

## **Die Wirkung der Influenza-Virus-Infektion auf die Arachidonsäure-Kaskade von Mäusethrombozyten**

**Albert Antal<sup>1</sup>, Árpád Gecse<sup>2</sup>, László Mojzes<sup>1</sup>, und Vilmos Földes<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Gerichtsmedizinisches Institut der Medizinischen Universität Szeged,  
Kossuth Lajos sugárút 40, H-6724 Szeged

<sup>2</sup>Institut für Pathophysiologie der Medizinischen Universität,  
Kossuth Lajos sugárút 40, H-6724 Szeged

### **The Effect of Influenza Virus Infection on the Arachidonic Acid Cascade in Mouse Platelets**

**Summary.** Prostaglandins (PGs) are essential for many physiological and pathological processes. As they are not stored in tissue, their presence and actions therefore result from de novo synthesis and release. Although platelets themselves appear to have the ability to synthesize TxA<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub>, arachidonic acid may also be metabolized in the lipoxygenase pathway in platelets, producing 12-hydroperoxy/12-hydroxy-5,8,10,14-eicosatetraenoic acid (12-HPETE/12-HETE). CFLP mice were infected intranasally with A/H<sub>3</sub>N<sub>2</sub>/Hong Kong (1/68) influenza virus. Platelets were isolated from the control (saline treated) and infected mice 3–13 days after virus application. Platelets were isolated from the diluted arterial blood of the mice. Metabolites of arachidonate cascade were determined using 1-<sup>14</sup>C-arachidonic acid (2035 MBq/mM spec. act.) as substrate. All incubations were carried out in TC Medium 199 (pH 7.4) at 37°C for 10 min. Radiolabelled products were separated and quantitatively determined. The synthesis of TxA<sub>2</sub> in the platelets of animals was found to be significantly increased 7 days after the virus infection. The 12-hydroxy-heptadecatrienoic acid level was higher on the 10th and 13th days of infection, as were the products of the lipoxygenase pathway.

**Key words:** Influenza virus infection, arachidonate cascade – Metabolites of arachidonate cascade

**Zusammenfassung:** Die Produkte der Arachidonsäurekaskade spielen in zahlreichen physiologischen und pathophysiologischen Prozessen eine

grundlegende Rolle, sie werden in keinem einzigen Gewebe gespeichert, daher sind ihre Anwesenheit und ihre Wirkungen stets das Ergebnis einer de novo-Synthese und -Freisetzung.

Die Arachidonsäurekaskade der Thrombozyten beinhaltet die auf dem Lipoxygenase- und Zyklooxygenasewege zustandekommenden Stoffwechselprozesse. CFLP-Mäuse wurden intranasal mit dem A/H<sub>3</sub>N<sub>2</sub>-Hong-Kong-Influenzavirus (1/68) infiziert und in der infizierten und der Kontrollgruppe die Thrombozyten vom 3.–13. Tage nach der Infektion aus dem arteriellen Blut der Mäuse separiert.

Der Metabolismus der Arachidonsäurekaskade wurde bei Verwendung von C<sup>14</sup>-Arachidonsäure-Substrat untersucht. Die Markierung und die Inkubation erfolgte im TC-Medium 199 (pH 7.4) 10 min bei 37°C. Die radioaktiven Produkte wurden separiert und quantitativ bestimmt. In den Thrombozyten der virusinfizierten Tiere zeigte die TxA<sub>2</sub>-Synthese vom 5. Tage an eine signifikante Abweichung. Am 10.–13. Tage nach der Infektion war der 12-HHT-Spiegel erhöht und in dieser Periode stiegen auch die Produkte des Lipoxygenase-Weges.

**Schlüsselwörter:** Influenza-Infektion – Arachidonsäurekaskade, Metabolismus

Die Produkte der Arachidonsäurekaskade spielen in zahlreichen physiologischen und pathophysiologischen Prozessen eine grundlegende Rolle. Die Produkte werden in keinem einzigen Gewebe abgelagert. So ist ihre Anwesenheit, ihre Wirkung stets das Ergebnis einer de novo-Synthese und Freisetzung [1].

Der Präkursor Arachidonsäure wird auf die Wirkung von Phospholipase A<sub>2</sub>, Phospholipase A<sub>1</sub> und Phospholipase C aus Zellmembran-Phospholipoiden freigesetzt. Der Weg der Zyklooxygenase und Lipoxygenase der Arachidonsäurekaskade ist in vielen Zellsystemen – inklusive auch die Thrombozyten – bekannt. Die zyklischen Endoperoxyde (Prostaglandin G<sub>2</sub>, Prostaglandin H<sub>2</sub>) werden auf den Einfluß der Enzyme Zyklooxygenase und Peroxydase freigesetzt. Das PGH<sub>2</sub> ist das gemeinsame Substrat der Thromboxan-Synthetase, sowie der PG-Isomerase und -Reduktase. Auf dem anderen Wege der Arachidonsäurekaskade, in den Thrombozyten, wird 12-Hydroxy- bzw. 12-Hydroperoxy-eicosatetraensäure freigesetzt (12-HPETE, 12-HETE [2, 3]).

Die Produkte der Arachidonsäurekaskade erfüllen eine wichtige interzelluläre messenger-Funktion. Die Wirkungen der verschiedenen zyklischen Lipide sind mitunter ähnlich; so bewirken Prostaglandin D<sub>2</sub> und Prostaglandin E<sub>2</sub>, die in kleinen Mengen auch aus Thrombozyten frei werden, Vasodilatation, hemmen die Thrombozytenaggregation und erhöhen den zyklischen AMP-Spiegel. Das Thromboxan A<sub>2</sub> (TxA<sub>2</sub>) und das Prostaglandin F<sub>2</sub>-alpha haben eine grundlegende Wirkung bei mehreren pathologischen Prozessen, indem sie Vasokonstriktion, Thrombozytenaggregation u.a.m. hervorrufen. Die auf dem Wege der Lipoxygenase freigesetzten Produkte (HEPETEn und HETEn) sind

Vasokonstriktoren, bewirken Thrombozytenaggregation und verfügen über eine chemotaktische Wirkung [4, 5, 6].

All dies besagt, daß 1. eine entsprechende Konklusion nur dann abgeleitet werden kann, wenn eine ganze Reihe von Metaboliten der Arachidonsäurekaskade auf einmal bestimmt wird; 2. können ein oder mehrere Komponenten im physiologischen Gleichgewichtszustand eine Störung hervorrufen und damit einen pathologischen Zustand herbeiführen.

Der nach einer manchmal fulminant verlaufenen Virusinfektion eingetretene plötzliche Tod kann in der gerichtsmedizinischen Praxis zahlreiche Schwierigkeiten aufwerfen. Die Häufigkeit von plötzlichem Tod nach Virusinfektionen bewegt sich zwischen 0,8 und 3%. Auf dem Boden der Virusinfektion gelangen Veränderungen zur Entstehung, welche an die Möglichkeit einer Schädigung des Blutgerinnungssystems denken lassen; denn im Hintergrund der beobachteten (histologisch beweisbaren) Thrombosen, des DIC-artigen Zustandes und der Diapedesis- und Rhaxis-Blutungen war ein anderweitiger Krankheitsprozess nicht auffindbar. Viele hämatologische Mechanismen sind eng mit der Lunge verbunden, so ist es leicht verständlich, daß auch in Verbindung mit Virusinfektionen Proaggregatorsubstanz (z. B.  $\text{TxA}_2$ ) freigesetzt wird, die möglicherweise für das umrissene pathologische Geschehen verantwortlich ist.

In den vorliegenden Untersuchungen trachteten wir eine Antwort auf die Frage zu erhalten, welchen Weg die Zyklooxygenase und Lipoxygenase der Arachidonsäurekaskade in den Thrombozyten virusinfizierter Mäuse in verschiedenen Intervallen nach der Infektion nehmen.

## Material und Methode

Die Arachidonsäure (grade 1) bezogen wir von der Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri und die 1- $^{14}\text{C}$ -Arachidonsäure (55 mCi/mM) von der Fa. Amershem, England. Das TC-Medium 199 ist ein Produkt des DIFCO-Laboratoriums, Detroit, Michigan. Die Silika-Gel-G-Dünnschichtplatten (0,25 mm) stammen von der Fa. Merck, Darmstadt, BRD.  $\text{PGE}_2$ ,  $\text{PGD}_2$ ,  $\text{TxA}_2$ ,  $\text{PGF}_2$ -alpha und 6-Oxo-PGF $_1$ -alpha waren ein Geschenk von Dr. J. E. Pike von der Fa. Upjohn, Kalamazoo, Michigan. Anderweitige chemische Substanzen waren analytisch rein, von entsprechenden Stellen besorgt, sie sind nicht besonders angeführt.

Versuchstiere waren männliche CFLP-Mäuse von 15–18 g Gewicht. Es wurden intranasal mit dem A( $\text{H}_3\text{N}_2$ )-Hong Kong (1/68) Influenzavirus 50 Mäuse mit 5–10  $\times$   $\text{LD}_{50}$  in leichter Aetheranaesthetie infiziert; die Kontrolltiere erhielten auf die gleiche Weise 10  $\mu\text{l}$  Phosphatpuffer zusammen mit Kochsalzlösung verabreicht.

Die Blutproben wurden bei den Kontrollen wie auch bei den infizierten Tieren in leichter Aetheranaesthetie am 3., 4., 5., 7., 10. und 13. Tage nach der Behandlung durch die abdominale Aorta entnommen. Das Blut wurde mit Phosphatpuffer, der 5,8 mM EDTA und 1 mg/ml Glukose enthielt, verdünnt. Das Sammeln des thrombozytenreichen Plasmas geschah nach 10 min langem Zentrifugieren des Vollblutes mit 200 g bei Raumtemperatur. Die Thrombozyten wurden nach 10-minütigem Zentrifugieren bei 200 g sedimentiert, die roten Blutkörperchen mit hypotomischem Ammoniumchlorid entfernt, die Thrombozyten erneut mit Phosphatpuffer gewaschen und in TC-Medium 199 resuspendiert.

Die Thrombozyten wurden bei 37°C 5 min vorinkubiert und dann die Enzymreaktion durch Zugabe von C 1/1-Arachidonsäure im Inkubationsmedium, dessen Endvolumen 1 ml betrug, gestartet. Die Proben wurden 10 min bei 37°C inkubiert. Die Enzymreaktion wurde teils durch Kaltstellen und teils durch Herabsetzen des pH auf 3,0 ausgelöst, letzteres erfolgte

mit Ameisensäure. Die angesäuerten Proben wurden nun zweimal mit 3 Volumen Äthylazetat extrahiert, die organischen Phasen gesammelt und unter Stickstoff evaporiert. Die Residuen wurden in Äthylazetat aufgenommen und quantitativ auf Silikagel-G-Objektträgerplatten geträufelt. Die Entwicklung der Platten geschah mittels Überdruck-Chromatographie in der organischen Phase eines Äthylazetat:Essigsäure:Trimethylpentan:Wasser (110:20:30:100) Gemisches. Jeder 3 bzw. 5 mm-Streifen wurde vom Chromatogramm herabgenommen und dessen Radioaktivität in einem Beckman LS 1800-Flüssigkeits-Szintillationszähler bestimmt. Die radioaktiven Produkte wurden identifiziert, die nichtradioaktiven authentischen Standarden, die mit Anisaldehyd-Reagens [7] entwickelt wurden.

Die Menge der freigesetzten Arachidonsäuremetabolite ist in Prozent der Total-DPM ausgedrückt, die sowohl die Zyklogenase- wie auch die Lipoxygenase-Produkte enthält.

Die high-performance liquid-Chromatographie mit umgekehrter Phase (HPLC) erfolgte an einer (4,6 × 250 mm) LiChrosorb<sup>R</sup> C<sub>18</sub>-Säule (7 µm Partikel). Das Solvens, das zur Detektion des 12-HETE diente, war ein Methanol: Wassergemisch (75:25) mit 0.01% Essigsäuregehalt, das mit Ammoniumhydroxyd auf pH 5.6 eingestellt worden war. Die HETE-Messung erfolgte bei 235 nm mittels UV-Detektor, einem Gerät der Fa. Labor MIM 308. Die statistischen Analysen wurden anhand der *t*-Probe von Student durchgeführt.

## Ergebnisse

Die Thromboxan B<sub>2</sub>-(TxB<sub>2</sub>) Bildung war am 4. Tage in den virusinfizierten Thrombozyten signifikant höher. Es bestand kein Dosisunterschied, wenn 5 × LD<sub>50</sub> oder 10 × LD<sub>50</sub> angewandt wurde. Das 12-HHT stieg parallel mit der Thromboxan B<sub>2</sub>-Bildung, während die Virusinfektion den Lipoxygenaseweg nicht signifikant beeinflusste (Tabelle 1).

Am 5. Tage der Virusinfektion war eine signifikante Veränderung weder in irgendeinem der bestimmten Arachidonsäurekaskadenparameter, noch in den Thrombozyten feststellbar.

Am 7. Tage der Virusinfektion war die Thromboxan B<sub>2</sub>-Synthese in den Thrombozyten wiederum höher, die 12-HHT-Bildung aber signifikant verringert und die Menge der auf dem Lipoxygenase-Weg entstandenen Produkte unverändert.

**Tabelle 1.** Die Wirkung der Virusinfektion auf die Arachidonsäurekaskade der Thrombozyten der infizierten Mäuse am 4. Tage der Infektion

Metabolite	Kontrollen	5 × LD <sub>50</sub>	10 × LD <sub>50</sub>
TxB <sub>2</sub>	10.84 ± 1.12	21.53 ± 2.83 <sup>a</sup>	22.61 ± 2.14 <sup>a</sup>
12-HHT	4.83 ± 0.98	9.24 ± 1.47 <sup>a</sup>	11.43 ± 1.76 <sup>a</sup>
12-HPETE	15.88 ± 2.03	19.24 ± 2.13	18.12 ± 1.97
12-HETE			

<sup>a</sup> (*P* < 0.05)

Die angeführten Werte geben die prozentuelle Verteilung der einzelnen Arachidonsäurekaskaden-Metabolite an. Jede Gruppe enthielt 10 Tiere; es wurden die Mittelwerte ± S. E. registriert.

**Tabelle 2.** Die Wirkung der Virusinfektion auf die Arachidonsäurekaskade der Thrombozyten am 7. Tage der Infektion

Metabolite	Kontrollen	5 × LD <sub>50</sub>	10 × LD <sub>50</sub>
TxB <sub>2</sub>	10.84 ± 1.12	14.46 ± 0.86 <sup>a</sup>	15.51 ± 1.07 <sup>a</sup>
12-HHT	4.83 ± 0.98	2.10 ± 0.37 <sup>a</sup>	2.87 ± 0.88 <sup>a</sup>
12-HPETE	15.88 ± 2.03	14.24 ± 1.09	13.88 ± 1.45
12-HETE			

<sup>a</sup> ( $P < 0.05$ )

Die angeführten Werte repräsentieren die prozentuelle Verteilung der einzelnen Arachidonsäurekaskaden-Metabolite. Jede Gruppe enthielt 10 Tiere. Es wurden die Mittelwerte ± S. E. registriert.

Eine steigende Tendenz der Thromboxan B<sub>2</sub>-Bildung war bei den virusinfizierten Mäusen am 10. Tage zu beobachten. Die Menge der auf dem Wege der Zyklooxygenase entstehenden 12-HHT, wie auch der auf dem Lipoxygenase-Wege freiwerdenden Metabolite war signifikant erhöht. Der Lipoxygenase-Weg dominierte in der Kaskade. Eine Dosis-abhängige Wirkung war in allen untersuchten Parametern festzustellen; denn Steigerung der intranasalen Viruskonzentration hatte auch eine gesteigerte Wirkung zur Folge (Tabelle 3).

**Tabelle 3.** Die Wirkung der Virusinfektion auf die Arachidonsäurekaskade der infizierten Mäuse am 10. Tage der Infektion

Metabolite	Kontrollen	5 × LD <sub>50</sub>	10 × LD <sub>50</sub>
TxB <sub>2</sub>	10.84 ± 1.12	13.06 ± 1.94	16.28 ± 1.63 <sup>a</sup>
12-HHT	4.83 ± 0.98	10.16 ± 1.43 <sup>a</sup>	12.32 ± 2.01 <sup>a</sup>
12-HPETE	15.88 ± 2.03	26.54 ± 2.14 <sup>a</sup>	29.06 ± 2.22 <sup>a</sup>
12-HETE			

<sup>a</sup> ( $P < 0.05$ )

Die angeführten Werte zeigen die prozentuelle Verteilung zwischen den einzelnen Arachidonsäurekaskade-Metaboliten. Jede Gruppe enthielt 10 Tiere. Registriert wurden die Mittelwerte ± S. E. Am 13. Tage nach der Virusinfektion war eine entgegengesetzte Veränderung auf dem Zyklooxygenase- und dem Lipoxygenasewege zu beobachten. Die Thromboxansynthese war signifikant verringert, während die 12-HPETE- und 12-HETE-Bildung wesentlich höher war als bei den Kontrollen (Tabelle 4).

**Tabelle 4.** Die Arachidonsäurekaskade der Thrombozyten bei virusinfizierten Mäusen am 13. Tage

Metabolite	Kontrollen	5 = LD <sub>50</sub>	10 × LD <sub>50</sub>
TxB <sub>2</sub>	10.84 ± 1.12	6.32 ± 1.43 <sup>a</sup>	5.26 ± 2.13 <sup>a</sup>
12 HHT	4.83 ± 0.98	6.71 ± 197	11.53 ± 2.23 <sup>a</sup>
12-HPETE	15.88 ± 2.03	23.73 ± 2.15 <sup>a</sup>	22.99 ± 1.92 <sup>a</sup>
12-HETE			

<sup>a</sup> ( $P < 0.05$ )

Die angeführten Werte zeigen die prozentuelle Verteilung zwischen den einzelnen Arachidonsäurekaskade-Metaboliten. Jede Gruppe enthielt 10 Tiere. Registriert wurden die Mittelwerte  $\pm$  S. E.

## Diskussion

Sowohl der Zyklusoxigenase- wie auch der Lipoxygenaseweg erfuhren bei virusinfizierten männlichen CFLP-Mäusen eine Modifizierung. Anfangs war ein hochgradiger Anstieg der Thromboxan-Synthetisierungskapazität am 4. Tage der Virusinfektion zu beobachten. Der Lipoxygenaseweg war dann nicht modifiziert. Es ist schwer zu erklären, weshalb die Metabolite der Arachidonsäurekaskade am 5. Tage der Virusinfektion sich auf der Kontrollebene befanden.

Die Thromboxan B<sub>2</sub>-Synthese war am 7. wie auch am 10. Tage nach der Virusinfektion bedeutend erhöht. Ein Parallelismus bestand in Verbindung mit der 12-HHT-Bildung. Das erste Zeichen des erhöhten Lipoxygenasespiegels beobachteten wir am 10. Tage der Virusinfektion. Die erhöhte 12-HPETE- und 12-HETE-Bildung dauerte während der ganzen Versuchsperiode an, also bis zum 13. Tage nach der Infektion. Die im Zyklusoxigenaseweg der Arachidonsäurekaskade beobachteten Veränderungen dürften möglicherweise für die bei Virusinfektionen häufig anzutreffenden hämorrhagischen und thromboembolischen entzündlichen Symptome verantwortlich zu machen sein.

## Literatur

1. Samuelsson B, Goldyne M, Granström E, Hamberg M, Hammarström S, Malsten C (1978) Prostaglandins and thromboxanes. *Annu Rev Biochem* 47:997–1029
2. Lands WE (1979) The biosynthesis and metabolism of prostaglandins. *Annu Rev Physiol* 41:633–652
3. Hamberg M, Samuelsson B (1974) Prostaglandin endoperoxides. Novel transformation of arachidonic acid in human platelets. *Proc Natl Acad Sci USA* 71:3400–3403
4. Harris RH, Ramwell PW, Gilmer PJ (1979) Cellular mechanism of prostaglandin action. *Annu Rev Physiol* 41:653–668
5. Walsh CE, Dechatelet LR, Chilton FH, Wykle RL, Waite M (1983) Mechanism of arachidonic acid release in human polymorphonuclear leukocytes. *Biochim Biophys Acta* 750:32–40
6. Higgs GA (1984) The effects of lipoxygenase inhibitors in anaphylactic and inflammatory responses in vivo. *Prostaglandins Leukotrienes Med* 13:89–92
7. Kiefer CA, Johnson CR, Arora KL (1975) Colorimetric identification of prostaglandins in subnanomole amount *Anal Biochem* 68:336–340

Eingegangen am 26.2.1986