten zirkulieren [80].

Diese Übersicht sollte zeigen, daß die Behandlung von Fragestellungen im Bereich der Thrombozytenfunktion mit Hilfe der DFZ bei geeigneter präparativer Vorberei-

tung und Kalibration des DFZ schnelle und reproduzierbare Ergebnisse liefert. Die Verwendung dieser Methodik ist sowohl für die Grundlagenforschung als auch für die klinische Diagnostik und die Patientenüberwachung hinsichtlich der Thrombozytenfunktionen bei bestimmten Erkrankungen oder bei immunmodulierender Therapie von Nutzen.

## Literatur:

1. Taaning, E. (1992) Platelet immunology. ELISA for detection of platelet antibodies platelet-specific antigens and platelet glycoproteins. Thesis. Laegeforeningens Forlag, København.
2. Blache, D. (1992) Structure et fonctions des plaquettes sanguines. Arch. Int. Physiol. Biochim. Biophys. 100, A17-A24.
3. Michelson, A. D. (1987) Flow cytometric analysis of platelet surface glycoproteins: phenotypically distinct subpopulations of platelets in children with chronic myeloid leukemia. J. Lab. Clin. Med. 110, 346-354.
4. Ordinas, A., Diaz-Ricart, M., Bastida, E., Escobar, G., Castillo, R., Tandon, N., Jamieson, G. A. (1992) The role of subendothelial laminin and platelet laminin receptors in haemostasis. Nouv. Rev. Fr. Hematol. 34, 61-65.
5. Polanowska-Grabowska, R., Gear, A. R. (1992) High-speed platelet adhesion under conditions of rapid flow. Proc. Natl. Acad. Sci. 89, 5754-5758.
6. Ballegeer, V. C., Spitz, B., De Baene, L. A., Van Assche, A. F., Hidajat, M., Criel, A. M. (1992) Platelet activation and vascular damage in gestational hypertension. Am. J. Obstet. Gynecol. 166, 629-633.
7. Venturini, C. M., Weston, L. K., Kaplan, J. E. (1992) Platelet cGMP, but not cAMP, inhibits thrombin-induced platelet adhesion to pulmonary vascular endothelium. Am. J. Physiol. 263, H606-H612.
8. Kobayashi, H., Kabuto, M., Ide, H., Hosotani, K., Kubota, T. (1992) An artificial blood vessel with an endothelial-cell monolayer. J. Neurosurg. 77, 397-402.
9. Venturini, C. M., Kaplan, J. E. (1992) Thrombin induces platelet adhesion to endothelial cells. Semin. Thromb. Hemost. 18, 275-283.
10. Dux, R., Kinder-Röhrborn, A., Lennartz, K., Rajewsky, M. F. (1991) Calibration of fluorescence intensities to quantify antibody binding surface determinants of cell subpopulations by flow cytometry. Cytometry 12, 422-428.
11. Grottemeyer, K.-H. (1991) The platelet-reactivity-test—a useful „by-product“ of the blood-sampling procedure? Thromb. Res. 67, 423-431.
12. Lanza, F., Stierlé, A., Fournier, D., Morales, M., André, G., Nurden, A. T., Cazenave, J.-P. (1992) A new variant of Glanzmann's thrombasthenia (Strasbourg II). J. Clin. Invest. 89, 1995-2004.
13. Marti, G. E., Magruder, L., Schutte, W. E., Gralnick, H. R. (1988) Flow cytometric analysis of platelet surface antigens. Cytometry 9, 448-455.
14. Lazarchick, J., Das, P. C., Jones, T. J., Russell, R. J., Hall, S. A. (1988) Utility of frozen platelets for a platelet antibody assay using flow cytometric analysis. Diagn. Clin. Immunol. 5, 338-343.
15. Lazarchick, J., Jones, T. J., Russell, R. J., Hall, S. A. (1988) Platelet antibody detection using frozen pooled human lymphocyte antigen-typed platelets as target cells. Diagn. Clin. Immunol. 5, 377-380.
16. Escobar, G., Diaz-Ricart, M., Garrido, M., Reverter, J. C., Villamor, N., Sanz, C., Maragall, S., Castillo, R., Ordinas, A., Nurden, A. T. (1992) A variant of Glanzmann's thrombasthenia which fails to express a GPIIb-IIIa related epitope that is recognized by a specific monoclonal antibody (c17). Br. J. Haematol. 81, 545-551.
17. Harrington, W. J., Sprague, C. C., Minnich, V. et al. (1953) Immunologic mechanism in idiopathic and neonatal thrombocytopenic purpura. Ann. Intern. Med. 38, 433-469.
18. Stefanini, M., Plitman, G. I., Dameshek, W. et al. (1953) Studies on platelets. XI. Antigenicity of platelets and evidence of platelet groups and types in man. J. Clin. Lab. Med. 42, 723-738.
19. Van Loghem, J. J., Formeijer, H., Van der Hart, M. (1959) Serological and genetical studies on a platelet antigen (Zw). Vox Sang. 4, 161-169.
20. Nugent, D. J. (1992) Alloimmunization to platelet antigens. Semin. Hematol. 29 (Suppl. 2), 83-88.
21. Harrington, W. J., Minnich, V., Hollingsworth, J. W. et al. (1951) Demonstration of a thrombocytopenic factor in the blood of patients with thrombocytopenic purpura. J. Lab. Clin. Med. 38, 1-10.
22. Kiefel, V., Santoso, S., Mueller-Eckhardt, C. (1992) Serological, biochemical, and molecular aspects of platelet autoantigens. Semin. Hematol. 29, 26-33.
23. Boshkov, L. K., Kelton, J. G., Halloran, P. F. (1992) HLA-DR expression by platelets in acute idiopathic thrombocytopenic purpura. Br. J. Haematol. 81, 552-557.
24. Long, M. W. (1992) Blood cell cytoadhesion molecules. Exp. Hematol. 20, 288-301.
25. Springer, T. A. (1990) Adhesion receptors of the immune system. Nature 346, 425-434.
26. Biens, D., Clemetson, K. J. (1989) Human platelet glycoprotein Ia. J. Biol. Chem. 264, 507-514.
27. De Marco, L., Mazzucato, M., Masotti, A., Fenton II, J. W., Ruggeri, Z. M. (1991) Function of glycoprotein Iba in platelet activation induced by  $\alpha$ -thrombin. J. Biol. Chem. 266, 23776-23783.
28. Jandrot-Perrus, M., Huisse, M.-G., Ternisien, C., Bezaud, A., Guillin, M.-C. (1992) Thrombin binding to platelet membrane glycoprotein Ib. Semin. Thromb. Hemost. 18, 261-266.
29. Gralnick, H. R., Williams, S., McKeown, L., Kramer, W., Krutzsch, H., Gorecki, M., Pinet, A., Garfinkel, L. I. (1992) A monomeric von Willebrand factor fragment, Leu-504-Ser-728, inhibits von Willebrand factor interaction with glycoprotein Ib-IX. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 7880-7884.
30. Phillips, D. R., Charo, I. F., Parise, L. V., Fitzgerald, L. A. (1988) The platelet membrane glycoprotein IIb-IIIa complex. Blood 71, 831-843.
31. Du, X., Plow, E. F., Frelinger III, A. L., O'Toole, T. E., Loftus, J. C., Ginsberg, M. H. (1991) Ligands "activate" integrin  $\alpha$ IIb  $\beta$ 3 (platelet GPIIb-IIIa). Cell 65, 409-416.
32. Plow, E. F., D'Souza, S. E., Ginsberg, M. H. (1992) Consequences of the interaction of platelet membrane glycoprotein GPIIb-IIIa (IIb  $\beta$ 3) and its ligands. J. Lab. Clin. Med. 120, 198-204.
33. Plow, E. F., D'Souza, S. E., Ginsberg, M. H. (1992) Ligand binding to GPIIb-IIIa: A status report. Semin. Thromb. Hemost. 18, 324-332.
34. Perutelli, P., Mori, P. G. (1992) The human platelet membrane glycoprotein IIb/IIIa complex: a multi functional adhesion receptor. Haematologica 77, 162-168.
35. Phillips, D. R., Charo, I. F., Scarborough, R. M. (1991) GPIIb-IIIa: The responsive integrin. Cell 65, 359-362.
36. Smyth, S. S., Hillery, C. A., Parise, L. V. (1992) Fibrinogen binding to purified platelet glycoprotein IIb-IIIa (integrin  $\alpha$ IIb  $\beta$ 3) is modulated by lipids. J. Biol. Chem. 267, 15568-15577.
37. Taylor, D. B., Gartner, T. K. (1992) A peptide corresponding to GPIIb  $\beta$ 3 300-312, a presumptive fibrinogen  $\alpha$ -chain binding site on the platelet integrin GPIIb/IIIa, inhibits the adhesion of platelets to at least four adhesive ligands. J. Biol. Chem. 267, 11729-11733.
38. Tomiyama, Y., Tsubakio, T., Piotrowski, R. S., Kurata, Y., Loftus, J. C., Kunicki, T. (1992) The Arg-Gly-Asp (RGD) recognition site of platelet glycoprotein IIb-IIIa on nonactivated platelets is accessible to high-affinity macromolecules. Blood 79, 2303-2312.
39. Frazier, W. A. (1987) Thrombospondin: A modular adhesive glycoprotein of platelets and nucleated cells. J. Cell Biol. 105, 625-632.
40. Vuillard, L., Clezardin, P., Miller, A. (1991) Models of human platelet thrombospondin in solution. A dynamic light-scattering study. Biochem. J. 275, 263-266.
41. Lanza, F., Stierlé, A., Gachet, C., Cazenave, J.-P. (1992) Differential effects of extra- and intracellular calcium chelation on human platelet function and glycoprotein IIb-IIIa complex stability. Nouv. Rev. Fr. Hematol. 34, 123-131.
42. Weiss, H. J., Hawiger, J., Ruggeri, Z. M., Turitto, V. T., Thiagarajan, P., Hoffmann, T. (1989) Fibrinogen-independent platelet adhesion and thrombus formation on subendothelium mediated by glycoprotein IIb-IIIa complex at high shear rate. J. Clin. Invest. 83, 288-297.
43. L'Abbé, D., Tremblay, L., Filion, M., Busque, L., Goldman, M., Décarry, F., Chartrand, P. (1992) Alloimmunization to platelet antigen HPA-1a (PI<sup>a</sup>) is strongly associated with both HLA-DRB3\*0101 and HLA-DQB1\*0201. Hum. Immunol. 34, 107-114.
44. Kunicki, T. J., Newman, P. J. (1986) The biochemistry of platelet-specific alloantigens. Curr. Stud. Hematol. Blood Transf. 52, 18-32.
45. Collins, J., Aster, R. H. (1987) Use of immobilized platelet membrane glycoproteins for the detection of platelet-specific alloantibodies in solid-phase ELISA. Vox Sang. 53, 157-161.
46. Muylle, L., Van Bockstaele, D., De Smet, D., Peetermans, M. E. (1988) Assessment of anti-HLA antibodies in sera being tested for platelet reactivity by a platelet lymphocyte immunofluorescence test (PLIFT). J. Immunol. Meth. 114, 187-190.
47. Moroff, G., Garratty, G., Heal, J. M., MacPherson, B. R., Stroncek, D., Huang, S. T., Ho, W., Petz, L. D., Leach, M. F., Lennon, S. S., Rowe, J. M., Saleh, M. N., Arndt, P., Foley, K., Masel, D., Postoway, N. (1992) Selection of platelets for refractory patients by HLA matching and prospective cross-matching. Transfusion 32, 633-640.
48. Chow, M. P., Sun, K. J., Yung, C. H., Tzeng, J. L., Lee, T. D. (1992) Neonatal alloimmune thrombocytopenia due to HLA-A2 antibody. Acta Haematol. 87, 153-155.
49. Von dem Borne, A. E. G., Décarry, F. (1990) ICSH/ISBT working party on platelet serology. Nomenclature of platelet-specific antigens. Vox Sang. 58, 176.
50. Reznikoff-Etievant, M. F., Lobet, R., Julien, F. (1983) Thrombopenies néonatales par allo-immunisation antiplaquettaire. Presse méd. 12, 575.
51. Taaning, E., Antonsen, H., Petersen, S., Sveigaard, A., Thomsen, M. (1983) HLA antigens and maternal antibodies in allo-immune neonatal thrombocytopenia. Tissue Antigens 21, 351-359.
52. Shulman, N. R., Aster, R. H., Leitner, A., et al. (1961) Immunoreactions involving platelets. V. Post-transfusion purpura due to a complement-fixing antibody against a genetically controlled platelet antigen. A proposed mechanism for thrombocytopenia and its relevance in "autoimmunity". J. Clin. Invest. 40, 1597-1620.
53. Engelfriet, C. P. (1986) Platelet serology: Prospects and problems. In: Platelet serology (Décarry, F., Rock, G. A., Hrsq). Curr. Stud. Hematol. Blood Transf., Karger, Basel. Vol. 52, 1-5.
54. Morrison, F. S., Mollison, P. L. (1966) Post-transfusion purpura. N. Eng. J. Med. 275, 243-248.
55. Mayr, W. R. (1988) Das HLA-System. In: Transfusionsmedizin (Mueller-Eckhardt, C., Hrsq.). Springer, Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo. pp. 173-193.
56. Santoso, S., Mueller-Eckhardt, G., Santoso, S., Kiefel, V., Mueller-Eckhardt, C. (1986) HLA antigens on platelet membranes. Vox Sang. 51, 327-333.

57. Kao, K. J., Cook, D. J., Scornik, J. C. (1986) Quantitative analysis of platelet surface HLA by W6/32 anti-HLA monoclonal antibody. *Blood* 68, 627-632.
58. Edwards, J. M., Moulds, J. J., Judd, W. J. (1982) Chloroquine dissociation of antigen-antibody complexes. A new technique for typing red blood cells with a positive direct antiglobulin test. *Transfusion* 22, 59-61.
59. Borne, A. E. G. Kr. von dem, Verheugt, F. W. A., Oosterhof, F., Riesz, L. E. von, Brutel de la Rivière, A., Engelfriet, C. P. (1978) A simple fluorescence test for the detection of platelet antibodies. *Br. J. Haemat.* 39, 195-207.
60. Blumberg, N., Masel, D., Mayer, T., Horan, P., Heal, J. (1984) Removal of HLA-A,B antigens from platelets. *Blood* 63, 448-450.
61. Nordhagen, R., Flaathen, S. T. (1985) Chloroquine removal of HLA antigens from platelets for the platelet immunofluorescence test. *Vox Sang.* 48, 156-159.
62. Kao, K. J. (1988) Selective elution of HLA antigens and  $\beta_2$ -microglobulin from human platelets by chloroquine diphosphate. *Transfusion* 28, 14-17.
63. Masel, D. S., Blumberg, N., Heal, J. M. (1988) A chloroquine elution technique for platelet serology. *Transfusion* 28, 132-136.
64. Kurata, Y., Oshida, M., Take, H., Furubayashi, T., Nakao, H., Tomiyama, Y., Kanayama, Y., Nagao, N., Okubo, Y., Yonezawa, T., Tarui, S. (1989) New approach to eliminate HLA class I antigens from platelet surface without cell damage: acid treatment at pH 3.0. *Vox Sang.* 57, 199-204.
65. Kurata, Y., Oshida, M., Take, H., Furubayashi, T., Mizutani, H., Tomiyama, Y., Yonezawa, T., Tarui, S. (1990) Acid treatment of platelets as a simple procedure for distinguishing platelet-specific antibodies from anti-HLA antibodies: Comparison with chloroquine treatment. *Vox Sang.* 59, 106-111.
66. Kievits, F., Ivanyi, P. (1987) Monomorphic anti-HLA monoclonal antibody (W6/32) recognizes polymorphic H-2 heavy-chain determinants exposed by association with bovine or human but not murine  $\beta_2$ -microglobulin. *Human Immunol.* 20, 115-126.
67. Stam, N. J., Spits, H., Ploegh, H. L. (1986) Monoclonal antibodies raised against denatured HLA-B locus heavy chains permit biochemical characterization of certain HLA-C locus products. *J. Immunol.* 137, 2299-2306.
68. Neeffjes, J. J., Doxiadis, I., Stam, N. J., Beckers, C. J., Ploegh, H. L. (1986) An analysis of class I antigens of man and other species by one-dimensional IEF and immunoblotting. *Immunogenetics* 23, 164-171.
69. Kroll, M. H., Schafer, A. I. (1989) Biochemical mechanisms of platelet activation. *Blood* 74, 1181-1195.
70. Parise, L. V., Criss, A. B., Nannizzi, L., Wardell, M. R. (1990) Glycoprotein IIIa is phosphorylated in intact human platelets. *Blood* 75, 2363-2368.
71. Findik, D., Reuter, C., Presek, P. (1990) Platelet membrane glycoproteins IIb and IIIa are substrates of purified pp60<sup>csrc</sup> protein tyrosine kinase. *FEBS Lett.* 262, 1-4.
72. Frachet, P., Deperray, A., Delachanal, E., Marguerie, G. (1992) Role of the transmembrane and cytoplasmic domains in the assembly and surface exposure of the platelet integrin GPIIb/IIIa. *Biochem.* 31, 2408-2415.
73. Gryniewicz, G., Poenie, M., Tsien, R. Y. (1985) A new generation of CA<sup>2+</sup> indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.* 260, 3440-3450.
74. Davies, T. A., Drotts, D., Weil, G. J., Simons, E. R. (1988) Flow cytometric measurements of cytoplasmic calcium changes in human platelets. *Cytometry* 9, 138-142.
75. Eisner, J., Kaever, V., Emmendorffer, A., Breidenbach, T., Lohmann-Matthes, M.-L., Roesler, J. (1992) Heterogeneity in the mobilization of cytoplasmic calcium by human polymorphonuclear leukocytes in response to fMLP, C5a and IL-8/NAP-1. *J. Leukoc. Biol.* 51, 77-83.
76. Wu, G., Li, F., Li, P., Li, J., Ruan, C. (1992) Detection of activated platelets using activation-dependent monoclonal antibody (SZ-51) in clinical disorders. *Nouv. Rev. Fr. Hematol.* 34, 31-35.
77. Ingalls, C. S., Freimer, E. H. (1991) Detection of antibiotic-induced platelet dysfunction in whole blood using flow cytometry. *J. Antimicrob. Chemother.* 29, 313-321.
78. Triulzi, D. J., Kickler, T. S., Braine, H. G. (1992) Detection and significance of alpha granule membrane protein 140 expression on platelets collected by apheresis. *Transfusion* 32, 529-533.
79. Wun, T., Paglieroni, T., Sazama, K., Holland, P. (1992) Detection of plasmapheresis-induced platelet activation using monoclonal antibodies. *Transfusion* 32, 534-540.
80. Tschoepe, D., Roesen, P., Esser, J., Schwippert, B., Nieuwenhuis, H. K., Kehrel, B., Gries, F. A. (1991) Large platelets circulate in an activated state in diabetes mellitus. *Semin. Thromb. Hemost.* 17, 433-438.

## Anschrift der Autoren:

Dr. Josef Neumüller

Dr. Makyieh Tohidast-Akrad

Ludwig Boltzmann Institut für Rheumatologie und Balneologie  
Kurbadstraße 10, Postfach 78  
A-1107 Wien-Oberlaa

Prim. Univ. Prof. Dr. Michael Fischer

Zentrallabor des Krankenhauses der Stadt Wien-Lainz  
Wolkersbergenstraße 1  
A-1130 Wien

Univ. Prof. Dr. Wolfgang R. Mayr

Klinische Abteilung für Blutgruppenserologie  
Allgemeines Krankenhaus der Stadt Wien-Universitätskliniken  
Währinger Gürtel 18-20  
A-1090 Wien

# Glykosylierungsprofil der Akute-Phase-Proteine (APP) als differentialdiagnostischer Marker bei rheumatischen Erkrankungen

Glycosylation profile of acute-phase proteins as a marker in the differential diagnosis of rheumatic diseases

W. Müller, P. Hrycaj

Hochrhein-Institut für Rheumaforschung und Rheumaprävention, Bad Säckingen (D)/Rheinfelden (CH)

## Zusammenfassung:

*In den letzten Jahren wurde den Veränderungen der Glykosylierung der Akute-Phase-Proteine bei rheumatischen Erkrankungen eine zunehmende Beachtung geschenkt. Die Bestimmung der sogenannten Mikroheterogenität dieser Proteine mittels der Affinitäts-Elektrophorese mit dem Lektin Concanavalin A (ConA) ermöglicht aufgrund der unterschiedlichen Reaktivität der genannten Proteine mit dieser Substanz verschiedene Entzündungsformen zu unterscheiden. Das entgegengesetzte Verhalten dieser Reaktivität bei akuten und chronischen Entzündungen läßt diese Zustände mit guter Sensitivität differenzieren. Die Bestimmung des Glykosylierungsprofils der Akute-Phase-Proteine erweitert die differentialdiagnostische Möglichkeiten bei entzündlich-rheumatischen Erkrankungen.*

## Schlüsselwörter:

*Akute-Phase-Proteine – Mikroheterogenität – Differentialdiagnose*

## Summary:

*In the last years, there has been increasing interest in the glycosylation changes of acute-phase proteins in patients with various inflammatory conditions. The determination of the so-called microheterogeneity of these proteins by affinity immunoelectrophoresis with the lectin concanavalin A makes it possible to differentiate between acute inflammation, characterized by an increase in reactivity of acute-phase glycoproteins with concanavalin A, and chronic inflammatory states, in which a decreased reactivity of acute-phase glycoproteins has been observed. Differences in the glycosylation pattern enable the detection of intercurrent bacterial infections in patients with rheumatoid arthritis as well as in those with systemic lupus erythematosus. Moreover, it is also possible to differentiate between some rheumatic diseases (e.g., polymyalgia rheumatica versus polymyositis/dermatomyositis) which have similar clinical appearance, but differ in the pattern of glycosylation of acute-phase proteins.*

## Keywords:

*acute-phase proteins – microheterogeneity – rheumatic diseases – differential diagnosis*

## Einleitung

Gewebsschädigungen unterschiedlicher Genese, wie bakterielle und entzündlich-rheumatische Prozesse sowie Gewebnekrosen führen innerhalb weniger Stunden zu humoralen, zellulären und metabolischen Reaktionen, die als Akute-Phase-Reaktionen (APR) bezeichnet werden (Tab. 1). Eine besondere Rolle ist hierbei den Veränderungen der Serumkonzentration und Struktur der sogenannten Akute-Phase-Proteine zuzumessen. Zur Gruppe der sog. „positiven“ Akute-Phase-Proteine gehören die

Plasmaeiweißkörper, deren Konzentration auf einen adäquaten Reiz um mindestens 25% ansteigt. Als „negative“ Akute-Phase-Proteine werden von manchen Autoren diejenige Proteine bezeichnet, deren Plasmakonzentration als Folge der Gewebsschädigung absinkt (1).

Je nach Höhe des gemessenen Anstieges bzw. Abfalls können vier Gruppen von Akute-Phase-Proteinen unterschieden werden (Tab. 2) (2):

Die erste Gruppe beinhaltet Proteine, deren Konzentration sich bei einem adäquaten Stimulus um etwa 50% erhöht.

# Übersicht

Tabelle 1: Akute-Phase-Reaktionen

1. Lokale Reaktionen  
Ausschüttung von Mediatoren (lysosomale Enzyme, Histamin, Serotonin, Prostaglandine), Vasodilatation, Chemotaxis, Produktion von Sauerstoffradikalen
2. Systemische Reaktionen  
Schmerz, Fieber, allgemeine Stoffwechselreaktionen, Veränderungen im Serumspiegel von Eisen, Kupfer, Zink, Veränderungen im Serumspiegel der Proteine

Zu dieser Gruppe gehören Coeruloplasmin und die Komplementkomponenten C3 und C4. Die zweite Gruppe umfaßt Akute-Phase-Proteine, deren Konzentration nach einem entsprechenden Reiz um das 2- bis 4fache ansteigt, wie dies beim  $\alpha_1$ -sauren Glykoprotein (AGP), dem  $\alpha_1$ -Proteinaseinhibitor (PI), dem  $\alpha_1$ -Antichymotrypsin (ACT), dem Haptoglobin (Hp) und dem Fibrinogen der Fall ist.

In die dritte Gruppe werden die Akute-Phase-Proteine eingeordnet, deren Konzentration im Rahmen einer Gewebeschädigung über das 1000fache ansteigen kann, wie man dies beim C-reaktiven Protein (CRP) und dem Serumamyloid A (SAA) beobachtet. Die vierte Gruppe beinhaltet „negative“ Akute-Phase-Proteine, wie Albumin und Transferrin.

Die Mechanismen, die die Biosynthese der Akute-Phase-Proteine steuern, sind bisher nur teilweise bekannt. Die Synthese dieser Proteine erfolgt vor allem in der Leber

und es wird angenommen, daß Zytokine, die im entzündeten Gewebe produziert und freigesetzt werden, eine entscheidende Rolle in diesem Prozeß spielen (3, 4). Wichtigstes dieser Zytokine scheint nach in vitro- wie auch in vivo-Befunden Interleukin-6 (IL-6) zu sein (5), doch sind wahrscheinlich auch Interleukin-1 (IL-1), Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) und Interferon  $\gamma$  (INF- $\gamma$ ) von Bedeutung. Zytokine steuern aber offensichtlich nicht nur die Synthese, sondern auch die Glykosylierung der Akute-Phase-Proteine (6, 7). Der stimulierende Einfluß der Zytokine kann sich also einerseits in den Veränderungen des Serumspiegels der Akute-Phase-Proteine, andererseits aber auch in den Veränderungen des Glykosylierungsmusters der Akute-Phase-Glykoproteine widerspiegeln.

## Akute-Phase-Proteine als Glykoproteine

Die quantitativen Veränderungen der Akute-Phase-Proteine sind sehr gut bekannt und werden alltäglich in der Klinik diagnostisch genutzt. Die Bestimmung des C-reaktiven Proteins kann hierbei als bestes Beispiel gelten. Demgegenüber ist die Bedeutung der Veränderung des Glykosylierungsmusters der Akute-Phase-Glykoproteine erst in den letzten Jahren näher untersucht worden.

Bekanntlich zirkulieren alle Akute-Phase-Proteine mit Ausnahme des C-reaktiven Proteins, und des Serumamyloid A in Form von Glykoproteinen im Serum. Als typisches Beispiel sei das  $\alpha_1$ -saure Glykoprotein erwähnt, ein einfach strukturiertes Protein, an das kovalent fünf Heteroglykoseitenketten gebunden sind (8). Sein Molekularge-

Tabelle 2: Klassifikation der menschlichen Akute-Phase-Proteine

	Elektrophoretische Mobilität	Normale Plasmakonzentration (g/l)
<b>Positive APP</b>		
<b>Gruppe I (Anstieg um 50%)</b>		
Coeruloplasmin	$\alpha_2$	0,15–0,60
C3-Komplementkomponent	$\beta$	0,80–1,70
<b>Gruppe II (Anstieg 2–4x)</b>		
$\alpha_1$ -saures Glykoprotein	$\alpha_1$	0,55–1,40
$\alpha_1$ -Antitrypsin	$\alpha_1$	2,00–4,00
$\alpha_1$ -Antichymotrypsin	$\alpha_1$	0,30–0,60
Haptoglobin	$\alpha_2$	0,40–1,80
Fibrinogen	$\beta$	2,00–4,50
<b>Gruppe III (Anstieg &gt; 1000x)</b>		
C-reaktives Protein	$\beta, \gamma$	< 0,010
Serumamyloid A	Alb	< 0,005
<b>Negative APP</b>		
Albumin	Alb	35,0–55,0
Transferrin	$\beta$	2,0–4,0

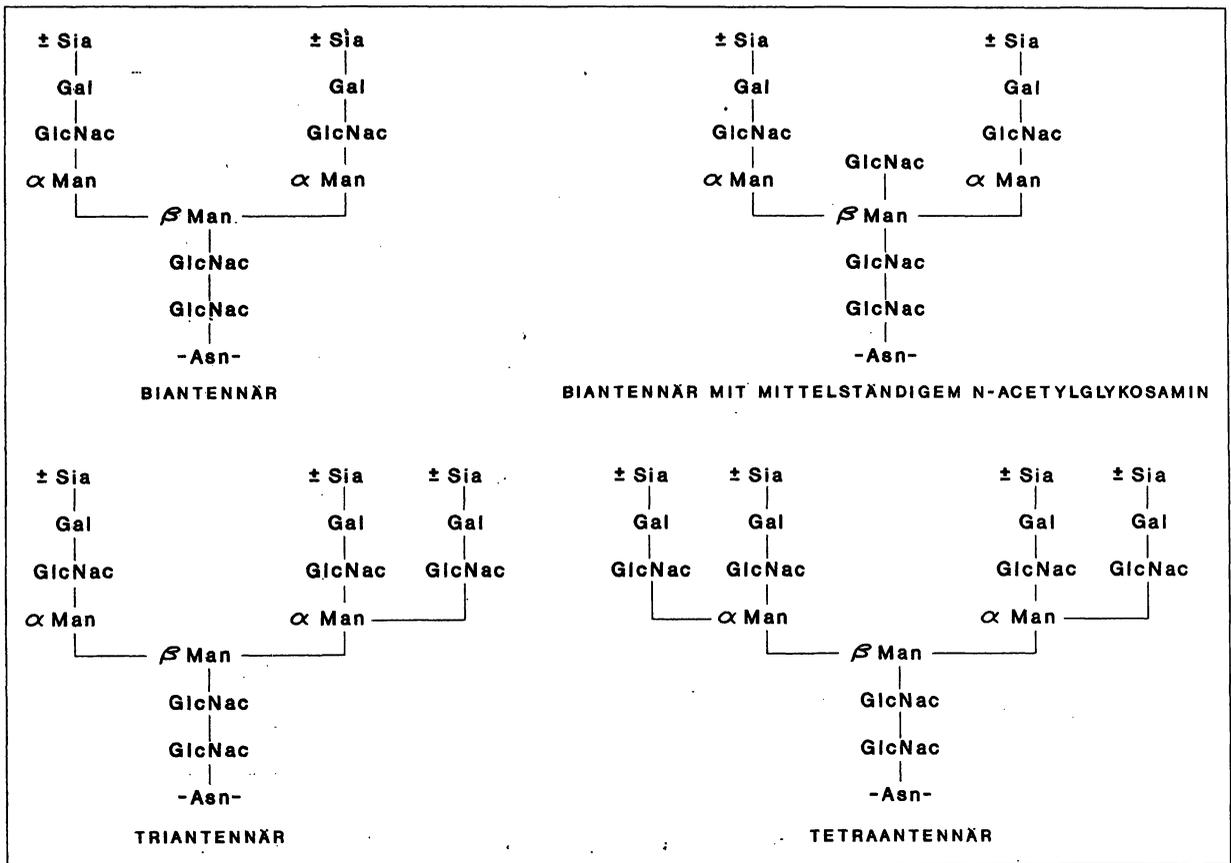


Abb. 1: Charakteristische Konfiguration der Heteroglykan-Moleküle der Akute-Phase-Glykoproteine.

Abkürzungen: Sia = Sialinsäure; Gal = Galaktose; GlcNac = N-Acetylglucosamin;  $\alpha$ -Man =  $\alpha$ -gebundene Mannose;  $\beta$ -Man =  $\beta$ -gebundene Mannose; Asn = Asparagin

wicht beträgt 41 kD, wovon 45% Heteroglykane ausmachen. Dieser hohe Gehalt an Heteroglykanen macht dieses Glykoprotein zum Prototyp für die Bestimmung der Zuckeranteile von Akute-Phase-Glykoproteinen (9).

Die im  $\alpha_1$ -sauren Glykoproteinmolekül und auch in den anderen Akute-Phase-Glykoproteinen vorhandenen Heteroglykane haben zwei, drei oder vier Seitenketten, die sogenannte bi-, tri- oder tetraantennäre Strukturen bilden (2, 8, 9, 10) (Abb. 1). Die unterschiedlichen Anteile dieser Heteroglykanmoleküle am Gesamtmolekül bestimmen die sogenannte Mikroheterogenität der Akute-Phase-Proteine.

Zur Unterscheidung der Struktur der Glykoproteine wurden verschiedene Methoden entwickelt, wie chemische Analysen, enzymatische und physikalische Methoden, die Lektin-Säulen-Chromatographie, die Lektin-Affinitäts-Diffusionstechnik u. a. (9, 11, 12). Eine der meist verwendeten Methoden ist die Affinitäts-Elektrophorese mit Lektinen als Trägersubstanz (13). Die Lektine sind pflanzliche Proteine, die die Fähigkeit besitzen, spezifisch mit einzelnen Monosacchariden der Heteroglykanseitenketten von Gly-

koproteinen zu reagieren (8), weshalb in der Affinitäts-Elektrophorese verschiedene Zuckerstrukturen von Akute-Phase-Proteinen zu unterscheiden sind. Besonders oft wird das  $\alpha$ -Mannose-spezifische Lektin-Concanavalin A (ConA) benutzt. Die Bindung der Oligosaccharide oder Glykoproteine mit ConA ist von dem Vorhandensein der zwei  $\alpha$ -gebundenen, nichtreduzierenden endständigen Strukturen oder der  $\alpha$ -gebundenen, 2-O-substituierten Mannose mit freien C-3-, C-4- und C-6-Hydroxylgruppen im Glykanmolekül abhängig (14), wobei das mittelständige, zur  $\beta$ -Mannose gebundene N-Acetylglucosaminmolekül die Bindung inhibiert. Da nur die biantennären, nicht jedoch tri- oder tetraantennären Zuckerseitenketten der Akute-Phase-Glykoproteine die oben erwähnten Strukturen besitzen, hängt die Gesamtaffinität der jeweiligen Proteinmoleküle von der Gesamtzahl der biantennären Heteroglykane ab (15).

Bei der Untersuchung des  $\alpha_1$ -sauren Glykoproteins, aber auch verschiedener anderer Akute-Phase-Glykoproteine erlaubt die Affinitäts-Elektrophorese vier verschiedene Mikroheterogenitätsvariante zu objektivieren (2, 8, 10) (Abb. 2):

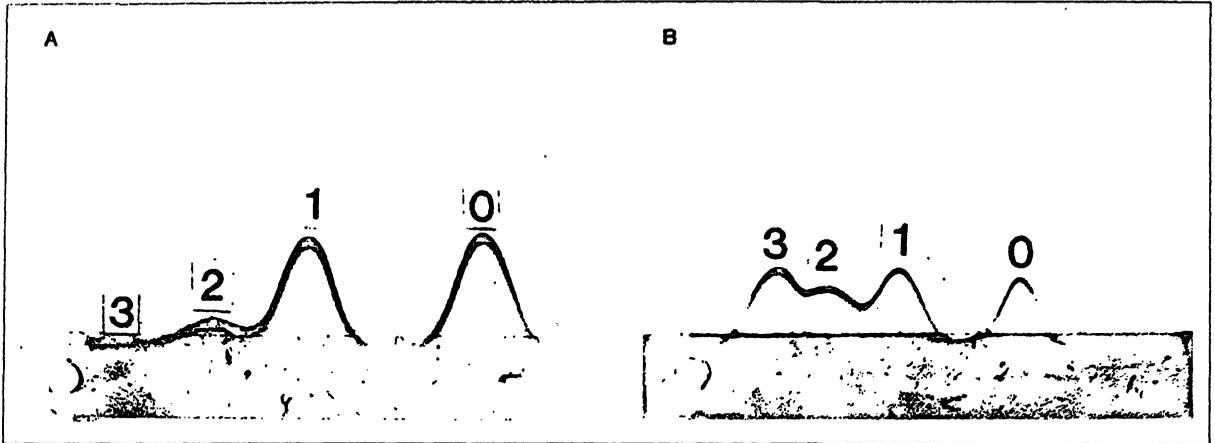


Abb. 2: Glykosylierungsmuster des  $\alpha$ -1-sauren Glykoproteins (A) und des  $\alpha$ -1-Antichymotrypsins (B). 0 = die nicht mit ConA reagierende Variante, 1 = die schwach mit ConA reagierende Variante, 2 = die deutlich mit ConA reagierende Variante, 3 = die stark mit ConA reagierende Variante

1. Glykoproteine, die nicht mit ConA reagieren, da sie keine biantennären Heteroglykanstrukturen besitzen (Variante 0)
2. Schwach mit ConA reagierende Glykoproteine, die eine biantennäre Zuckerstruktur haben (Variante 1)
3. Deutlich mit ConA reagierende Glykoproteine mit zwei biantennären Zuckerstrukturen (Variante 2).

Gelegentlich beobachtet man eine vierte mikroheterogene Fraktion (Variante 3), die besonders häufig in Seren von Patienten mit akuten Entzündungen gefunden wird.

Die unterschiedlichen Quantitäten der o.e. mikroheterogenen Fraktionen lassen bei der Untersuchung des  $\alpha$ -1-sauren Glykoproteins drei verschiedene Glykosylierungsmuster erkennen (Abb. 3). Das erste Muster, das bei Gesunden, aber auch bei Patienten mit systemischen Lupus erythematodes und Neoplasien gefunden wird, ist durch einen etwa gleich hohen Peak der Variante 0 und 1 gekennzeichnet (8, 16). Die stärker mit Concanavalin A reagierende Komponente 2 kommt hierbei nur in niedriger Konzentration vor.

Bei chronischen Entzündungen ist die Serumkonzentration der Fraktion 0 deutlich höher als die der Komponente 1. Die Komponente 2 ist wie beim Gesunden nur in niedriger Konzentration oder überhaupt nicht nachweisbar (2, 8, 10, 17).

Bei akuten Gewebsschädigungen wie etwa akuten bakteriellen Infektionen, der Pankreatitis oder Traumen ist die Concanavalin A-Reaktivität des  $\alpha$ -1-sauren Glykoproteins erhöht, was sich in einer relativen Erhöhung der Komponenten 1 und 2 sowie evtl. dem Auftreten einer 3. Komponente widerspiegelt (8, 18, 19).

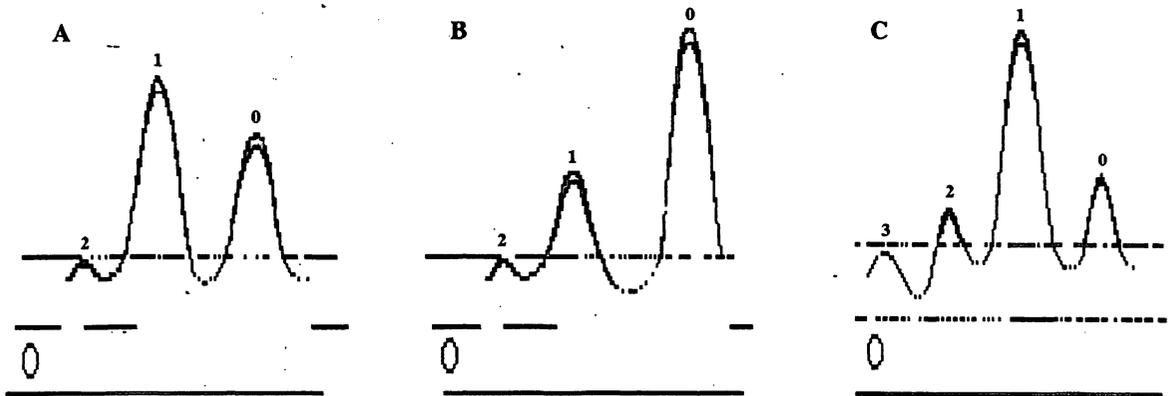
Um Veränderungen des Glykosylierungsmusters zu quantifizieren, wird der sogenannte Reaktivitätskoeffizient berechnet (Abb. 3), der ein Maß für die relative Konzentra-

tion der mit Concanavalin A reagierenden und mit Concanavalin A nicht reagierenden Glykoproteine darstellt. Hierbei wird nach planimetrischer Quantifizierung der einzelnen Fraktionen die Summe der Fraktion 1 bis 3 durch die Fraktion 0 dividiert. Durchschnittlich beträgt der Reaktivitätskoeffizient des AGP beim Gesunden  $1,28 \pm 0,25$ , ist bei akuten Entzündungen wegen des höheren Anteils von Glykoproteinen mit biantennären Zuckerstrukturen erhöht, bei chronischen Entzündungen dagegen erniedrigt. Dementsprechend können sich die Unterschiede des Glykosylierungsmusters im Krankheitsverlauf bei Übergang von akuten in chronisch-entzündliche Erkrankungen ändern. Im Akutstadium ist eine erhöhte Reaktivität der Akute-Phase-Glykoproteine mit ConA zu beobachten, die sich im weiteren Verlauf bei Fortdauer der Infektion zunehmend erniedrigt, um sich mit Verschwinden der Infektion wieder zu normalisieren (20).

### Veränderungen der Glykosylierung der Akute-Phase-Proteine bei rheumatischen Erkrankungen

Die meisten rheumatischen Erkrankungen stellen bekanntlich chronische Entzündungen dar. Ein typisches Beispiel ist die chronische Polyarthrit, bei der die Serumspiegel der Akute-Phase-Proteine wie z. B. des C-reaktiven Proteins oder des Serumamyloid A mit zunehmender entzündlicher Aktivität der Erkrankung ansteigen, weshalb sie als Aktivitätsparameter angewandt werden. Im Gegensatz dazu beobachtet man bei zunehmender Aktivität eine Erniedrigung in der  $\alpha$ -1-saures Glykoprotein-Concanavalin A-Reaktivität (21, 22).

Sicher kann die Bestimmung des Glykosylierungsmusters der Akute-Phase-Proteine nicht als ideale Methode für die Untersuchung der Aktivität der Erkrankung angesehen werden. Viel aussagekräftiger sind hier die Bestimmung des oben genannten C-reaktiven Proteins, des Serum-



A -  $RC=1.28 \pm 0.25$ . Vorkommen bei Gesunden, Neoplasien und dem systemischen Lupus erythematoses.

B -  $RC < 1.03$ . Anteil der biantennären Oligosacchariden im AGP erniedrigt (Komponente 0 erhöht). Vorkommen bei chronisch-entzündlichen Erkrankungen, wie der chronischen Polyarthrit, der Spondylitis ankylosans und chronischen bakteriellen Infektionen.

C -  $RC > 1.53$ . Anteil der biantennären Oligosacchariden im AGP erhöht (zusätzlicher Peak 3). Vorkommen bei akuten bakteriellen Infektionen, Verbrennungen, dem Myokardinfarkt, der Pankreatitis.

$$\text{Reaktivitätskoeffizient (RC)} = \frac{\text{Summe aller mit ConA reagierenden Varianten (1-3)}}{\text{Variante 0 (nicht mit ConA reagierend)}}$$

Abb. 3: Unterschiedliche Glykosylierungsmuster des alpha-1-sauren Glykoproteins.

amyloid A oder einfach die altbewährte Blutsenkung. Es gibt jedoch klinische Situationen, in denen diese Methoden versagen, insbesondere bei interkurrenten Infektionen.

Bekanntlich stellen Infektionen bei den Patienten mit chronischer Polyarthrit ein ernstes Problem dar. Nach Untersuchungen von Baum (23) ist die Mortalität bei der chronischen Polyarthrit wegen der Infektionen höher als in der Gesamtpopulation, wohl bedingt durch eine Immunschwäche, die durch die Erkrankung selbst oder die Anwendung von Immunsuppressiva bedingt ist.

Da akute Infektionen einen erhöhten, chronische Polyarthritiden dagegen einen erniedrigten Reaktivitätskoeffizienten des  $\alpha_1$ -sauren Glykoproteins aufweisen, erschien es möglich, die Infektion mit Hilfe des Reaktivitätskoeffizienten des genannten Proteins zu erfassen. Hierfür haben die Untersuchungen von Pawlowski et al. den Beweis ge-

liefert (24). Im Gegensatz zu verminderten Reaktivität des  $\alpha_1$ -sauren Glykoproteins mit Concanavalin A bei den Patienten mit der aktiven chronischen Polyarthrit zeigte sich bei der chronischen Polyarthrit-Gruppe mit Infektionen eine Erhöhung des Reaktivitätskoeffizienten des genannten Proteins. Wenn bei der aktiven chronischen Polyarthrit ein Reaktivitätskoeffizient von 1,00 als Grenzwert angenommen wird, so ergibt sich für den Nachweis einer Infektion durch den Anstieg dieses Koeffizienten eine Sensitivität von 100% und eine Spezifität von 79. Nimmt man dagegen bei dieser Erkrankung einen Reaktivitätskoeffizienten von 1,27 als Grenzwert an, so beträgt die Sensitivität 73%; die Spezifität 100%. Eine dritte Fraktion wurde überhaupt nur bei den chronischen Polyarthritiden beobachtet, die eine gleichzeitige Infektion aufwiesen, womit diesem Peak eine Sensitivität und Spezifität von 100% zukommt. Obwohl die Infektion von einem Anstieg der Serumkonzentration des CRP und AGP begleitet wurde, waren die Unterschiede im Vergleich zur aktiven Polyarthrit zu

**Tabelle 3: Bestimmung der Mikroheterogenität der Akute-Phase-Proteine in der Differentialdiagnose der rheumatischen Erkrankungen**

1. Nachweis der Akuität und Chronizität entzündlicher Prozesse bei bakteriellen Infektionen und auch bestimmten rheumatischen Erkrankungen wie z. B. der Spondylitis ankylosans
2. Abtrennung infektiöser Prozesse von rheumatischen Erkrankungen bei der chronischen Polyarthrit, dem systemischen Lupus erythematoses und dem juvenilen Morbus Still
3. Differenzierung zwischen einzelnen rheumatischen Erkrankungen wie der Polymyalgia und der Poly-/Dermatomyositis

niedrig, um eine ausreichende Sensitivität und Spezifität zu erreichen. Aufgrund dieser Studie scheint der Reaktivitätskoeffizient ein sehr sensibler diagnostischer Parameter zur Aufdeckung einer Infektion bei Patienten mit chronischer Polyarthrit zu sein. Einschränkend zu diesen Beobachtungen muß jedoch betont werden, daß bei der chronischen Polyarthrit offensichtlich im Frühstadium auch eine Erhöhung des Reaktivitätskoeffizienten vorkommt, ohne daß eine Infektion vorhanden ist (25).

Besonders wichtig ist die rechtzeitige Diagnose einer Infektion bei Patienten mit systemischem Lupus erythematoses (SLE), denn oft ist eine entsprechende Differenzierung aufgrund der klinischen Symptomatik nicht möglich, kommen doch Fieber und Allgemeinsymptome sowohl beim aktiven SLE wie auch beim SLE mit gleichzeitiger Infektion vor. Die Differentialdiagnose dieser beiden Zustände hat aber weitreichende therapeutische Konsequenzen, erfordert doch die Exazerbation des SLE eine Erhöhung der Corticosteroiddosen und evtl. den Einsatz von Immunsuppressiva, während bei bakteriellen Infektionen eine intensive Therapie mit Antibiotika erforderlich ist. Auch hier kann die Bestimmung der Mikroheterogenität klinisch relevante Informationen liefern. Während bei Patienten mit aktivem Lupus keine Veränderungen der Glykosylierung der Akute-Phase-Proteine im Vergleich zu Gesunden zu beobachten sind, steigt die Reaktivität dieser Proteine mit ConA bei interkurrenten Infektionen wesentlich an, weshalb sich aktive Fälle von systemischen Lupus erythematoses von solchen mit Begleitinfektionen mit hoher Sensitivität (83%) und Spezifität (100%) unterscheiden lassen (16).

Eine gewisse Bedeutung kommt auch der Bestimmung des Glykosylierungsprofils des  $\alpha_1$ -sauren Glykoproteins und des  $\alpha_1$ -Antichymotrypsins in der Differentialdiagnose einzelner rheumatischer Erkrankungen zu. Nach den bisherigen Befunden scheint z. B. eine Abgrenzung der chronischen Polyarthrit zum systemischen Lupus erythematoses bis zu einem gewissen Grad aufgrund des Reaktivitätskoeffizienten der Akute-Phase-Glykoproteine möglich. Besondere Beachtung wurde dem Reaktivitätskoeffizienten des  $\alpha_1$ -sauren Glykoproteins und des  $\alpha_1$ -Antichymotrypsins bei der Abtrennung der Polymyositis/Dermatomyositis von der Polymyalgia rheumatica geschenkt.

Während sich bei der letztgenannten Erkrankung mit und ohne begleitende Arteritis temporalis ein Abfall des Reaktivitätskoeffizienten der beiden Glykoproteine fand, konnte bei der Poly-/Dermatomyositis ein Anstieg der Reaktivität der beiden Akute-Phase-Proteine mit Concanavalin A beobachtet werden (26). Dieses entgegengesetzte Verhalten in den Glykosylierungsmustern erlaubt eine Unterscheidung der beiden erwähnten Erkrankungen, welche durch die Bestimmung des C-reaktiven Proteins nicht möglich ist, ist doch die Sensitivität und Spezifität der CRP-Bestimmung hierbei weit geringer als diejenige des Reaktivitätskoeffizienten der Akute-Phase-Proteine.

Schließlich sei noch erwähnt, daß es offensichtlich durch die Bestimmung des Glykosylierungsmusters des  $\alpha_1$ -sauren Glykoproteins möglich ist, die Aktivität der Spondylitis ankylosans zu erfassen (27), beobachtet man doch im Exazerbationsstadium der Erkrankung das Auftreten eines dritten Peaks und eine Normalisierungstendenz des im chronischen Stadium der Erkrankung erniedrigten Reaktivitätskoeffizienten.

Die differentialdiagnostische Bedeutung der Bestimmung der Mikroheterogenität der Akute-Phase-Proteine ist in Tabelle 3 zusammengefaßt.

Sicherlich stellt die Bestimmung des Glykosylierungsmusters der Akute-Phase-Proteine eine wertvolle Bereicherung der Labordiagnostik rheumatischer Erkrankungen dar, doch dürfen die Befunde des Glykosylierungsmusters dieser Proteine nie für sich allein gesehen werden, sondern sollen immer nur im Zusammenhang sowohl mit den klinischen wie auch mit den Laborbefunden verwertet werden.

#### Literatur:

1. Kushner, I. (1982) The phenomenon of the acute phase response. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 389, 39-48.
2. Pawlowski, T., Aeschlimann, A., Mackiewicz, S. & Müller, W. (1990) Das Heteroglykan-Profil von Akute-Phase-Proteinen zur Differenzierung entzündlicher Prozesse. *Z. Rheumatol.* 49, 39-43.
3. Andus, T., Geiger, T., Hirano, T., Kishimoto, T. & Heinrich, P. C. (1988) Action of recombinant human interleukin 6, interleukin 1 beta and tumor necrosis factor alpha on the mRNA induction of acute-phase proteins. *Eur. J. Immunol.* 18, 739-746.
4. Guerne, P. A., Zuraw, B. L., Vaughan, J. H., Carson, D. A. & Lotz, M. (1989) Synovium as a source of interleukin 6 in vitro. Contribution to local and systemic manifestations of arthritis. *J. Clin. Invest.* 83, 585-592.
5. Castell, J. V., Gomez-Lechon, M. J., David, M., Andus, T., Geiger, T., Trullenque, R., Fabra, R. & Heinrich, P. C. (1989) Interleukin-6 is the major regulator of acute phase protein synthesis in adult human hepatocytes. *FEBS-Lett.* 242, 237-239.
6. Mackiewicz, A., Ganapathi, M. K., Schultz, D. & Kushner, I. (1987) Monokines regulate glycosylation of acute phase proteins. *J. Exp. Med.* 166, 253-258.
7. Mackiewicz, A., Schultz, D., Mathison, J., Ganapathi, M. & Kusner, I. (1989) Effect of cytokines on glycosylation of acute phase proteins in human hepatoma cell lines. *Clin. Exp. Immunol.* 74, 70-75.
8. Hrycaj, P. & Müller, W. (1992) N-Glykosylierung der Proteine bei rheumatischen Erkrankungen. *Z. Rheumatol.* 51, 51-54.
9. Hughes, R. C. (1984) Glycoproteins. Chapman and Hall, London, New York.
10. Mackiewicz, A. & Pawlowski, T. (1989) Major microheterogeneity of alpha1-acid glycoprotein in rheumatic diseases. In: Genetics, biochemistry, physiological functions and pharmacology of alpha1-acid glycoprotein. Allan R. Liss, Inc. New York.
11. Kornfeld, R. & Kornfeld, S. (1976) Comparative aspects of glycoprotein structure. *Ann. Rev. Biochem.* 47, 217-237.
12. Schachter, H. (1984) Glycoproteins: their structure, biosynthesis and possible clinical implications. *Clin. Biochem.* 17, 3-14.
13. Bog-Hansen, T. C. (1973) Crossed immunoelectrophoresis: an analytical method to predict the result of affinity chromatography. *Anal. Biochem.* 56, 480-488.

14. Narasimhan, S., Wilson, J. R., Martin, E. & Schachter, H. (1978) A structural basis for four distinct elution profiles on concanavalin A-Sepharose affinity chromatography of glycopeptides. *Can. J. Biochem.* 57, 83-96.
15. Bierhuizen, M. F. A., DeWit, M., Govers, C. A., Ferwerda, W., Koeleman, C., Pos, O. & Van Dijk, W. (1988) Glycosylation of three molecular forms of human alpha-1-acid glycoprotein having different interactions with Concanavalin A. *Eur. J. Biochem.* 175, 387-394.
16. Mackiewicz, A., Marcinkowska-Pieta, R., Ballou, S., Mackiewicz, S. & Kushner, I. (1987) Microheterogeneity of alpha-1-acid glycoprotein in the detection of intercurrent infection in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 30, 513-518.
17. Mackiewicz, A., Khan, M. A., Reynolds, T. L., Van der Linden, S. & Kushner, I. (1989) Serum IgA, acute phase proteins and glycosylation of alpha-1-acid glycoprotein in ankylosing spondylitis. *Ann. Rheum. Dis.* 48, 99-103.
18. Hansen, J. E. S., Jensen, S. P., Norgaard-Pedersen, B. & Bog-Hansen, T. C. (1986) Electrophoretic analysis of the glycan microheterogeneity of orosomucoid in cancer and inflammation. *Electrophoresis* 7, 180-183.
19. Pawlowski, T., Biczysko, M., Solarewicz, M., Mackiewicz, S., Pruchniewski, D. & Sarrazin, O. (1988) Microheterogeneity of alpha-1-acid glycoprotein in burns children. In: *Lectins - biology, biochemistry and clinical biochemistry*. Sigma press 6, 491-496.
20. Fassbender, K., Zimmerli, W., Kissling, R., Sobieska, M., Aeschlimann, A., Kellner, M. & Müller, W. (1991) Glycosylation of alpha-1-acid glycoprotein in relation to duration of disease in acute and chronic infection and inflammation. *Clin. Chim. Acta.* 203, 315-328.
21. Mackiewicz, A., Pawlowski, T., Mackiewicz-Pawlowska, A., Wiktorowicz, K. & Mackiewicz, S. (1987) Microheterogeneity of alpha-1-acid glycoprotein as indicator of rheumatoid arthritis activity. *Clin. Chim. Acta.* 163, 185-190.
22. Mackiewicz, A., Pawlowski, T., Wiktorowicz, K. & Mackiewicz, S. (1986) Microheterogeneity of alpha-1-acid glycoprotein, alpha-1-antichymotrypsin and alpha-1-antitrypsin in rheumatoid arthritis. In: *Bog-Hansen, T. C., van Driessche, E. Eds Lectins 5*, Berlin, Walter de Gruyter, 623-630.
23. Baum, J. (1971) Infection in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 14, 135-137.
24. Pawlowski, T., Mackiewicz, S. H. & Mackiewicz, A. (1989) Microheterogeneity of alpha-1-acid glycoprotein in the detection of intercurrent infection in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 32, 347-351.
25. Hrycaj, P., Sobieska, M., Mackiewicz, S. & Müller, W. (1992) Microheterogeneity of alpha-1-acid glycoprotein in rheumatoid arthritis-dependent on disease duration? *Ann. Rheum. Dis.* (in press)
26. Pawlowski, T., Aeschlimann, A., Kahn, M. F., Vaith, P., Mackiewicz, S. H. & Müller, W. (1990) Microheterogeneity of acute phase proteins in the differentiation of polymyalgia rheumatica from polymyositis. *J. Rheumatol.* 17, 1187-1192.
27. Stratz, T., Samborski, W., Sobieska, M., Mennet, P. & Müller, W. (1992) Die Glykosylierung des alpha-1-sauren Glykoproteins bei der Spondylitis ankylosans in Abhängigkeit von der Aktivität der Erkrankung und physikalischen Therapiemaßnahmen (Kälte/Wärme). In: *Veränderungen der Glykosylierung von Proteinen bei rheumatischen Erkrankungen*. Symposium, Bad Polzin, 18.-19. 5. 1992. (Abstracts) *Z. Rheumatol.* 51, 98.

## Anschrift des Verfassers:

Prof. Dr. Dr. hc. W. Müller  
Hochrhein-Institut für Rheumaforschung  
und Rheumaprävention  
Bergseestraße 61  
7880 Bad Säckingen

# Bestimmung von Eicosanoiden in biologischem Material

## Determination of eicosanoids in biological material

D. Pallapies

Abteilung für Pharmakologie und Toxikologie, Ruhr-Universität Bochum

### Zusammenfassung:

*Eine Eicosanoid-Bestimmung in biologischem Material ist prinzipiell mit unterschiedlichen, voneinander unabhängigen Methoden möglich: Bioassay, Radioimmunoassay, Enzymimmunoassay, Gaschromatographie/Massenspektrometrie, Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC). Zur Zeit stellt der Radioimmunoassay die auf diesem Gebiet am weitesten verbreitete Methode dar, deren Vorteile in verhältnismäßig guter Sensitivität, Spezifität und Geschwindigkeit, in der kommerziellen Verfügbarkeit radioaktiv markierter Eicosanoide und spezifischer Antikörper und in dem einfachen methodischen Prinzip liegen. Radioimmunologische Eicosanoid-Bestimmungen sind im allgemeinen in Gewebe-Inkubationsmedien und proteinfreien Organperfusaten zuverlässig durchzuführen, während exakte Messungen von Urin- und Plasmaspiegeln wegen der Vielzahl möglicher unspezifischer Interferenzen wesentlich komplizierter sind. Für eine Validierung der mittels Radioimmunoassay gewonnenen Daten bietet sich die HPLC an, die auch die Separation von im Radioimmunoassay kreuz-reagierenden Eicosanoiden ermöglicht.*

### Schlüsselwörter:

*Eicosanoide – Radioimmunoassay – Hochdruckflüssigkeitschromatographie*

### Summary:

*Determination of eicosanoids in biological material can be performed by several independent methods such as bioassay, radioimmunoassay, enzyme immunoassay, gas chromatography/mass spectrometry, high pressure liquid chromatography (HPLC). Radioimmunoassay is the most widely used method because of its relatively high sensitivity, specificity and speed, the commercial availability of radiolabeled eicosanoids and specific antibodies and because of its simple methodology. In general, eicosanoid concentrations in tissue incubation media or protein-free perfusates can be reliably determined, while exact measurement of urine and plasma levels is much more complicated because of various non-specific interfering factors. For validation of data obtained by radioimmunoassay, HPLC, which is also used for separation of eicosanoids cross-reacting in radioimmunoassays, is preferred.*

### Keywords:

*eicosanoids – radioimmunoassay – high pressure liquid chromatography*

Die Eicosanoide umfassen eine Vielzahl von Verbindungen sehr unterschiedlicher biologischer Aktivität, die entweder als Prostaglandine (PG) und Thromboxane (TX) zu den Cyclooxygenaseprodukten oder als Hydroperoxyeicosatetraensäuren, Hydroxyeicosatetraensäuren oder Leukotriene (LT) zu den Lipxygenaseprodukten des Arachidonsäurestoffwechsels zählen (Abb. 1). Wegen der z. T. nur sehr geringen Struktur- oder Konfigurationsunterschiede zwischen den Arachidonsäuremetaboliten ist es entscheidend, daß die zur quantitativen Eicosanoidbestimmung verwendeten Methoden eine hohe Spezifität besitzen. Prinzipiell sind Eicosanoidbestimmungen in biologischem Material mit folgenden, voneinander unabhängigen Methoden möglich: Bioassay, Gaschromatographie

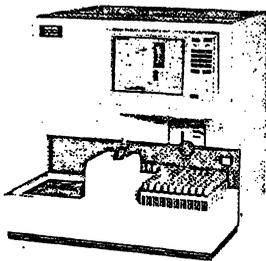
in Kombination mit Massenspektrometrie, Chemilumineszenz-, Enzym- und Radioimmunoassay und Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) mit UV-Detektion. Mit verschiedenen Bioassays läßt sich zwar die Freisetzung instabiler Eicosanoide aus Organen und Geweben kontinuierlich und unmittelbar bestimmen, allerdings sind Spezifität und Präzision dieser Methodik deutlich geringer als die anderer Methoden, so daß eine Validierung der Resultate beispielsweise durch Zusatz eines selektiven Rezeptorantagonisten erfolgen sollte (1). Als nachteilig ist auch die oft sehr begrenzte Anzahl meßbarer Proben pro biologischem Präparat anzusehen. Beispiele für Eicosanoid-Bioassays stellen die PG<sub>12</sub>-Bestimmung anhand der inhibitorischen Wirkung auf die Thrombozytenaggregation

**DIGITANA AG:**

# Garant für Genauigkeit und Zuverlässigkeit in der Hämatologie

**Sysmex NE-1500**

**Der kompakte  
Differenzier-Automat**



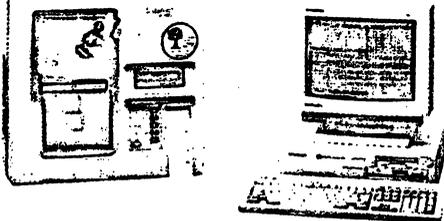
**Sysmex SULFOLYSER**

**Zur cyanidfreien  
Bestimmung  
der Hämoglobin  
Konzentration.**



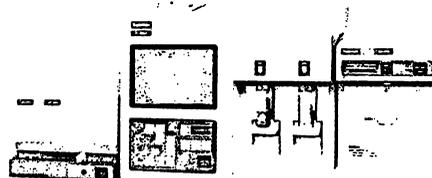
**Sysmex K-1000 Serie**

**Automatische  
Blutbildanalyse für  
jeden Bedarf**



**Sysmex F-Serie**

**Genauigkeit und  
Zuverlässigkeit auch  
im kleinen Labor**



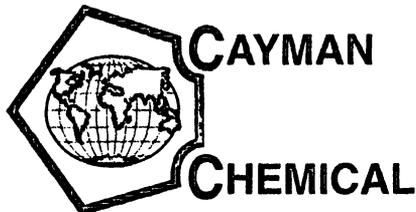
**Interessiert ?**

**Info-Material bitte hier anfordern!**

**DIGITANA AG**

**Ganz genau und zuverlässig.**

D- 2000 Hamburg 76 Weidestraße 118 b Tel.: 040 / 270 70 50  
CH- 8810 Horgen Burghaldenstrasse 11 Tel.: 01 / 725 61 91



**DAS NEUE CAYMAN-EICOSANOID-PROGRAMM BIETET ATTRAKTIVE PRODUKTE UND METHODEN FÜR DIE FORSCHUNG, SPEZIELL ENZYMIMMUNOASSAYS ZUR BESTIMMUNG VON:**

- Prostaglandin D<sub>2</sub>-MOX
- Prostaglandin E<sub>2</sub>
- Bicyclo-Prostaglandin E<sub>2</sub>
- 6-keto-Prostaglandin F<sub>1α</sub>
- Prostaglandin F<sub>2α</sub>
- 11-β-Prostaglandin F<sub>2α</sub>
- 13,14-dihydro-15-keto-Prostaglandin F<sub>2α</sub>
- 8-Isoprostan (8-Iso-Prostaglandin F<sub>2α</sub>)
- Thromboxan B<sub>2</sub>
- 2,3-dinor-Thromboxan B<sub>2</sub>
- 11-dehydro-Thromboxan B<sub>2</sub>
- Leukotrien B<sub>4</sub>
- Leukotrien C<sub>4</sub>
- Leukotrien E<sub>4</sub>
- Endothelin

**SOWIE EINE VIELZAHL VON REINSUBSTANZEN, ANTIKÖRPERN UND ENZYMEN**

**ALLEINVERTRIEB IN DEUTSCHLAND DURCH**



IMMUNO BIOLOGICAL LABORATORIES

**GESELLSCHAFT FÜR IMMUNCHEMIE UND IMMUNBIOLOGIE MBH**  
 FLUGHAFENSTRASSE 52 A, D-2000 HAMBURG 63  
 TEL.: (0 40) 53 28 91-0  
 FAX: (0 40) 53 28 91-11

**M**it diesem Buch können Sie Ihr Wissen über Bluthochdruck auf den neuesten Stand bringen. Es vermittelt in sehr verständlicher und übersichtlicher Weise den aktuellen Wissensstand über Definition, Ursachen, Verlauf, Komplikationen und Behandlungsmöglichkeiten der Hypertonie. Eine bebilderte Darstellung der derzeit empfohlenen Ernährung bei Hypertonie bildet einen wichtigen Teil des Buches. Das Besondere an diesem Buch für Patienten ist jedoch die um-

**Wie behandle ich meinen Bluthochdruck**

Von Ingrid Mühlhauser, Ulrike Dajdurgeit und Peter T. Sawicki

fassende Beschreibung der modernen medikamentösen Behandlung des Bluthochdrucks, die dem Patienten eine verständliche Übersicht vermittelt. Kapitel über Sport und Streß bei Bluthochdruck, Schwangerschaft und Bluthochdruck und Bluthochdruck bei älteren Menschen vervollständigen das Buch. Wie behandle ich meinen Bluthochdruck ist in höchstem Maße auch

informativ für Arzthelferinnen, Krankenschwestern/Pfleger, Studenten und Ärzte.

**Verlag Kirchheim**  
**Postfach 25 24**  
**6500 Mainz 1**

**Bestellcoupon:**  
 Bitte senden Sie mir ... Expl. Wie behandle ich meinen Bluthochdruck, 2. Auflage 1992, 110 Seiten, 24,80 DM, ISBN 3-87409-052-3.

Name:

Straße:

PLZ/Ort:

Datum/Unterschrift:

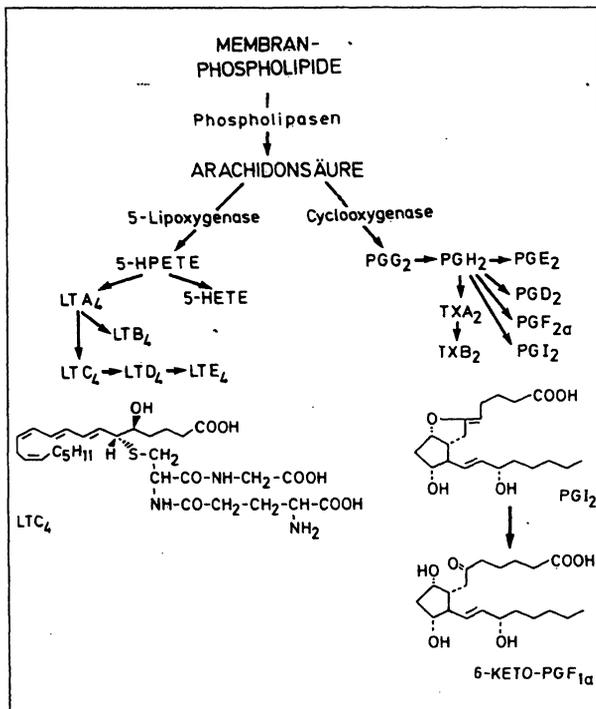


Abb. 1: Metabolismus der Arachidonsäure

(2), die PGE<sub>2</sub>-Bestimmung anhand der kontraktilen Wirkung auf isolierte Rattenmagenstreifen (2) oder die Cysteinyl-LT-Bestimmung mittels des Meerschweinchenileumsassays (3) dar. Für LTB<sub>4</sub> ist ein Bioassay beschrieben, der auf der lokalen Extravasation radioaktiv markierten Serumalbumins nach intradermaler LTB<sub>4</sub>- und PGE<sub>2</sub>-Injektion basiert (4). Im Unterschied dazu lassen sich Eicosanoide mit Hilfe der Gaschromatographie/Massenspektrometrie hochspezifisch und präzise bestimmen. Die Massenspektrometrie ist die einzige Methode, die eine formale Identifizierung der Eicosanoide ermöglicht. In Kombination mit der Gaschromatographie läßt sich deshalb eine zuverlässige quantitative Eicosanoidanalyse durchführen. Allerdings müssen andere interferierende biologische Stoffe auch bei dieser hochspezifischen Methode gegebenenfalls berücksichtigt werden (5). Entscheidende Nachteile der Kombination aus Gaschromatographie und Massenspektrometrie sind lange Analysendauer und hohe Kosten.

Die heute am meisten verwendeten Verfahren zur Eicosanoidbestimmung sind Immunoassays, sowohl Enzymimmunoassays als auch Radioimmunoassays. Für beide Typen von Immunoassays ist natürlich die Spezifität des jeweiligen Antikörpers entscheidend. Daneben ist bei biologischem Material die Reinheit der zu analysierenden Proben von besonderer Relevanz. Dabei haben sich Sep-Pak- bzw. HPLC-Reinigung bewährt. Werden die möglichen Störfaktoren entsprechend berücksichtigt und eliminiert, so zeichnen sich Immunoassays durch besonders hohe Sensitivität, Analysierbarkeit einer großen Proben-

zahl pro Tag sowie durch gute Spezifität und Präzision aus. Als spezieller Typ des Immunoassays ist der Chemilumineszenzassay zu erwähnen, bei dem Hapten-Katalase-Konjugate mit den Eicosanoiden um die Antikörperbindungsstellen konkurrieren. Bei noch höherer Sensitivität bis 10<sup>-18</sup> mol/l weist der Chemilumineszenzassay allerdings eine niedrigere Präzision auf als der Radioimmunoassay und ist etwas aufwendiger in der Durchführung (6).

#### Radioimmunoassays und HPLC

Da Eicosanoide zu kleine Moleküle sind, als daß sie selbst immunogen sein könnten, ist es notwendig, sie an makromolekulare Carrier zu koppeln, um eine Immunreaktion hervorzurufen. Obwohl PG mehrere reaktive Gruppen besitzen, werden PG-Immungene gewöhnlich durch chemische Reaktionen mit der Carboxylgruppe synthetisiert. Ringstruktur und 15-Hydroxylgruppe werden dann zu immundominanten Gruppen. Mittels Carbodiimiden (7) beispielsweise wird die Aminogruppe eines Proteincarriers – im allgemeinen bovines Serumalbumin – an das PG gekoppelt. Cysteinyl-LT können gut über ihre freie Aminogruppe mittels Glutaraldehyd an Albumin gekoppelt werden (8). Das Hapten-Carrier-Konjugat wird nach Dialyse in destilliertem Wasser gelöst, mit Freundschem Adjuvans emulgiert und subkutan Kaninchen oder Meerschweinchen injiziert. Ein bis zwei Wochen nach wiederholten Boosterinjektionen in Intervallen von mehreren Wochen bis Monaten kann Antikörper enthaltendes Plasma gewonnen werden. Prinzipiell sind beim Arbeiten mit Radioimmunoassays möglicherweise störende Faktoren zu beachten und, soweit möglich, auszuschließen: dazu gehört z. B. die Aufrechterhaltung möglichst konstanter Bedingungen bezüglich pH, Temperatur und Ionenkonzentrationen der Puffer (9, 10). Störeffekte können ebenso auf der Verwendung von Antikoagulanzen oder protektiven Substanzen beruhen. Bei Verwendung heterologer Standards muß eine entsprechende Kreuzreaktivität vorliegen. Eine Mindestanforderung an einen validen Radioimmunoassay besteht darin, daß ein Parallelismus zwischen verschiedenen Verdünnungen von Standard einerseits und unbekanntem Eicosanoidkonzentrationen in biologischem Material andererseits besteht (9, 10). Zur Validierung des Radioimmunoassays sollten generell, vor allem während der Entwicklung eines neuen Assays, parallel Eicosanoidbestimmungen mittels einer anderen Methode durchgeführt werden wie z. B. Bioassay oder Gaschromatographie/Massenspektrometrie. Die Validität eines Immunoassays sollte auch überprüft werden, indem man zu biologischen Proben exogenen Standard zugibt. Danach sollte eine entsprechende Erhöhung der Gesamtmenge des Eicosanoids im Assay meßbar sein. Das immunoreaktive Antigen muß darüber hinaus, wenn möglich in mehreren chromatographischen Systemen, mit korrespondierendem Standard ko-chromatographieren (11, 12). Zusätzliche Validierung kann erzielt werden, indem man ein Enzym zugibt, das die zu messende Substanz so verändert, daß ihre Immunoreaktivität im entsprechenden Assay aufgehoben wird (13). Bislang sind allerdings nicht für alle Eicosanoide hochspezifische Antikörper verfügbar, so daß der Immunoassay allein zur exakten Bestimmung mancher Eicosanoidkonzentrationen nicht ausreicht. PGE<sub>1</sub> und sein aktiver Meta-

bolit 13,14-Dihydro-PGE<sub>2</sub>, einerseits (14), die Cysteinyl-LT LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub>, LTE<sub>4</sub>, andererseits (15) lassen sich z. B. dann eindeutig quantifizieren, wenn sie zunächst mittels HPLC voneinander getrennt und die Eluate anschließend radioimmunologisch untersucht werden. Die HPLC ist ein Mittel der Wahl zur Reinigung und Separation biologischen Materials nach vorheriger Sep-Pak-Extraktion. Aufgrund unterschiedlichster unspezifisch interferierender Substanzen ist die radioimmunologische Bestimmung von Eicosanoiden in biologischem Material in den meisten Fällen nur nach Reinigung möglich (16). Eine Extraktion bei sauren pH-Werten ist z. B. notwendig für die Bestimmung von PGE<sub>2</sub> und PGF<sub>2α</sub> in menschlichen Urinproben (12) oder im Magensaft (17). Dabei wird Chloroform oder Diethylether für die Extraktionen der weniger polaren PG der A- und E-Serie, Essigsäureethylester für Extraktionen der PG der F-Serie verwendet (18). Um Aufschluß über die „recovery“ zu erhalten, sollte man Tritium-markierte Eicosanoide denselben Reinigungsverfahren unterziehen wie die biologischen Proben (19). Dagegen ist es vorzuziehen, Prostanoiden im Plasma ohne vorherige Extraktion direkt zu bestimmen (20, 21), da die Gefahr der Interferenz anderer Substanzen, insbesondere von Arachidonsäure, nach Extraktion größer ist. Arachidonsäure ist im Plasma zum weitaus überwiegenden Teil an Proteine wie Albumin gebunden und interferiert in dieser Form kaum in Immunoassays, während nach Extraktion freie Arachidonsäure in hohen Konzentrationen oft signifikant mit Eicosanoid-Radioimmunoassays interferiert. Ein besonderes Problem bei der Bestimmung von TX- und PG-Plasmaspiegeln stellt die zusätzliche Synthese dieser Eicosanoide während der Probengewinnung dar. Werden direkt bei der Blutentnahme ein Cyclooxygenasehemmer wie Acetylsalicylsäure oder Indometacin sowie Natrium-EDTA als Antikoagulant zugegeben, so kann eine Synthese von TX und PG in vitro zu einem großen Teil verhindert werden (22, 23). Dennoch sind die mittels Radioimmunoassay bestimmten Plasma-TXB<sub>2</sub>-Spiegel oft sehr variabel. Während auch eine artifizielle Synthese primärer PG und von 6-Keto-PGF<sub>1α</sub> möglich ist, werden die 15-Keto-13,14-Dihydro-Metaboliten von PGE<sub>2</sub> und PGF<sub>2α</sub> und die entsprechenden Urinmetaboliten nicht bei der Gewinnung von Plasmaproben gebildet. Sie sind daher häufig ein vorzuziehender Meßparameter zur Erfassung von Änderungen der PG-Biosynthese in vivo. Die Analyse der LT-Spiegel in Blut und Urin bedarf im Allgemeinen einer vorherigen Extraktion und Reinigung. Dagegen lassen sich LT wie auch andere Eicosanoide mit wesentlich geringerem Aufwand zuverlässig in Organperfusaten und Gewebeeinkubationsmedien analysieren (18, 24). Die Bestimmung der in vitro-Synthese-Kapazität eines Gewebes ist in den meisten Fällen einer Bestimmung von „Eicosanoidgewebeskonzentrationen“ vorzuziehen. Sie ergibt sicherere Resultate, da Eicosanoide kaum im Gewebe gespeichert werden, sondern vielmehr nach Stimulation neu synthetisiert werden, so daß „Gewebeskonzentrationen“ oft nur die Synthese während Präparation und Homogenisation eines Gewebes widerspiegeln. Im Gewebe vorhandene inaktivierende Enzymaktivität kann zusätzliche Interferenzen bedingen (25). Generell sollte eine längere Lagerung der zur Eicosanoidbestimmung vorgesehenen biologischen Proben vermieden werden. Können die Proben nicht unmittelbar analysiert werden, so sollten sie gefroren aufbewahrt wer-

den. Insbesondere bei Plasmaproben ist eine Lagerung bei -70°C zu empfehlen, da bei -20°C bereits nach einigen Wochen Veränderungen der Immunreaktivität beobachtet wurden (23). Wiederholtes Frieren und Auftauen biologischen Materials ist zu unterlassen, da dadurch ebenfalls die Immunreaktivität entscheidend verändert werden kann (23, 26).

Zusammenfassend ist festzustellen, daß diverse Methoden zur Eicosanoidbestimmung zur Verfügung stehen, von denen heute Radio- und Enzymimmunoassays sowie die HPLC die am weitesten verbreiteten darstellen. Mit diesen Methoden lassen sich Eicosanoide unter Beachtung entsprechender Vorbereitung der Proben auch in relativ großer Probenanzahl in Plasma, Urin, Magensaft, Organperfusaten und Gewebeeinkubationsmedien hinreichend präzise bestimmen.

## Literatur:

1. Augstein, J., Farmer, J. B., Lee, T. B., Sheard, P., Tattersall, M. L. (1973) Selective inhibition of slow reacting substance of anaphylaxis. *Nature New Biol.* 245, 215-218.
2. Moncada, S., Ferreira, S. H., Vane, J. R. (1978) Bioassay of prostaglandins and biologically active substances derived from arachidonic acid. *Adv. Prostaglandin Thromboxane Res.* 5, 211-236.
3. Ford-Hutchinson, A. W. (1983) Biological properties of leukotriene and leukotriene sulfones. In: Leukotrienes and other lipoxygenase products (Piper, P. J., ed.). Wiley, Chichester, pp. 152-160.
4. Ford-Hutchinson, A. W., Rackham, A., Zamboni, R., Rokach, J., Roy, S. (1983) Comparative biological activities of synthetic leukotriene B<sub>4</sub> and its ω-oxidation products. *Prostaglandins* 25, 29-37.
5. Cattabeni, F., Borghi, C., Folco, G. C., Nicosia, S., Spagnuolo, C. (1979) RIA of PGF<sub>2α</sub> and PGE<sub>2</sub> in biological samples of different origin: comparison with the mass fragmentographic technique. In: Radioimmunoassay of drugs and hormones in cardiovascular medicine (Albertini, A., DaPrada, M., Peskar, B. A., eds.). Elsevier, Amsterdam, pp. 281-289.
6. Lange, K., Sirmmet, T., Peskar, B. M., Peskar, B. A. (1985) Determination of 15-keto-13,14-dihydro-prostaglandin E<sub>2</sub> and prostaglandin D<sub>2</sub> in human colonic tissue using a chemiluminescence enzyme immunoassay with catalase as labelling enzyme. *Adv. Prostaglandin Thromboxane Leukotriene Res.* 15, 35-38.
7. Goodfriend, T. L., Levine, L., Fasman, G. D. (1964) Antibodies to bradykinin and angiotensin: a use of carbodiimides in immunology. *Science* 144, 1344-1346.
8. Aehringhaus, U., Wöbling, R. H., König, W., Patrono, C., Peskar, B. M., Peskar, B. A. (1982) Release of leukotriene C<sub>4</sub> from human polymorphonuclear leukocytes as determined by radioimmunoassays. *FEBS Letters* 146, 111-114.
9. Yalow, R. S. (1973) Radioimmunoassay. Practices and pitfalls. *Circ. Res. [Suppl. 1]* 32/33, 1/116-1/128.
10. Yalow, R. S. (1973) Radioimmunoassay methodology: Application to problems of heterogeneity of peptide hormones. *Pharmacol. Rev.* 25, 161-178.
11. Anhut, H., Bernauer, W., Peskar, B. A. (1978) Pharmacological modification of thromboxane and prostaglandin release in cardiac anaphylaxis. *Prostaglandins* 15, 889-900.
12. Ciabattini, G., Pugliese, F., Cinotti, G. A., Patrono, C. (1979) Methodologic problems in the radioimmunoassay of prostaglandin E<sub>2</sub> and F<sub>2α</sub> in human urine. In: Radioimmunoassay of drugs and hormones in cardiovascular medicine (Albertini, A., DaPrada, M., Peskar, B. A., eds.). Elsevier, Amsterdam, pp. 265-280.
13. Lands, W. E. M., Hammarström, S., Parker, C. W. (1976) Limitations of prostaglandin assays. *J. Invest. Dermatol.* 67, 658-660.
14. Hesse, W. H., Rudofsky, G., Peskar, B. A. (1991) Metabolismus von intravenös appliziertem Prostaglandin E<sub>1</sub> bei Patienten mit peripherer arterieller Verschlusskrankheit. *Wien. Klin. Wochenschr.* 103, 554-557.
15. Beaubien, B. C., Tippins, J. R., Morris, H. R. (1984) Leukotriene biosynthesis and metabolism detected by the combined use of HPLC and radioimmunoassay. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 125, 97-104.
16. Levine, L., Alam, I. (1979): Arachidonic acid metabolism by cells in culture: analyses of culture fluids for cyclooxygenase products by radioimmunoassay before and after separation by high pressure liquid chromatography. *Prostaglandins Med.* 3, 295-304.
17. Peskar, B. M., Holland, A., Peskar, B. A. (1974) Quantitative determination of prostaglandins in human gastric juice by radioimmunoassay. *Clin. Chim. Acta* 55, 21-27.
18. Granström, E., Kindahl, H. (1978) Radioimmunoassay of prostaglandins and thromboxanes. *Adv. Prostaglandin Thromboxane Res.* 5, 119-210.
19. Jaffe, B. M., Behrmann, H. R., Parker, C. W. (1973) Radioimmunoassay measurement of prostaglandins E, A and F in human plasma. *J. Clin. Invest.* 52, 398-405.

20. Patrono, C. (1973) Radioimmunoassay of prostaglandin  $F_{2a}$  in unextracted human plasma. *J. Nucl. Biol. Med.* **17**, 25-29.
21. Peskar, B. A., Steffens, C., Peskar, B. M. (1979) Radioimmunoassay of 6-keto-prostaglandin  $F_{1a}$  in biological material. In: Radioimmunoassay of Drugs and Hormones in Cardiovascular Medicine (Albertini, A., DaPrada, M., Peskar, B. A., eds.). Elsevier, Amsterdam, pp. 239-250.
22. Morris, H. G., Sherman, N. A., Shepperdson, F. T. (1981) Variables associated with radioimmunoassay of prostaglandins in plasma. *Prostaglandin* **21**, 771-788.
23. Sinzinger, H., Reiter, S., Peskar, B. A. (1985) Removal, preparation and storage of human plasma for radioimmunological detection of prostaglandins. In: Prostaglandins and Other Eicosanoids in the Cardiovascular System (Schrör, K., ed.). Proc. 2nd Int. Symp. on Prostaglandins, Nürnberg-Fürth 1984, Karger, Basel, pp. 62-67.
24. Peskar, B. M., Seyberth, H. W., Peskar, B. A. (1980): Synthesis and metabolism of endogenous prostaglandins by human gastric mucosa. *Adv. Prostaglandin Thromboxane Res.* **8**, 1511-1514.
25. Peskar, B. M., Peskar, B. A. (1976) On the metabolism of prostaglandins by human gastric fundus mucosa. *Biochim. Biophys. Acta* **424**, 430-438.
26. Waitzmann, M. B., Law, M. L. (1975) Changes in prostaglandin concentration in blood subjected to repetitive freezing and thawing. *Prostaglandins* **10**, 949-957.

## Anschrift des Verfassers:

Dr. Dirk Pallapies  
Ruhr-Universität Bochum  
Abteilung für Pharmakologie und Toxikologie  
Universitätsstraße 150  
4630 Bochum