

VI ZUSAMMENFASSUNG

Michael P. Pieper

Migration und Aggregation Leukotrien B₄-stimulierter Granulozyten und deren pharmakologische Hemmung: zwei funktionelle in vitro Modelle im Vergleich

In der vorliegenden Arbeit wird die Leukotrien B₄ (LTB₄) -induzierte Aktivierung von Granulozyten und deren Hemmung untersucht. Dazu werden vergleichend eosinophile und neutrophile Granulozyten des Menschen und des Meerschweinchens eingesetzt.

Die humanen Granulozyten werden aus peripherem Venenblut isoliert, die Eosinophilen in einer immunomagnetischen Methode von den Neutrophilen getrennt.

Die Gewinnung der Granulozyten des Meerschweinchens erfolgt durch Peritoneal-Lavage nach Provokation mit Casein für neutrophile bzw. Polymyxin B für eosinophile Granulozyten.

Zur Untersuchung der LTB₄-induzierten Aktivierbarkeit dieser Zellen wurden zwei funktionelle in vitro Modelle, die Aggregation und die Migration miteinander verglichen.

Zur weiteren Charakterisierung dieser Modelle wurden Konzentrations-Wirkungskurven mit den literaturbekannten LTB₄-Rezeptorantagonisten Ly 223982, ONO LB 457, SC 41930 und CGS 25019C erstellt und in den Vergleich einbezogen.

Aggregation

LTB₄ induziert konzentrationsabhängig eine Aggregation der neutrophilen Granulozyten des Menschen, sowie der neutrophilen und eosinophilen Granulozyten des Meerschweinchens. Dabei wird die maximale Zellantwort durch Konzentrationen von jeweils 10 nmol/l, 100 nmol/l und 10 nmol/l ausgelöst.

Die Aggregation aller untersuchter Zellarten wurde durch den Einsatz der Rezeptorantagonisten konzentrationsabhängig gehemmt. Bei den Studien mit humanen Neutrophilen betragen dabei die Bereiche der EK₅₀-Werte für die Verbindungen Ly 223982 3-10 µmol/l, für ONO LB 457 1-3 µmol/l, für SC 41930 3-10 µmol/l sowie für CGS 25019C 0,001-0,003 µmol/l. Die Bereiche der EK₅₀ für die Hemmung der Aggregation neutrophiler Granulozyten des Meerschweinchens betragen für Ly 223982 1-3 µmol/l, für ONO LB 457 0,1-0,3 µmol/l, für SC 41930 0,03-0,1 µmol/l sowie für CGS 25019C 0,01-0,03 µmol/l. Die Hemmung der Aggregation eosinophiler Granulozyten des

Meerschweinchens erfolgte mit einem Bereich der EK_{50} von 3-10 $\mu\text{mol/l}$ für Ly 223982, von 0,3-1 $\mu\text{mol/l}$ für ONO LB 457 sowie von 0,1-0,3 $\mu\text{mol/l}$ für SC 41930.

Migration

Zur Messung der LTB_4 -induzierten Migration wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine neue, an Mikrotiterplatten mit 96 Nöpfen angepaßte Chemotaxiskammer entwickelt. Die Migration der Granulozyten erfolgt durch die Poren einer Polycarbonat-Membran in die Nöpfe der Standard-Mikrotiterplatte. Dadurch wurde eine große Kapazität des Assays erreicht sowie eine schnelle und sichere Handhabung. Auf dieser Platte erfolgt der quantitative Nachweis der migrierten Zellen indirekt durch Messung eines Markerenzym. Zur Bestimmung der neutrophilen Granulozyten wird dazu die Myeloperoxidase nachgewiesen, zur Quantifizierung der eosinophilen Granulozyten dient die Eosinophilen Peroxidase.

LTB_4 induzierte konzentrationsabhängig die Migration der eingesetzten Zellarten mit Ausnahme der eosinophilen Granulozyten des Menschen. In den vorliegenden Studien wurde mit LTB_4 -Konzentrationen von 10 nmol/l für humane Neutrophile, von 100 nmol/l für Neutrophile des Meerschweinchens und von 10 nmol/l für Eosinophile des Meerschweinchens maximale migratorische Zellantworten erzielt. Chemotaxis, unstimulierte Migration und Chemokinesis können als Bestandteile dieser Gesamt-Migration getrennt voneinander untersucht werden.

Die ausgelöste Migration wurde konzentrationsabhängig durch die eingesetzten LTB_4 -Rezeptorantagonisten gehemmt. Im einzelnen wurde die Migration humaner neutrophiler Granulozyten mit einem Bereich der EK_{50} von 3-10 $\mu\text{mol/l}$ für Ly 223982, von 0,1-0,3 $\mu\text{mol/l}$ für ONO LB 457 und von 0,3-1 $\mu\text{mol/l}$ für SC 41930 gehemmt. In den Versuchen zur Hemmung der Migration von Neutrophilen des Meerschweinchens betragen die Bereiche der EK_{50} für Ly 223982 3-10 $\mu\text{mol/l}$, für ONO LB 457 1-3 $\mu\text{mol/l}$, sowie 0,03-0,3 $\mu\text{mol/l}$ für SC 41930. Die Bereiche der EK_{50} für die Hemmung der Migration eosinophiler Granulozyten betragen für Ly 223982 1-3 $\mu\text{mol/l}$, für ONO LB 457 0,1-0,3 $\mu\text{mol/l}$, sowie 0,03-0,1 $\mu\text{mol/l}$ für SC 41930.

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten in vitro-Modelle sind zur Messung der LTB_4 -induzierten Aktivierung von Granulozyten, sowie deren Hemmung durch LTB_4 -Rezeptorantagonisten geeignet, wobei sich die neu entwickelte Chemotaxis-Kammer aus funktionellen und technischen Gründen profiliert. Sie ist speziell für ein high capacity screening besonders geeignet.

VII SUMMARY

Michael P. Pieper

Leukotriene B₄-induced migration and aggregation of granulocytes and pharmacological inhibition comparing two functional in vitro assays

The present thesis investigates the Leukotriene B₄ (LTB₄) -induced activation of granulocytes and its inhibition. Eosinophilic and neutrophilic granulocytes of men and guinea pigs were used. Human granulocytes were isolated from peripheral blood, the eosinophils separated using an immunomagnetic method. Granulocytes of guinea pigs were taken from a peritoneal lavage after provocation with casein and polymyxin B for neutrophils and eosinophils, respectively.

To investigate the LTB₄-induced activation of these cells two functional in vitro models, aggregation and migration were compared.

For further characterization of the assays, the dose-response relationship of the published LTB₄-receptor antagonists Ly 223982, ONO LB 457, SC 41930 and CGS 25019C were established and used for comparison.

Aggregation

LTB₄ induces, depending on its concentration, the aggregation of human neutrophils and both, neutrophils and eosinophils of guinea pigs. A maximal cell response was induced using concentrations of 10 nmol/l, 100 nmol/l and 10 nmol/l, respectively.

The aggregation of all cells used were inhibited by receptor antagonists in a concentration-dependent manner.

In the studies using human neutrophils, the range of IC₅₀-values of the antagonists were as follows: Ly 223982 3-10 µmol/l, ONO LB 457 1-3 µmol/l, SC 41930 3-10 µmol/l, and CGS 25019C 0,001-0,003 µmol/l. The inhibition of aggregation with neutrophils of guinea pigs revealed ranges of IC₅₀-values of 1-3 µmol/l, 0,1-0,3 µmol/l, 0,03-0,1 µmol/l or 0,01-0,03 µmol/l using Ly 223982, ONO LB 457, SC 41930 and CGS 25019C, respectively. The IC₅₀ ranges of the inhibition of aggregation using eosinophils of guinea pigs were as follows: Ly 223982 3-10 µmol/l, ONO LB 457 0,3-1 µmol/l, SC 41930 0,1-0,3 µmol/l.

Migration

A new chemotaxis chamber adapted to a 96 well micro plate was developed for measuring the LTB₄-induced migration.

Cells migrate through the pores of a polycarbonate membrane into the wells of the micro plate. Thereby a high capacity and a safe and quick handling was achieved.

On this micro plate the migrated cells were quantified indirectly using an assay detecting marker enzymes.

Myeloperoxidase and eosinophil peroxidase were used for measuring the migration of neutrophils and eosinophils, respectively.

Dependent on its concentration, LTB₄ induces the migration of all cells tested with the exception of human eosinophils.

In the present study, a maximal cell response was shown by LTB₄ concentrations of 10 nmol/l using human neutrophils, 100 nmol/l using neutrophils of guinea pigs, and 10 nmol/l using eosinophils of the latter species.

Chemotaxis, random migration and chemokinesis could be separated from each other as parts of the total migration.

The migration of all cells tested were inhibited by the LTB₄ antagonists.

In the studies using human neutrophils, the ranges of IC₅₀-values of the antagonists were as follows: Ly 223982 3-10 µmol/l, ONO LB 457 0,1-0,3 µmol/l and SC 41930 0,3-1 µmol/l. The inhibition of migration with neutrophils of guinea pigs revealed ranges of IC₅₀-values of 3-10 µmol/l, 1-3 µmol/l or 0,03-0,3 µmol/l using Ly 223982, ONO LB₄57 and SC 41930, respectively. The IC₅₀ ranges of the inhibition of migration using eosinophils of guinea pigs were as follows: Ly 223982 1-3 µmol/l, ONO LB 457 0,1-0,3 µmol/l, SC 41930 0,03-0,1 µmol/l.

The two in vitro models used in this study, are valuable for measuring the LTB₄-induced activation of granulocytes and their inhibition by LTB₄-receptor antagonists. The new developed chemotaxis chamber profiles by functional and technical advantages. It is especially useful to establish a high capacity screening.