

**Aus dem Institut für Lasermedizin
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Prof. Dr. R. Bayer**

**Entwicklung und Anwendung eines Miniphotometers zur Messung
der Lipidperoxidation im Plasma mittels der FOX-Methode**

Dissertation

**zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf**

vorgelegt von

Tim Lange

2004

**Als Inauguraldissertation gedruckt mit der Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf**

Gez.: Univ.-Prof Dr. med. dent. Wolfgang H.-M- Raab

Dekan

Referent: Univ.-Prof. Dr. Bayer

Korreferent: Prof. Dr. Cleveland

in Erinnerung an meinen Vater

1	Einleitung	1
1.1	Oxidativer Stress.....	1
1.1.1	Entstehung von Radikalen und antioxidative Mechanismen	1
1.1.2	Lipidperoxidation	5
1.1.3	Messung von Oxidativem Stress und der Lipidperoxidation.....	6
1.2	Problemstellung	8
2	Materialien und Methoden.....	9
2.1	Chemikalien	9
2.2	Geräte	9
2.3	Ferrous Oxidation using Xylenol Orange (FOX-Test)	10
2.3.1	Herstellung des FOX-Reagenz	13
2.3.2	Anwendung der FOX-Methode	13
2.4	Validierung des Miniphotometers	16
3	Ergebnisse.....	17
3.1	Entwicklung eines Miniphotometers	17
3.1.1	Grundlagen der Photometrie	17
3.1.2	Photometer und Spektrometer	19
3.1.3	Miniphotometer	21
3.2	Anwendung der FOX-Methode	25
3.2.1	Herstellerunterschiede des Xylenol Orange	25
3.2.2	Kinetik (Zeit-Wirkungsbeziehung)	27
3.2.3	Extinktionskoeffizienten.....	28
3.2.4	Störfaktoren	30
3.2.5	Triphenylphosphat (TPP)	32
3.2.6	Lipidperoxidation im Plasma gesunder Probanden	36
3.2.7	Validierung des Miniphotometers	37
4	Diskussion.....	38
5	Zusammenfassung	42
6	Literaturverzeichnis	43
7	Danksagung	47

1 EINLEITUNG

1.1 Oxidativer Stress

Der Umgang mit Sauerstoff als wichtiger Bestandteil der biologischen Energieversorgung beinhaltet einige wesentliche Gefahren. Die enorme Reaktionsfreude des Sauerstoffs und vor allem seiner Radikale kann nahezu alle im Organismus vorkommenden Verbindungen oxidativ verändern und in ihrer Funktion beeinträchtigen [Sies, 1991; Slater, 1984]. Die Rolle von oxidativem Stress in der Genese diverser Erkrankungen ist somit von hoher Bedeutung. Reaktive Sauerstoffspezies sind allerdings nicht nur unerwünschte Reaktionsprodukte, sondern erfüllen wichtige biologische Funktionen und sind für bestimmte körperliche Funktionen wie z.B. die Immunabwehr essentiell.

Oxidativer Stress ist definiert als eine Imbalance zwischen Oxidantien (freie Radikale und andere reaktive Verbindungen) und Antioxidantien mit einer Zunahme ersterer [Halliwell, 1997]. Dieses Phänomen kann durch Zerstörung oder Inaktivierung endogener Antioxidantien, ernährungs-bedingtem Mangel an Antioxidantien oder durch erhöhte Formation freier Radikale und reaktiver Verbindungen ausgelöst werden.

Eine Vielzahl von Herz-Kreislauf- und Tumorerkrankungen werden im Verlauf ihrer Pathogenese durch erhöhten oxidativen Stress begleitet [Diplock *et al*, 1998]. Außerdem ist oxidativer Stress erheblich am Alterungsprozess und der Degeneration von Zellen und Gewebe beteiligt [Sastre *et al*, 2000].

1.1.1 Entstehung von Radikalen und antioxidative Mechanismen

Befindet sich im Orbital eines Atoms ein ungepaartes Elektron, so spricht man von einem Radikal. Radikale können mit anderen Molekülen auf verschiedene Weise reagieren, indem sie z.B. Atome entreißen, oder sich an Nichtradikale addieren. Dadurch entstehen neue Radikale, welche im Sinne einer Kettenreaktion weiter reagieren [Halliwell, Gutteridge, 1989]. Treffen zwei Radikale aufeinander, bilden die beiden freien Elektronen in der Regel eine kovalente Bindung.

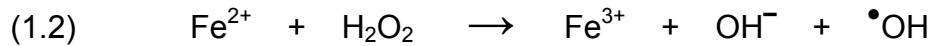
Reaktive Sauerstoffspezies(ROS)		Eigenschaften
Superoxidradikal	$O_2^{\bullet-}$	Entstehung bei Autooxidationsreaktionen.
Hydroxylradikal	$OH^{\bullet}$	Entstehung häufig metallkatalysiert, hochreaktiv, geringe Diffusionsfähigkeit.
Perhydroxylradikal	$HO_2^{\bullet}$	Protonierte, fettlöslichere Form von $O_2^{\bullet-}$. Initiator der Lipidperoxidation.
Alkoxyradikal	$RO^{\bullet}$	Entstehung bei Lipidperoxidation. Reaktivität zwischen $OH^{\bullet}$ und $ROO^{\bullet}$.
Peroxyradikal	$ROO^{\bullet}$	Entstehung bei Lipidperoxidation, niedrige Oxidationsfähigkeit, aber hohe Diffusionsfähigkeit.
Hydroperoxid	$ROOH$	Entstehung bei Lipidperoxidation, Protonierte Form von $ROO^{\bullet}$.
Wasserstoffperoxid	H_2O_2	Entstehung enzymatisch, Reaktionen mit organischen Substraten sind träge, hohe Diffusionsfähigkeit.
Singulett-Sauerstoff	1O_2	starkes Oxidationsmittel.

Tabelle 1.1: Übersicht Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) [Ross und Moldeus, 1991]

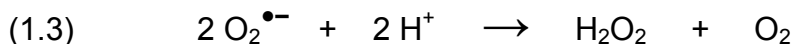
Das hochreaktive Hydroxylradikal ($OH^{\bullet}$) ist in der Lage nahezu alle biologischen Moleküle anzugreifen und Kettenreaktionen auszulösen. Die Bildung dieses Radikals kann durch die Reaktion von Übergangselementen mit Wasserstoffperoxid (s.u.) erfolgen, oder auch durch homolytische Spaltung von H_2O durch ionisierende Strahlung [Von Sonntag, 1987]. Ursprünglich wurde die Bildung von Hydroxylradikalen auf die sogenannte *Haber-Weiss-Reaktion* zurückgeführt:



Diese Reaktion ist allerdings bei einem pH von 7 kinetisch gehemmt, und spielt daher in biologischen Systemen eine untergeordnete Rolle [Czapski *et al.*, 1978]. Katalysiert durch Eisenionen bildet sich aus Wasserstoffperoxid über die *Fenton-Reaktion* ein Hydroxylradikal [Halliwell, Gutteridge, 1984]:



Auch das Superoxidradikal ($\text{O}_2^{\bullet-}$) und Wasserstoffperoxid (H_2O_2) sind in der Lage, in hohen Konzentrationen Zellschädigungen zu verursachen obwohl sie wesentlich weniger reaktiv sind als das Hydroxylradikal. Das Superoxidradikal entsteht im Organismus zum großen Teil im Rahmen der Atmungskette und zu einem geringen Teil durch das Cytochrom P-450 System. Ausserdem generieren aktivierte Phagozyten im Rahmen des sogenannten *Respiratory Burst* mit Hilfe des Enzyms NADPH-Oxidase das Radikal um es als Bakterizid einzusetzen [Gabig *et al.*, 1979]. Bei der spontanen Disproportionierung von Superoxid entstehen Sauerstoff und Wasserstoffperoxid:



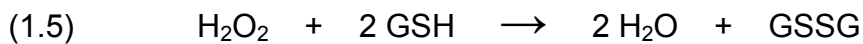
Die Kinetik dieser Reaktion wird durch das Enzym Superoxid-Dismutase (SOD) erheblich gesteigert.

Wasserstoffperoxid (H_2O_2) ist kein Radikal, zählt aber aufgrund seiner Reaktionsfreude zu den sog. ROS (Reactive Oxygen Species). Es permeiert leicht durch Membranen, und ist in der Lage in hohen Konzentrationen das Glykolyseenzym Glyzerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase zu inaktivieren [Hyslop, 1988]. Wie bereits oben beschrieben, ist H_2O_2 ein signifikanter Faktor bei der Bildung von Hydroxylradikalen. Aus diesem Grund ist es wichtig das der Organismus die Konzentration von Wasserstoffperoxid kontrollieren kann. Das Enzym Katalase eliminiert Wasserstoffperoxid durch die Umwandlung zu Wasser und Sauerstoff [Kappus, Sies 1981]:



Die selenhaltige Glutathionperoxidase (GPx) bietet ebenfalls Schutz vor Wasserstoffperoxid. Das Enzym reduziert unter Verbrauch des Tripeptids Glutathion (GSH) Wasserstoffperoxid zu Wasser. Dabei entsteht Gluta-

thiondisulfid (GSSG) welches anschließend durch die NADPH-abhängige Glutathionreduktase (GR) zu Glutathion reduziert wird [Biesalski, 2000]:



Weitere wichtige Radikale sind die reaktiven Stickstoffspezies Stickstoffmonoxid und Peroxynitrit. Stickstoffmonoxid ($\text{NO}^\bullet$) ist ein gasförmiges Radikal das in vivo von NO-Synthasen gebildet wird. Es erfüllt eine Reihe von Aufgaben im Rahmen der Immunabwehr und als Signalmolekül bei der Regulation des Gefäßtonus. Reagiert Stickstoffmonoxid mit dem Superoxidradikal, entsteht Peroxynitrit (ONOO^-). Peroxynitrit reagiert mit einer Vielzahl von Biomolekülen und ist ein Initiator der Lipidperoxidation (s.u.).

Da Radikale und andere reaktive Sauerstoffverbindungen kontinuierlich in vivo produziert werden, hat der Organismus im Laufe der Evolution verschiedene Schutz- und Reparaturmechanismen entwickelt. Die bereits oben erwähnten Enzyme Superoxiddismutase, Katalase und Peroxidase sind wichtige Beispiele für endogene Schutzmechanismen. Die Zelle ist aber auch auf exogene Antioxidantien angewiesen. Hier spielen besonders lipidlösliche Vitamine wie Vitamin E und Carotenoide, das wasserlösliche Vitamin C und sekundäre Pflanzenstoffe wie Flavonoide eine Rolle.

Vitamin E (α -Tocopherol) ist ein Inhibitor der Lipidperoxidation und stellt anscheinend einen der wichtigsten antioxidativen Schutzfaktoren für Membranen und Lipoproteine dar [Burton et al, 1982; Halliwell, 1994]. Der Abbruch der radikalischen Kettenreaktion ist der Hauptwirkungsmechanismus. Dabei gibt Vitamin E ein Wasserstoffatom an das Radikal ab und wird in Folge selber zum Radikal [Diplock, 1985; Burton, Ingold, 1989]. Vitamin C hat neben immunmodulatorischen Funktionen die Aufgabe „verbrauchtes“ Vitamin E zu regenerieren [Halliwell, 1990]. Die antioxidativen Eigenschaften der Carotinoide und Flavonoide sind Gegenstand aktueller Forschung und in ihrem Mechanismus noch nicht eindeutig geklärt.

1.1.2 Lipidperoxidation

Bereits zur Zeit der Französischen Revolution beschäftigte sich Lavoisier mit der Oxidation von Fetten bei niedrigen Temperaturen. Die Tatsache, dass Fette bei langer Lagerung „ranzig“ werden, erregte schon im Mittelalter Aufmerksamkeit und wurde sogar im Rahmen der Ölfarbenproduktion ausgenutzt. Heute spielt die Lipidperoxidation besonders in der Lebensmittelindustrie eine Rolle. In biologischen Systemen besteht eine Verbindung zu zahlreichen pathologischen Prozessen wie z.B. Arteriosklerose und neurodegenerativen Erkrankungen [Steinberg, 1997; Halliwell, Gutteridge, 1989]. Die Lipidperoxidation gehört zu den meist untersuchten Phänomenen in der Oxidativen Stressforschung.

Lipidperoxidation beginnt mit dem Angriff einer Fettsäure oder einer Fettsäuren-Seitenkette durch ein Molekül das reaktiv genug ist, um ein Wasserstoff Atom abzuspalten (siehe Abbildung 1.1; 1.). Je mehr Doppelbindungen in einer Fettsäure vorhanden sind, desto leichter ist es ein Wasserstoff Atom zu extrahieren. Aus diesem Grund werden ungesättigte Fettsäuren eher oxidiert als gesättigte [Wagner et al., 1994]. Nach der Entfernung des Wasserstoff Atoms bleibt ein ungepaartes Elektron an dem Kohlenstoff der Fettsäure zurück. Ein Lipidradikal (2) ist entstanden. Dieses Radikal wird durch eine cis-trans-Isomerisierung, der sogenannten *Dien-Konjugation* stabilisiert und kann nun mehrere Wege einschlagen. In aeroben Zellen ist allerdings eine Reaktion mit Sauerstoff (3) am wahrscheinlichsten bei der ein Peroxylradikal (4) entsteht. Peroxylradikale können sowohl miteinander, als auch mit Membranproteinen reagieren. Darüber hinaus können sie aber auch zur Elongation der Kettenreaktion beitragen, indem sie von einer weiteren Fettsäure ein Wasserstoff Atom abstrahieren (5) und zum Lipidperoxid (6) werden. [Halliwell, Chirico, 1993].

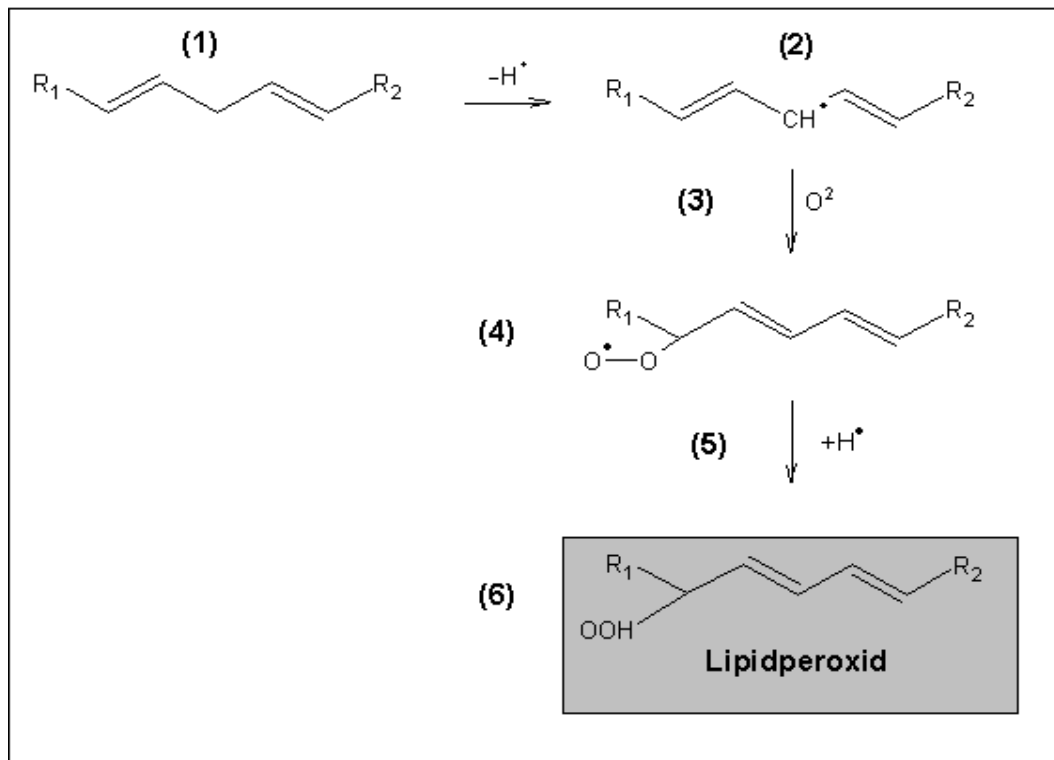


Abbildung 1.1: Mechanismus der Lipidperoxidation [Gutteridge, 1995]

Eine einzige Initiation kann die Umwandlung von hunderten FS-Seitenketten in Lipidperoxide zur Folge haben. Die Dauer der Elongation der Kettenreaktion hängt von dem Lipid-Protein Verhältnis, der Fettsäure-Zusammensetzung, der Sauerstoffkonzentration, und von der Anwesenheit von Antioxidantien (besonders α -Tocopherol) ab [Halliwell, Chirico, 1993]. Die Eigenschaften der Ursprünglichen Lipide werden durch diese Oxidation erheblich verändert, so dass es zur Beeinträchtigung der Zellfunktion kommt.

1.1.3 Messung von Oxidativem Stress und der Lipidperoxidation

Das Interesse an Oxidativem Stress ist in den letzten Jahrzehnten drastisch gestiegen. Es wurde bewiesen dass die Lipidperoxidation ein wichtiger pathophysiologischer Bestandteil verschiedener Erkrankungen ist. Trotz einer Vielzahl von Messmethoden, gestaltet sich besonders unter basalen Laborbedingungen die Quantifizierung als schwierig.

Die Lipidperoxidation kann anhand der Messung des Verlusts von ungesättigten Fettsäuren erfolgen. Außerdem können primäre Peroxidationsprodukte

und sekundäre Abbauprodukte bestimmt werden [Halliwell, Chirico, 1993].

Tabelle 1.1 stellt eine Zusammenfassung verschiedener Messmethoden dar:

<u>Methode:</u>	<u>Bemerkung:</u>
FOX-Test	Photometrische Bestimmung von Lipidperoxiden bei 560 nm. FOX-1: Bestimmung in wässrigen Milieu, FOX-2: Plasma bzw. lipophiles Milieu. Siehe Kapitel 2.3
TBA-Test	Die Probe wird bei einem niedrigen pH mit Thiobarbitursäure erhitzt. Danach wird die Absorbance bei 532 nm (oder 553 nm unter Fluoreszenz) gemessen. Es werden Aldehyde gemessen, welche durch Peroxide und ungesättigte Fettsäuren aber auch enzymatisch generiert werden. Einfaches aber unspezifisches Verfahren [Marshall et al, 1985].
Iodometrische Titration	Referenzmethode für die Quantifizierung von Peroxiden in Ölen und Fetten. Lipidhydroperoxide reagieren im sauren Milieu mit Iodid zu Iod. Dieses wird mit einer Thiosulfat-Lösung zurück titriert. Strikt anaerobe Bedingungen sind hierfür nötig da Sauerstoff ein Störfaktor ist.
Glutathion Peroxidase (GPx)	GPx reagiert mit Peroxiden unter Oxidation von GSH zu GSSG. Zugabe von Glutathion Reduktase führt unter Verbrauch von NADPH zur Rückreaktion. Der Verbrauch von NADPH wird in Relation zu den Peroxiden gesetzt.
Dien-Konjugation	Die bei der Lipidperoxidation entstehenden konjugierten Diene absorbieren im Wellenlängenbereich von 230-235 nm. Problembehaftetes Verfahren [Halliwell, Chirico, 1993].
Ethangas-Messung in der Atemluft	Gaschromatographische Messung von teilweise bei der Lipidperoxidation entstehenden Gasen (Ethan, Pentan) in der Atemluft. Dieses Verfahren ist nicht invasiv, erfordert aber eine entsprechende Apparatur. Ethangasmessung in modifizierter Form auch per Infrarot Laser Spektroskopie möglich [Von Basum et al, 2003]. Hierfür sind ebenfalls besondere Geräte erforderlich, welche im Routinelabor oder in der Praxis nicht vorhanden sind.
Fettsäureanalyse mittels HPLC bzw. GLC	Verlust an ungesättigten Fettsäuren wird gemessen.
Cyclooxygenase	Messung der Lipidperoxide durch Stimulation der Cyclooxygenase Aktivität.
Aldehydmessung	Messung von Aldehyden durch Fluoreszenz, HPLC, Antikörper.

Tabelle 1.1: Messmethoden der Lipidperoxidation

Die FOX-Methode stellt das in diese Arbeit verwendete Verfahren dar, und wird im Kapitel Materialien und Methoden näher erläutert.

Der TBA-Test ist neben der iodometrischen Titration das am weitesten verbreitete Verfahren. Es ist kostengünstig und leicht durchführbar. Allerdings

wird diese Methode wie auch die Messung der konjugierten Diene für den Mangel an Spezifität kritisiert [Chirico, 1994; Janero, 1990]. Dies liegt hauptsächlich an der Entstehung von Artefakten im Verlauf des Tests [Gutteridge, 1986].

Grundsätzlich kann angemerkt werden, dass die akkuratesten Messmethoden die höchsten Anforderungen bezüglich der Durchführung und Messapparatur stellen [Gutteridge, Halliwell, 1990].

1.2 Problemstellung

Wie bereits oben dargestellt, spielt die Lipidperoxidation eine signifikante Rolle bei einer Reihe von pathologischen Prozessen. Messverfahren zur Bestimmung der Lipidperoxidation sind häufig nicht unter einfachen Laborbedingungen zu realisieren. Außerdem sind viele Verfahren kostenintensiv. Somit ergibt sich folgende Problemstellung:

Besteht die Möglichkeit, eine einfache und kostengünstige Methode zu entwickeln, mit der man in der Lage ist, Lipidperoxide auch außerhalb eines hoch ausgestatteten Labors zu bestimmen?

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte ein einfaches Miniphotometer entwickelt und eingesetzt werden, um die apparativen Kosten zu reduzieren. Die weiter unten beschriebene FOX-Methode sollte für die Bestimmung der Lipidperoxide herangezogen, und im Verlauf der Arbeit zusammen mit dem Miniphotometer validiert werden.

2 MATERIALIEN UND METHODEN

2.1 Chemikalien

<u>Substanz :</u>	<u>Hersteller:</u>
Ammonium-Eisen[II] Sulfat $[\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2]$	SIGMA CHEMICALS Steinheim
BHP (tert-Butyl Hydroperoxid), 70% in H_2O	ALDRICH Milwaukee
BHT (Butylated Hydroxytoluene), $\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{O}$	SIGMA CHEMICALS Steinheim
Ferrozin Eisen Test (LKM 130)	DR. LANGE Berlin
Kupfer Sulfat (CuSO_4)	SIGMA CHEMICALS Steinheim
Methanol , 99,9%, HPLC Grade	MERCK Darmstadt
PeroxiDetect™	SIGMA CHEMICALS Steinheim
Titrosol , Eichlösung für Eisen	MERCK Darmstadt
Secutrol®U , lypophylisiert	DR. LANGE Berlin
TPP (Triphenylphosphat) 99%, $\text{C}_{18}\text{H}_{15}\text{P}$	ALDRICH Milwaukee
Wasserstoffperoxid (H_2O_2) 30%, reinst, stabilisiert	MERCK Darmstadt
Xylenol Orange (3,3'-bis[N,NDicarboxymethylaminoethyl]-o-cresolsulfonephthalein)	SIGMA CHEMICALS Steinheim und ALDRICH Milwaukee

Tabelle 2.1: Verwendete Chemikalien

2.2 Geräte

<u>Gerät :</u>	<u>Hersteller:</u>
Spektrometer Lambda 19	Perkin Elmer
Hettich Universal 1200 Zentrifuge	HETTICH Tuttlingen
Labinco L 24 Vortex	Labinco, Breden NL

Tabelle 2.2: Verwendete Geräte

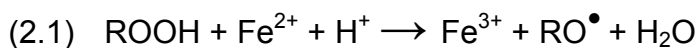
Als Referenz für das entwickelte Miniphotometer (s. Kapitel 3.1) wurde das computergesteuerte Zweistrahlspektrometer Lambda 19 von Perkin Elmer verwendet. Hiermit wurden außerdem zahlreiche Spektren in Wellenlängenbereichen von 400 bis 800 nm gemessen. Die Datenverarbeitung und Steuerung des Spektrometers erfolgte mit einem Personal Computer unter Verwendung des Programms UV WinLab.

Die Auswertung und statistischen Berechnungen wurden mit Hilfe des Programms Microcal Origin 6.0 durchgeführt.

2.3 Ferrous Oxidation using Xylenol Orange (FOX-Test)

Ursprünglich wurde die FOX-Methode (Ferrous Oxidation using Xylenol Orange) 1973 von Gupta zur Quantifizierung von Wasserstoffperoxid beschrieben [Gupta, 1973]. Zur Messung von Lipidperoxiden wurde das Verfahren 1991 von Jiang et al aufgegriffen und als FOX2-Methode modifiziert [Jiang et al, 1992]. Die FOX2-Methode ist Gegenstand dieser Arbeit.

Hydroperoxide oxidieren Fe^{2+} zu Fe^{3+} im sauren Milieu:



Xylenol Orange (3,3'-bis[N,N-Di(carboxymethyl)aminoethyl]-o cresosulfonaphthalein) bindet mit hoher Selektivität Fe^{3+} -Ionen und bildet dabei einen Farbkomplex (Gleichung 2.2) mit einem Extinktionskoeffizienten von $1.5 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ und einem Absorptionsmaximum im Bereich von 560nm [Jiang et al, 1990]. Abbildung 2.2 zeigt

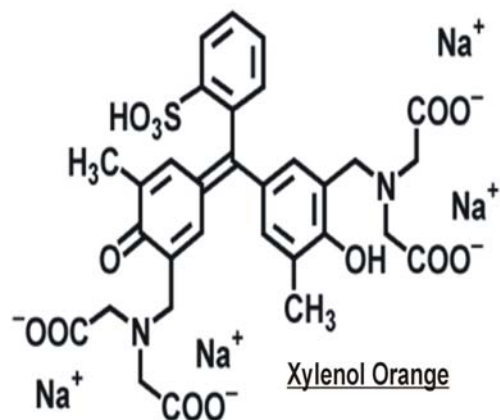


Abbildung 2.1: Strukturformel von Xylenol Orange

diese Absorptionserhöhung nach Zugabe von Fe^{3+} zum FOX-Reagenz.

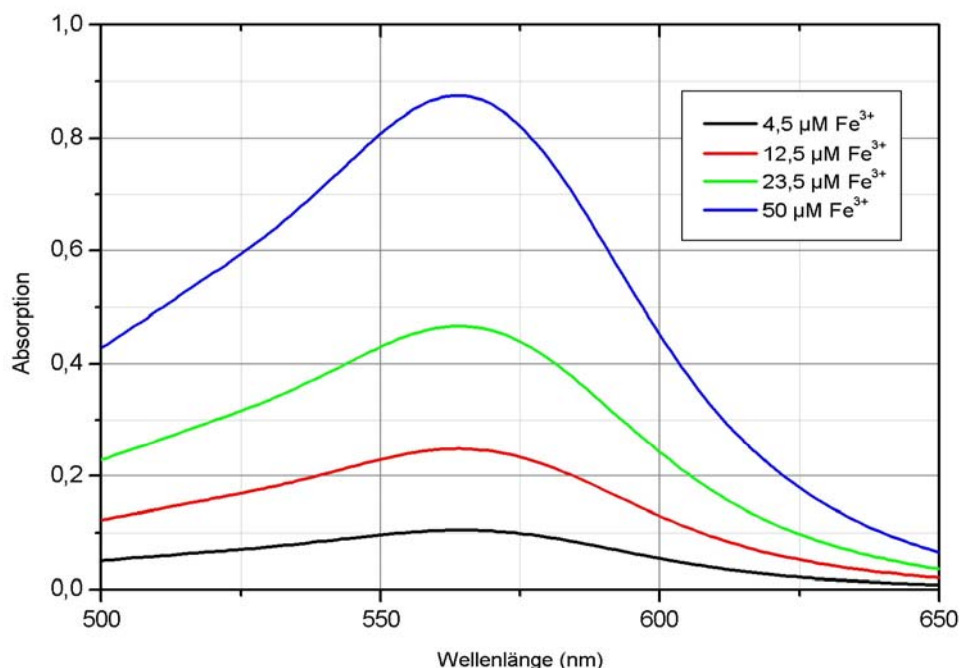


Abbildung 2.2: Veränderung im Spektrum des FOX-Reagenz nach Zugabe von Fe³⁺ in verschiedenen Konzentrationen. Bereich von 500 bis 650 nm. Das Absorptionsmaximum liegt bei 560 nm.

In früheren Arbeiten wurden mittlere Extinktionskoeffizienten für Hydroperoxide wie Wasserstoffperoxid, Butylhydroperoxid, Linolhydroperoxid und Cumolhydroperoxid von $4.52 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ gemessen [Jiang et al, 1992]. Pro Mol Hydroperoxid entstehen hiernach ca. 3 Mol des Fe³⁺-Xylenol Orange Komplexes. Diese nicht exakte Stöchiometrie wird durch eine begrenzte Kettenoxidation der Fe²⁺-Ionen im Verlauf des Tests begründet [Jiang et al, 1992].

Bei der Oxidation von Fe²⁺ zu Fe³⁺ entstehen Alkoxyradikale (RO•). Diese sind in der Lage, die Oxidation von weiteren Lipiden zu initiieren und somit falsche Ergebnisse zu produzieren. Durch Zugabe des synthetischen Antioxidans Butylhydroxytoluol (BHT) wird dieser Störfaktor eliminiert. BHT repariert die Alkylradikale (C-C•), die bei der Reaktion von Alkoxyradikalen mit ungesättigten Fettsäuren entstehen, und unterbricht somit die Kettenreaktion [Wolff, 1994].

Butylhydroxytoluol (BHT)

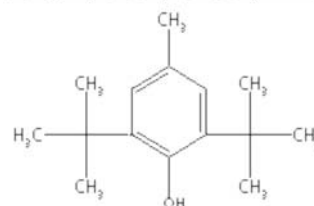


Abbildung 2.2: Strukturformel von Butylhydroxytoluol (BHT)

Triphenylphosphat (TPP) reduziert spezifisch Lipidhydroperoxide zum korrespondierenden Alkohol und kann zur Unterscheidung dieser von anderen Signal generierenden Faktoren (H_2O_2 , Eisen) im Plasma verwendet werden [Nourooz-Zadeh, 1994]. Durch Reduktion der Hydroperoxide (z.B. Butylhydroperoxid, Linolhydroperoxid und Cumolhydroperoxid) wird das Hin-

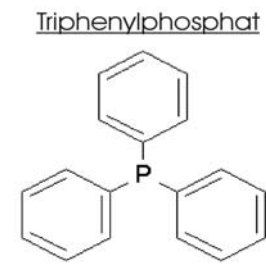


Abbildung 2.3: Strukturformel von TPP

tergrundsignal enttarnt, welches durch Störfaktoren generiert wird. Demnach werden 2 Proben gemessen und voneinander subtrahiert. Die erste Probe wird vor Zugabe des FOX-Reagenz 30 Minuten mit Triphenylphosphat inkubiert. Die zweite Probe kann direkt gemessen werden. Die Differenz der Absorptionswerte entspricht der Absorption, die ausschließlich durch die Reaktion der Lipidperoxide mit dem FOX-Reagenz zustande kommt [Rice-Evans *et al.*, 1996].

Bei Messungen im Plasma müssen mögliche Interaktionen in Erwägung gezogen werden. Ascorbinsäure und Acetat weisen ein Interaktionspotential mit der FOX-Methode auf [Gay, 1999]. Freies Eisen im Plasma stellt einen weiteren Störfaktor dar (s. Ergebnisse). Da Xylenol Orange auch mit anderen Spurenelementen Komplexe bildet [Paull *et al.*, 1999], muss in einem komplexen System wie dem Blutplasma mit weiteren Interaktionen gerechnet werden. Glucose, Proteine, Glycerol, Triglyzeride, Cholesterol und α -Tocopherol führen zu keiner Interaktion mit der FOX-Methode [Gay *et al.*, 1999; Hermes *et al.*, 1995; Jiang *et al.*, 1992].

Die FOX-Methode zeigt vergleichbare Ergebnisse zur iodometrischen Titration und dem TBA-Test [Jiang, 1991].

2.3.1 Herstellung des FOX-Reagenz

Zur Herstellung des Teilreagenz 1 wurden 100 µmol Xylenol Orange und 4 mmol BHT in Methanol gelöst. Die Lösung von 250 µmol Ammonium-Eisen(II)-Sulfat in 250 mmol Schwefelsäure ergab Teilreagenz 2. Die Verwendung eines Magnetrührers vereinfachte diese Lösungsschritte aufgrund der schwierigen Löslichkeit erheblich. Die Herstellung des Arbeitsreagenz erfolgte durch Vermengung der Teilreagenzien 1 und 2 im Verhältnis 9:1. Teilreagenz 1 und 2 wurden im Kühlschrank aufbewahrt und blieben über 2 Wochen stabil. Das Mischreagenz wurde für den jeweiligen Tag frisch erstellt.

Rezept FOX-Reagenz (1000ml):	
<u>Teilreagenz I:</u> 76 mg Xylenol Orange und 880 mg BHT in 900 ml Methanol (90%, HPLC-Grade) gelöst.	<u>Teilreagenz II:</u> 98 mg Ammonium-Fe(II)-sulfat in 100 ml 250 mmol H ₂ SO ₄ gelöst.
<u>FOX-Reagenz:</u> 90 ml Teilreagenz 1 + 10 ml Teilreagenz 2 = 100 ml FOX-Reagenz	
<u>Zusammensetzung FOX 2 – Reagenz:</u> - 250 µmol/l Ammonium-Fe(II)-sulfat (d.h. 98 mg/l) - 25 mmol/l H₂SO₄ - 4 mmol/l BHT (d.h. 880 mg/l) - 100 µmol/l Xylenol Orange (d.h. 76 mg/l)	

Tabelle 2.3 Zusammensetzung des FOX-Reagenz

2.3.2 Anwendung der FOX-Methode

Herstellerspezifische Unterschiede des Xylenol Oranges

Da das Xylenol Orange sowohl von der Firma Sigma als auch der Firma Aldrich zur Verfügung stand, wurden zunächst beide Reagenzien getestet. Hierzu wurde jeweils ein FOX-Reagenz mit dem Sigma und dem Aldrich Produkt entsprechend oben beschriebener Anleitung hergestellt. Es folgte eine Analyse des Spektrums, Bestimmung des Extinktionskoeffizienten für Eisen und der Vergleich eines Absorptions-Konzentrations-Diagramms mit H₂O₂.

Allgemeines Vorgehen bei der FOX-Methode

2750 µl FOX-Reagenz wurden in Polystyrol-Küvetten gefüllt. Es folgte die Zugabe von 150 µl Probe. Die Küvette wurde verschlossen und auf dem Vortex gemischt. Nach Inkubation von 20-30 Minuten bei Raumtemperatur (ca. 25°C) folgte die photometrische Messung bei 560 nm gegen einen geeigneten Blindwert (Methanol). Die Extinktionskoeffizienten von H₂O₂ und BHP wurden ermittelt. Die Zusammensetzung der Proben kann Tabelle 2.4 und 2.5 entnommen werden.

µM H ₂ O ₂	µL FOX- Reagenz	Zugabe H ₂ O ₂ [µL]	Aliquate [µL] (Methanol)	Gesamtvolumen
0	2850	0	150	3000
1	2850	3,4	146,6	3000
2	2850	6,8	143,2	3000
3	2850	10,2	139,8	3000
4	2850	13,6	136,4	3000
5	2850	17,0	133,0	3000
6	2850	20,4	129,6	3000
7	2850	23,8	125,9	3000
8	2850	27,2	122,5	3000
9	2850	30,6	119,1	3000
10	2850	34,0	115,6	3000

Tabelle 2.4: Erstellung einer Eichkurve von H₂O₂

µM BHP	µL FOX-Reagenz	Zugabe BHP [µL]	Aliquate [µL] (Methanol)	Gesamtvolumen
0	2850	0	150	3000
1	2850	3,9	146	3000
2	2850	7,7	142	3000
3	2850	11,6	138	3000
4	2850	15,5	135	3000
5	2850	19,3	131	3000
6	2850	23,2	127	3000
7	2850	27,1	123	3000
8	2850	30,9	119	3000
9	2850	34,8	115	3000
10	2850	38,7	111	3000

Tabelle 2.5: Erstellung einer Eichkurve für BHP (Butylhydroperoxid)

Zu Vergleichszwecken wurde ebenfalls der kommerziell erhältliche Peroxid-Test *PeroxiDetect* von der Firma Sigma herangezogen.

Kinetik der FOX-Methode

Die Bestimmung der Reaktionskinetik erfolgte mit dem zeitkontrollierten Messmodus des Perkin Elmer Spektrometers Lambda 19. Hierzu wurden 150 µl Probe mit H₂O₂ oder Butylhydroperoxid (jeweils 2 und 5 µM) zum FOX-Reagenz gegeben. Nach kurzer Mischung auf dem Vortex wurde die Küvette sofort in das Spektrometer gestellt und bei 560 nm automatisiert alle 60 Sekunden gegen einen Blindwert gemessen. Die resultierenden zeitabhängigen Absorptionswerte wurden in eine Origin Datei übernommen und graphisch dargestellt

Auswirkung von Eisen und Kupfer auf den FOX-Test

Die Interaktion von Kupfer als möglicher Störfaktor des FOX-Tests sollte untersucht werden. Nach Zugabe von 20 µM Cu²⁺ zum FOX-Reagenz wurde nach 30minütiger Inkubation das Spektrum von 400-800 nm ausgewertet.

Das Störpotential durch freies Fe³⁺ sollte ausführlicher untersucht werden. Dies erfolgte mit Hilfe der Eichlösung Titrosol®. Der Testansatz verlief so wie unter *Allgemeines Vorgehen bei der FOX-Methode* (s.o.) beschrieben. Zusätzlich wurde zu den Proben jedoch Fe³⁺ in Konzentrationen von 10-50 µmol gegeben (Tabelle 2.6). Die resultierenden Daten wurden in einem Konzentrations-Absorptions-Diagramm aufgetragen.

µM BHP	Zugabe BHP [µL]	Zugabe Fe ³⁺ [µM]	Zugabe Fe ³⁺ [µL]	Volumen Probe nach Zugabe eines Aliquots (Methanol)	FOX-Reagenz [µL]	Gesamtvolumen [ml]
0-10	0-38.7	0	0	150	2850	3000
0-10	0-38.7	10	16.8	150	2850	3000
0-10	0-38.7	20	33.5	150	2850	3000
0-10	0-38.7	30	50.3	150	2850	3000
0-10	0-38.7	40	67	150	2850	3000
0-10	0-38.7	50	84	150	2850	3000

Tabelle 2.6: FOX-Test unter Zugabe von 1-10 µM BHP und 1-50 µM Fe³⁺.

Untersuchung von Probanden

Plasma von 17 gesunden erwachsenen Probanden im Alter von 22-56 Jahren wurde untersucht. Die Blutentnahme erfolgte aus der Ellenbeuge (V. cubitalis) mittels Vacutainer System in heparinisierte Röhrchen. Nach Entnahme wurde das Blut 10 Minuten bei 10.000 G zentrifugiert. 150 µl des Überstandes wurden als Probe zum FOX-Reagenz hinzugefügt, auf dem Vortex gemischt und nochmals zentrifugiert. Nach 30 Minuten Inkubation wurde die Absorption zunächst am Miniphotometer und als Vergleich am Spektrometer gemessen.

Zur Ermittlung des Hintergrundsignals durch mögliche Störfaktoren wurde zu einer zweiten Probe TPP (Triphenylphosphat) in einer Konzentration von 10 mM zugegeben und für 30 Minuten inkubiert. Im Anschluss folgte der oben beschriebene Messablauf. Der erhaltene Wert wurde als Hintergrundsignal von der Messung ohne TPP subtrahiert. Mit Hilfe des zuvor ermittelten Extinktionskoeffizienten konnte nun die Konzentration der Lipidperoxide berechnet werden.

2.4 Validierung des Miniphotometers

Sämtliche Messreihen bei 560 nm wurden sowohl mit dem Miniphotometer als auch mit dem Spektrometer Lambda 19 durchgeführt. Die Datensätze wurden korreliert.

3 ERGEBNISSE

3.1 Entwicklung eines Miniphotometers

3.1.1 Grundlagen der Photometrie

Unter Photometrie wird die Messung von Licht verstanden. In der medizinischen Labordiagnostik ist die Photometrie ein häufig angewendetes Verfahren zur Bestimmung von Konzentrationen verschiedenster Substanzen.

Beim Durchtritt von Licht durch eine Farbstofflösung nimmt die Lichtintensität ab. Dies beruht auf einer teilweisen Absorption der Lichtwellen. Das Verhältnis zwischen ein- und austretender Lichtintensität wird als Transmission bezeichnet und ist somit ein Maß für die Durchlässigkeit eines Stoffes für Lichtwellen.

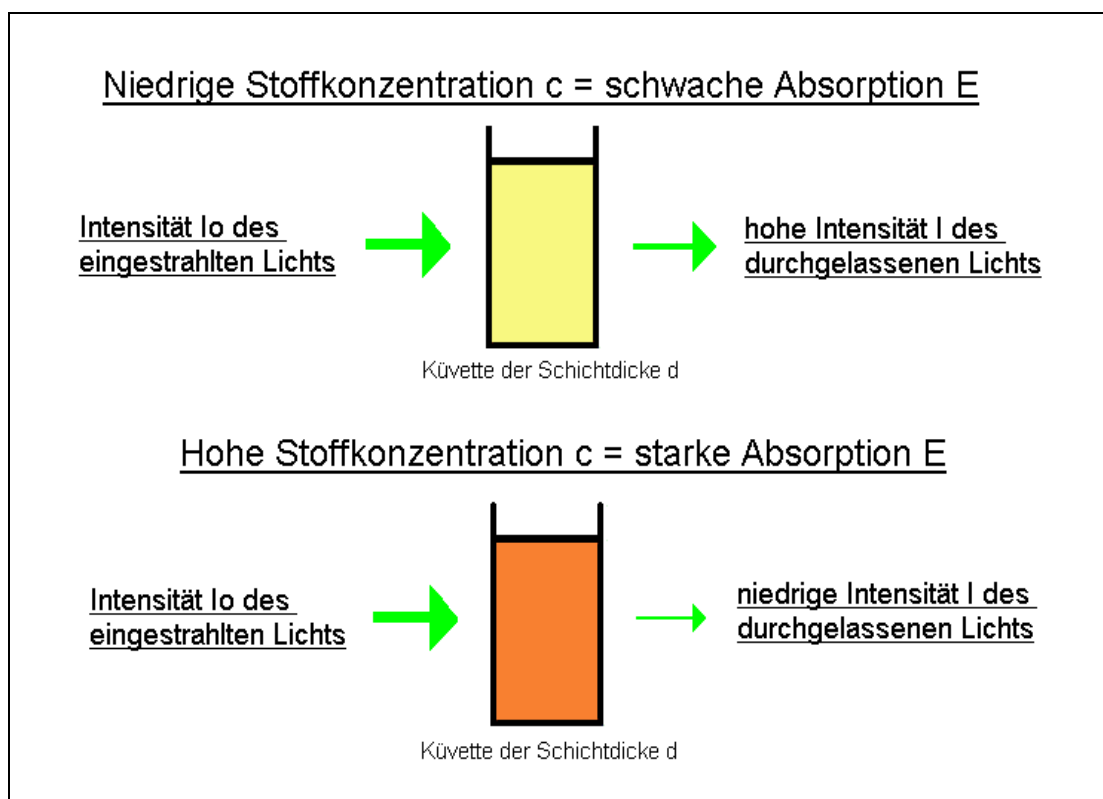


Abbildung 3.1: Abhängigkeit der Absorption von der Konzentration eines Stoffes

Wird beim Durchtritt durch eine Küvette mit einer Farbstofflösung die Lichtintensität auf die Hälfte reduziert und danach eine zusätzliche identische Küvette in den Strahlengang gebracht, so wird die Lichtintensität ein weiteres Mal halbiert. Bei Verdopplung der Konzentration wird der gleiche Effekt beobachtet. Werden Konzentration und Schichtdicke weiter erhöht, so wird deutlich, dass die Transmission mit der Schichtdicke und der Konzentration der Farbstofflösung exponentiell abnimmt [Gerthsen, 1989]. Die Beziehung zwischen diesen Parametern kann nach Einführung eines Proportionalitätsfaktors, dem *Extinktionskoeffizienten* ε , wie folgt beschrieben werden:

$$(3.1) \quad T = 10^{-\varepsilon \times c \times d} \quad (\varepsilon = \text{Extinktionskoeffizient; } c = \text{Konzentration; } d = \text{Schichtdicke})$$

Für Konzentrationsmessungen ist es jedoch praktischer, eine von der Konzentration linear abhängige Messgröße zu verwenden. Hierzu wurde die Extinktion E (engl.: Absorbance A) eingeführt, die durch Logarithmieren aus der Transmission hervorgeht.

$$(3.2) \quad E = -\log T = \log 1/T = \log I_0 / I = \varepsilon \times c \times d$$

Über dieses *Lambert-Beer'sche-Gesetz* besteht die Möglichkeit bei bekannter Schichtdicke d und zuvor ermitteltem Extinktionskoeffizienten ε , die Konzentration eines gelösten Stoffes bei Kenntnis der Absorption zu ermitteln.

Der Extinktionskoeffizient ist definiert als die Extinktion einer Lösung der Konzentration $c = 1 \text{ mol/l}$ bei einer Schichtdicke $d = 1 \text{ cm}$. Diese Größe ist abhängig von der Wellenlänge und ist für eine spezielle Substanz ein spezifischer Parameter. Die Bestimmung des Extinktionskoeffizienten erfolgt experimentell, indem für mehrere bekannte Konzentrationen der Lösung die Absorption mittels eines Photometers (s.u.) bestimmt wird. Die erhaltenen Werte werden in einem Konzentrations-Extinktions-Diagramm bzw. einer Eichkurve aufgetragen und sollten bei Erfüllung des Lambert-Beer'schen-Gesetzes linear verlaufen. Misst man nun die Extinktion dieser Substanz ohne die Konzentration zu kennen, so kann diese an der Eichkurve abgelesen werden oder mittels des Lambert-Beer'schen-Gesetzes berechnet werden.

3.1.2 Photometer und Spektrometer

Der Begriff Photometer bezeichnet unterschiedliche Geräte zur Messung von Licht. Die folgende Abbildung zeigt den schematischen Aufbau eines in der Labordiagnostik üblichen Photometers:

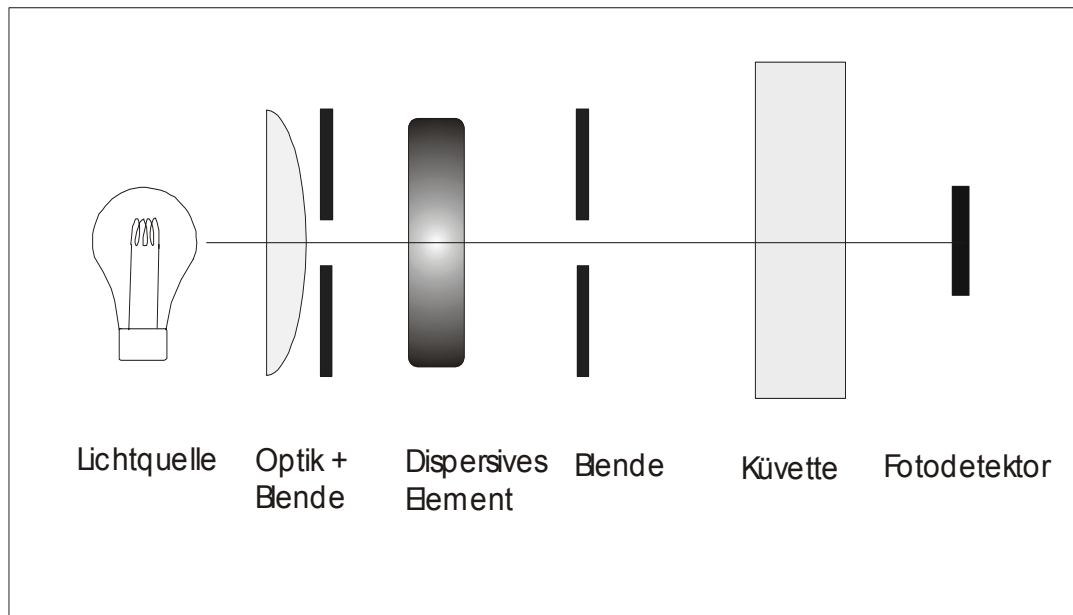


Abbildung 3.2: Schema eines Photometers

Das Licht einer Weißlichtquelle wird zunächst aufgetrennt. Hierfür wird ein Dispersionsmedium in Form eines Prismas oder optischen Gitters verwendet. Das Licht durchstrahlt die Küvette und wird entsprechend der Probe abgeschwächt. Die Transmission wird durch einen Detektor am anderen Ende der Küvette gemessen. Als Strahlungsquelle werden häufig thermische Lichtquellen (Halogenlampen) oder Lumineszenzstrahler (Quecksilberdampf lampen) verwendet.

Bei Verwendung eines Spektrometers wird nicht nur die Absorption in einer definierten Wellenlänge (z.B. 560 nm) gemessen. Es interessiert vielmehr ein bestimmter Spektralbereich. In der vorliegenden Arbeit wurden Absorptionsspektren im Bereich von 400-800 nm gemessen. Zur Aufnahme von Absorptionsspektren wird die zu untersuchende Substanz in einer Küvette von Licht aller Wellenlängen durchstrahlt. Das durchgetretene Licht wird auf den Eingangsspalt einer Nachweisapparatur fokussiert, in der es spektral zerlegt und als Spektrum registriert wird. Die Nachweisapparatur besteht aus einem

Spektrographen mit einem Gitter sowie einem Detektor. In einem Zweistrahl-spektrometer wird der einfallende Lichtstrahl in einen Mess- und einen Referenzstrahl geteilt. Der Messstrahl tritt durch die Küvette die mit der Probe gefüllt ist, während der Referenzstrahl durch eine mit einem Lösungsmittel (aqua dest, Methanol) gefüllten Küvette tritt.

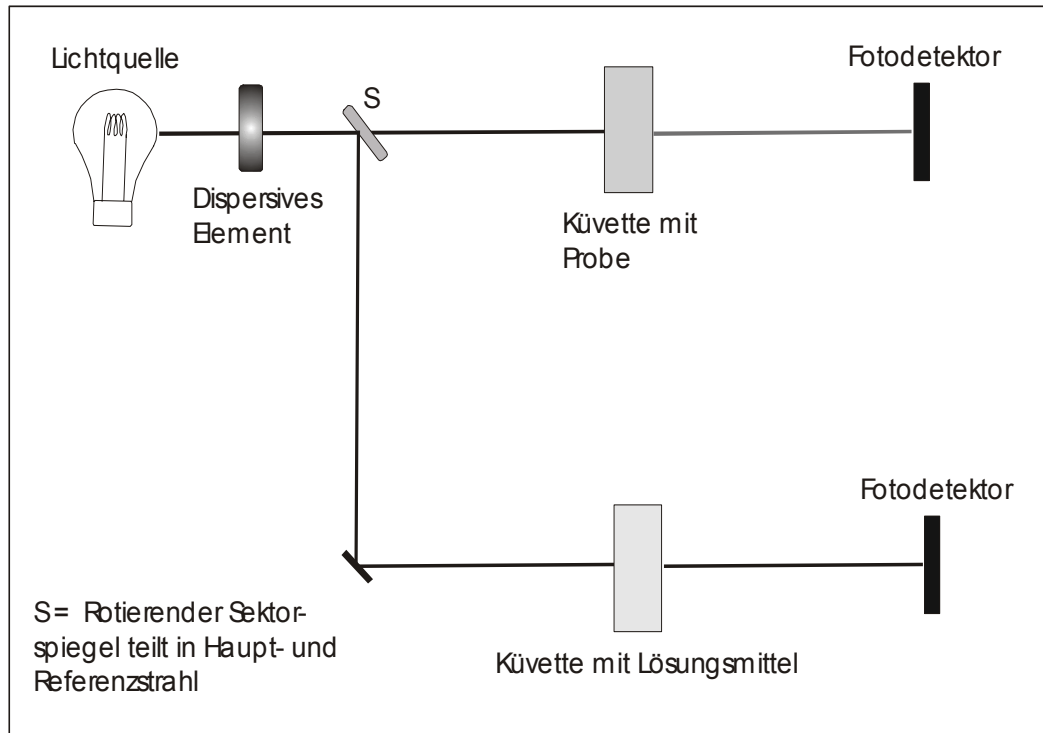


Abbildung 3.3: Vereinfachtes Schema eines Zweistrahl-spektrometers

3.1.3 Miniphotometer

Das für die Versuche verwendete Miniphotometer wurde am Institut für Lasermedizin entwickelt. Es sollte eine genaue und kostengünstige Messapparatur für 1-Wellenlängen Bestimmungen z.B. der Lipidperoxidation mit Hilfe der FOX-Methode darstellen. Sämtliche Messungen mit diesem Photometer erfolgten bei einer Wellenlänge von 560 nm. Auf ein breiteres Spektrum konnte verzichtet werden, da die photometrische Messung von Lipidperoxiden mittels FOX-Test typischerweise bei einer Wellenlänge von 560 nm erfolgt. Die Validität dieses Photometers wurde im Rahmen der Versuche ermittelt. Hierzu wurden alle Versuche parallel mit dem Spektrometer Lambda 19 von Perkin Elmer durchgeführt und die Ergebnisse verglichen.

Abbildung 3.4 zeigt den schematischen Aufbau des Miniphotometers. Anstelle einer thermischen Lichtquelle wurde eine LED verwendet, deren Wellenlänge 560 nm entspricht. Auf eine Lichtzerlegung mittels Monochromator konnte hierdurch verzichtet werden. Die in der Photometrie üblichen thermischen Lichtquellen haben den Nachteil, dass sie eine be-

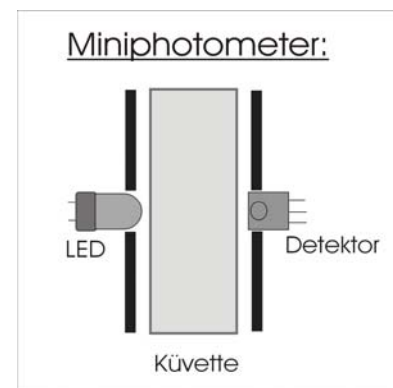


Abbildung 3.4: Miniphotometer

stimmte Betriebstemperatur erreichen müssen und eine eingeschränkte Lebensdauer besitzen. Bei Standard-LED werden Lebensdauern von mindestens 100.000 Stunden (das entspricht 11½ Jahren ununterbrochener Leuchtdauer) erreicht, die höchsten angegebenen Werte liegen weit darüber (bei 10⁹h). Leuchtdioden werden hierbei nach und nach schwächer, fallen aber nicht plötzlich aus. Die Zeit, nach der die Lichtausbeute der LED auf die Hälfte des Anfangswertes abgefallen ist, wird als Lebensdauer der LED bezeichnet. Die LED zeichnet sich weiter durch eine hohe Lichtstärke, hohe Stabilität und geringe Kosten aus. Messungen können im Gegensatz zu Photometern mit thermischen Lichtquellen sofort beginnen, da nur eine sehr kurze Aufwärmzeit (ca. 15-20 Sekunden) erforderlich ist. Die LED wird durch eine Konstantstromquelle versorgt um eine beständige Helligkeit zu gewährleisten. Helligkeitsschwankungen innerhalb einer Stunde liegen unter 1%. Für Messungen in anderen Wellenlängenbereichen steht heute eine große Auswahl an LED mit anderen Dominantwellenlängen vom ultravioletten bis zum infra-

roten Bereich zur Verfügung. Einige LED und deren Eigenschaften sind in Tabelle 3.1 bzw. Abbildung 3.5 dargestellt.

Bezeichnung Parameter	Symbol Symbol	Werte Values				Einheit Unit
		LS	LY	LG	LP	
Wellenlänge des emittierten Lichtes Wavelength at peak emission $I_F = 10 \text{ mA}$	(typ.) λ_{peak}	635	586	565	557	nm
Dominantwellenlänge Dominant wavelength $I_F = 10 \text{ mA}$	(typ.) λ_{dom}	628	590	570	560	nm
Spektrale Bandbreite bei 50 % $I_{\text{rel max}}$ Spectral bandwidth at 50 % $I_{\text{rel max}}$ $I_F = 10 \text{ mA}$	(typ.) $\Delta\lambda$	45	45	25	22	nm
Abstrahlwinkel bei 50 % I_V (Vollwinkel) Viewing angle at 50 % I_V	(typ.) 2φ	40	40	40	40	Grad deg.
Durchlaßspannung Forward voltage $I_F = 10 \text{ mA}$	(typ.) V_F (max.) V_F	2.0 2.6	2.0 2.6	2.0 2.6	2.0 2.6	V V
Sperrstrom Reverse current $V_R = 5 \text{ V}$	(typ.) I_R (max.) I_R	0.01 10	0.01 10	0.01 10	0.01 10	μA μA
Temperaturkoeffizient von λ_{peak} Temperature coefficient of λ_{peak} $I_F = 10 \text{ mA}$	(typ.) $TC_{\lambda_{\text{peak}}}$	0.11	0.10	0.11	0.11	nm/K
Temperaturkoeffizient von λ_{dom} Temperature coefficient of λ_{dom} $I_F = 10 \text{ mA}$	(typ.) $TC_{\lambda_{\text{dom}}}$	0.07	0.07	0.07	0.05	nm/K
Temperaturkoeffizient von V_F Temperature coefficient of V_F $I_F = 10 \text{ mA}$	(typ.) TC_V	-1.9	-1.9	-1.4	-2.1	mV/K
Optischer Wirkungsgrad Optical efficiency $I_F = 10 \text{ mA}$	(typ.) η_{opt}	1.5	1.5	2.5	0.6	lm/W

Tabelle 3.1: Eigenschaften verschiedener LED (Quelle: Osram)

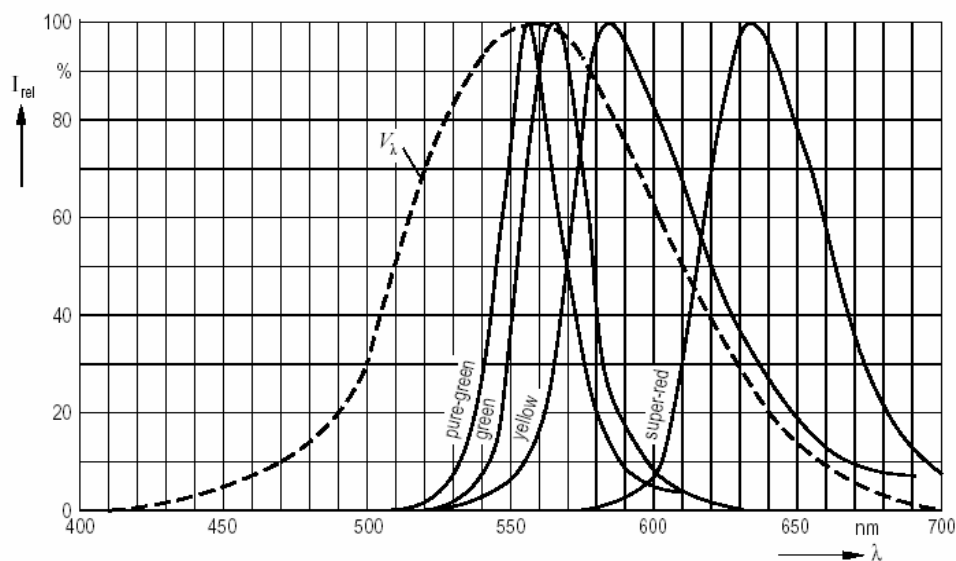


Abbildung 3.5: Spektrale Emission verschiedener LED (Quelle: Osram)

Auf der Detektorseite (Abbildung 3.6) des Miniphotometers befindet sich ein Photodetektor mit einem Licht-/Frequenz-Wandler.

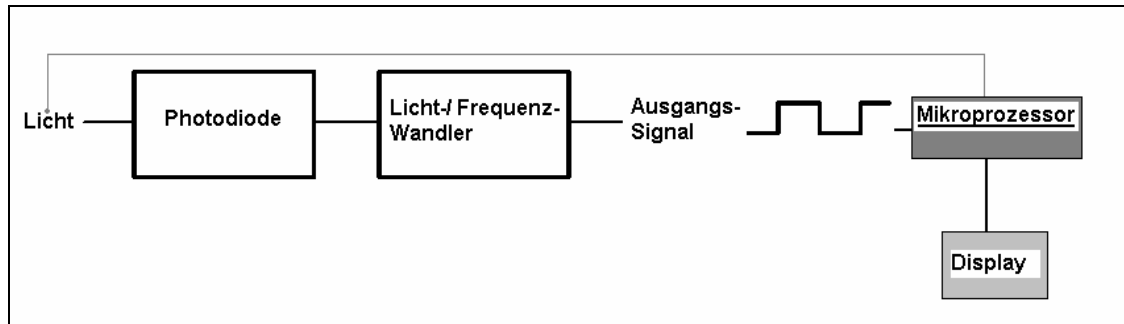


Abbildung 3.6: Detektorseite des Miniphotometers

Im Licht-/Frequenz-Wandler wird der Photostrom proportional in Frequenz gewandelt, wobei in einem weiten Bereich eine lineare Beziehung sichergestellt ist (s. Abbildung 3.7, links). Hierzu werden keine weiteren Komponenten benötigt. Der spektrale Messbereich des Detektors liegt im Bereich von 300 bis 1100 nm (s. Abbildung 3.7, rechts). Wird eine LED mit anderer Wellenlänge vorgeschaltet, kann innerhalb dieses Bereichs ebenfalls photometrisch gemessen werden, ohne die Detektorseite zu verändern.

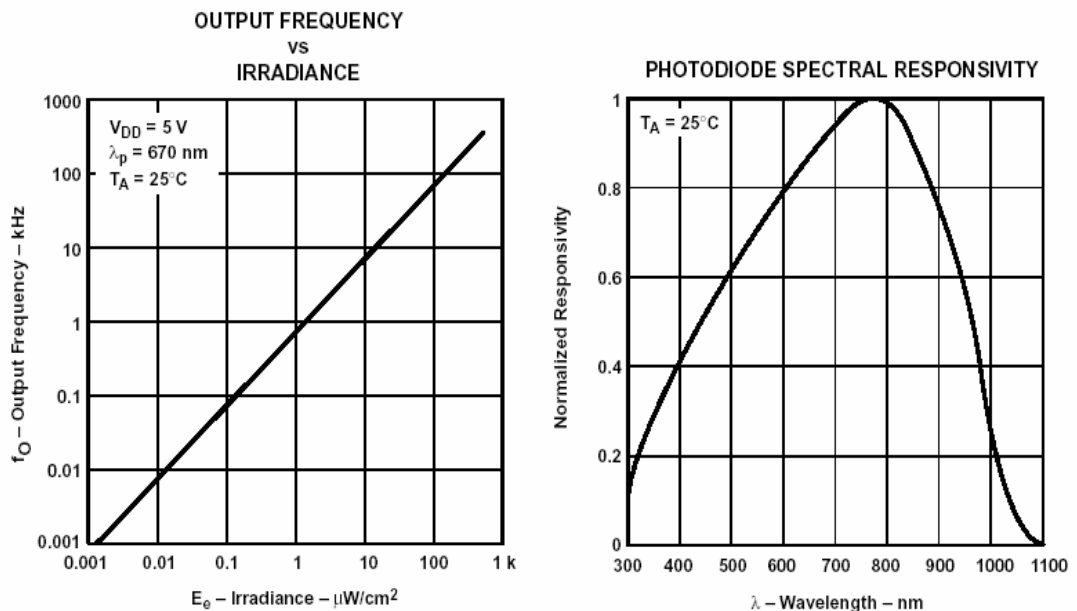


Abbildung 3.7: Eigenschaften des Licht/Frequenz-Wandlers. Links: Abhängigkeit des Ausgangssignals vom Photostrom. Rechts: Ansprechbarkeit des Detektors innerhalb des spektralen Messbereichs. (Quelle: TAOS)

Das rechteckige Ausgangssignal ist TTL (Transistor-transistor logic) kompatibel und fließt in einen 8bit Mikroprozessor. Hier wird das Signal in Absorptions- bzw. Transmissionswerte umgerechnet, welche dann auf einem Display angezeigt werden. Über einen Feedback-Mechanismus wird mit Hilfe des Mikroprozessors eine konstante Lichtintensität der LED gewährleistet. Eine weitere Funktion des Mikroprozessors ist die Speicherung des Leerwerts.

Neben einem Display besitzt das Miniphotometer zwei Schalter zur Bedienung (Abbildung 3.8). Diese ermöglichen die Umschaltung zwischen der Anzeige von Absorption und Transmission. Bei gleichzeitiger Betätigung erfolgt die Nullpunkteichung anhand einer Leerprobe (z.B. Methanol).

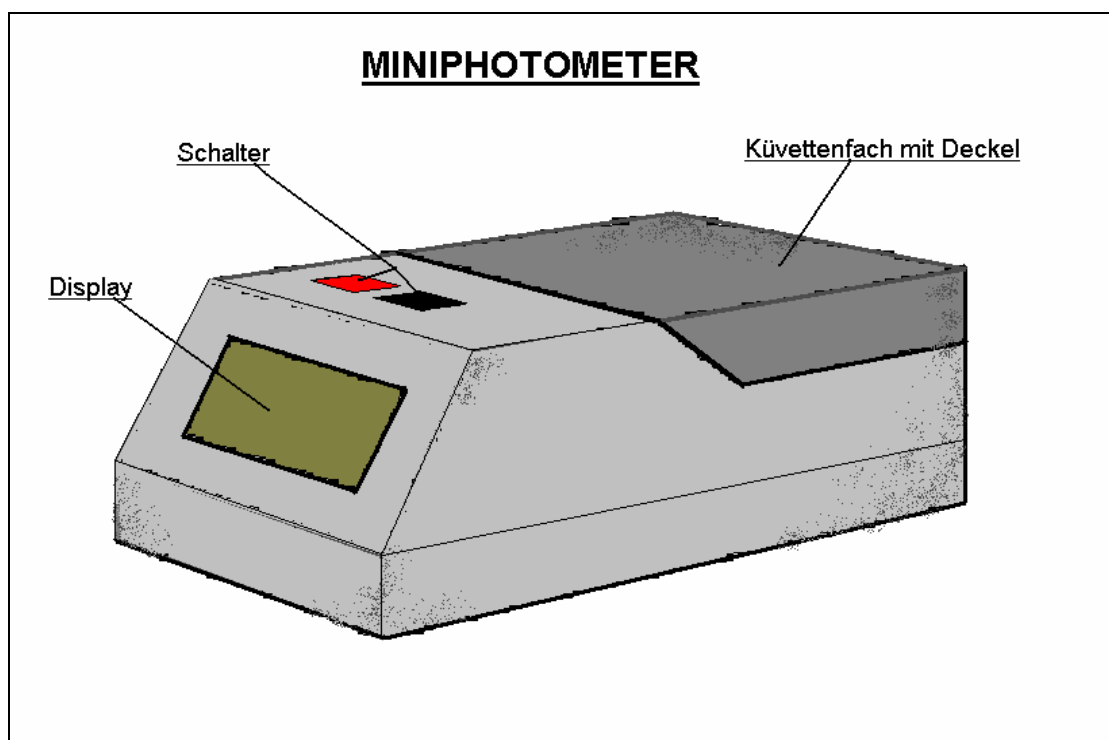


Abbildung 3.8: Skizze des Miniphotometers

3.2 Anwendung der FOX-Methode

3.2.1 Herstellerunterschiede des Xylenol Orange

Der Unterschied zwischen dem Xylenol Orange der Firmen Sigma und Aldrich war nach Herstellung des FOX-Reagenz schon augenscheinlich wahrnehmbar. Das Reagenz mit Sigma Xylenol Orange imponierte insgesamt etwas dunkler. Im Spektrum des FOX-Reagenz mit Xylenol Orange von Aldrich fand sich eine geringere Absorption im Bereich von 420 bis 580 nm (Abbildung 3.9).

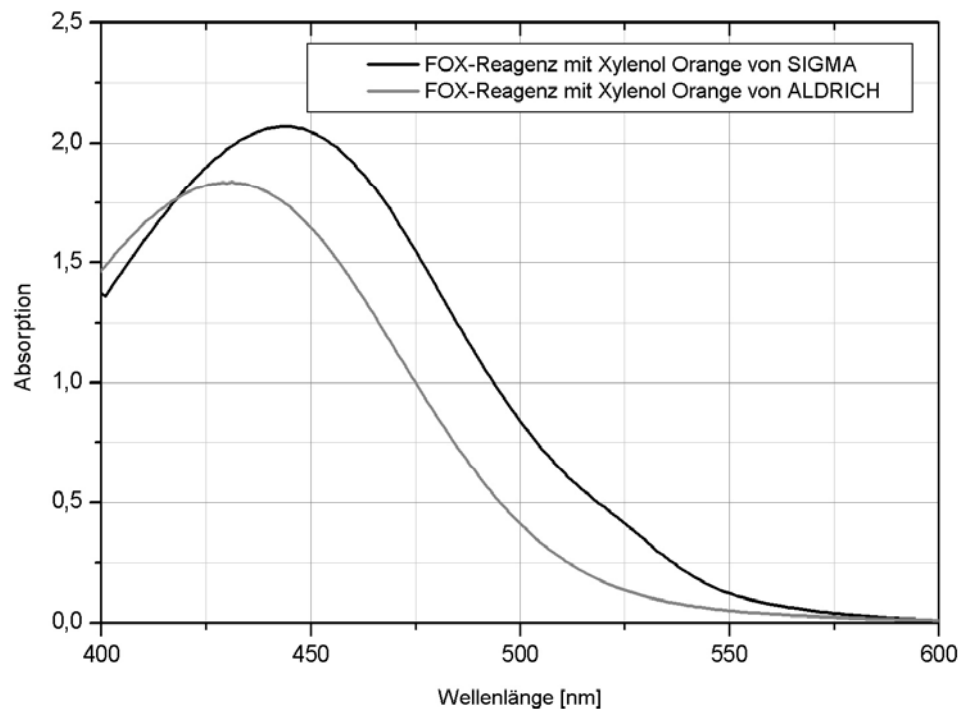


Abbildung 3.9: Vergleich der Spektren von Sigma und Aldrich Xylenol Orange. Die Absorption des Aldrich-FOX-Reagenz liegt im Bereich von 420-580 nm um bis zu 0,5 tiefer.

Vergleich der Extinktionskoeffizienten für Fe^{3+}

Nach Zugabe von 1-50 μM Fe^{3+} zum jeweiligen FOX-Reagenz, und Inkubation von 30 Minuten ergaben sich auch unterschiedlich steile Eichkurven (Abbildung 3.10). Die Extinktionskoeffizienten betragen dabei $2,7 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ für XO von Sigma bzw. $1,8 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ für XO von Aldrich.

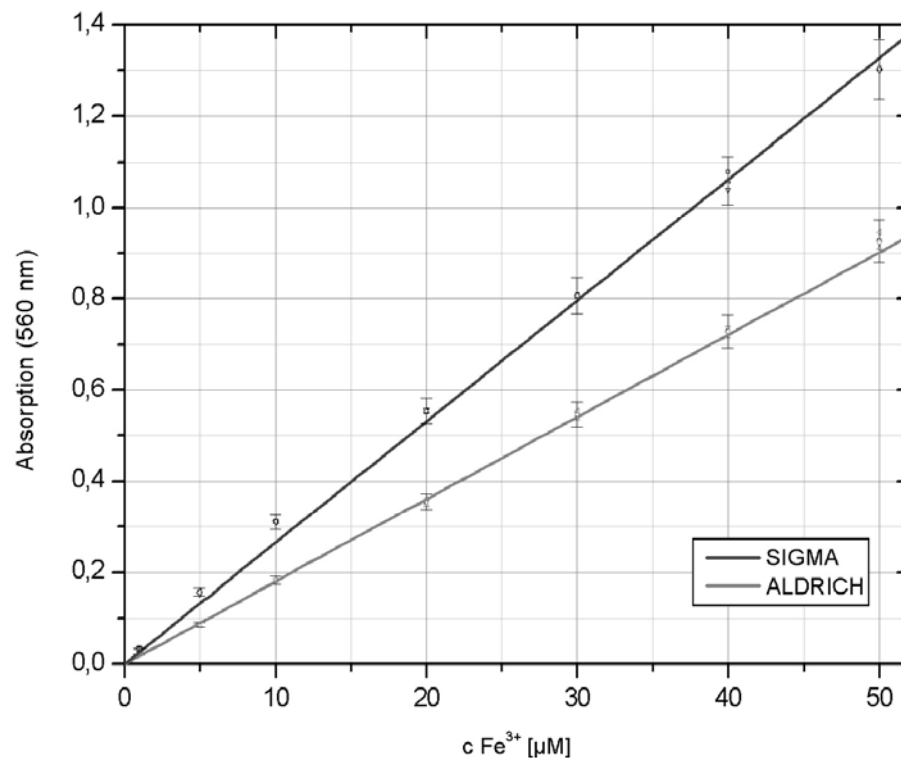


Abbildung 3.10: Beziehung zwischen Absorption und der Fe^{3+} Konzentration beim FOX-Test. Vergleich zwischen SIGMA und ALDRICH Xylenol Orange. (SIGMA: Steigung=0,027; N=7; SD=0,025; ALDRICH: Steigung=0,018; N=7; SD=0,0074)

Vergleich der Extinktionskoeffizienten für H_2O_2

Nach Zugabe von 1-10 μM H_2O_2 zum FOX-Reagenz und 30minütiger Inkubation zeigt die resultierende Eichkurve des FOX-Tests mit XO von Sigma eine größere Steigung (s. Abbildung 3.11). Die Extinktionskoeffizienten für H_2O_2 betragen $6,8 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ im FOX-Test mit Aldrich Xylenol Orange und $8,2 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ im FOX-Test mit Sigma Xylenol Orange.

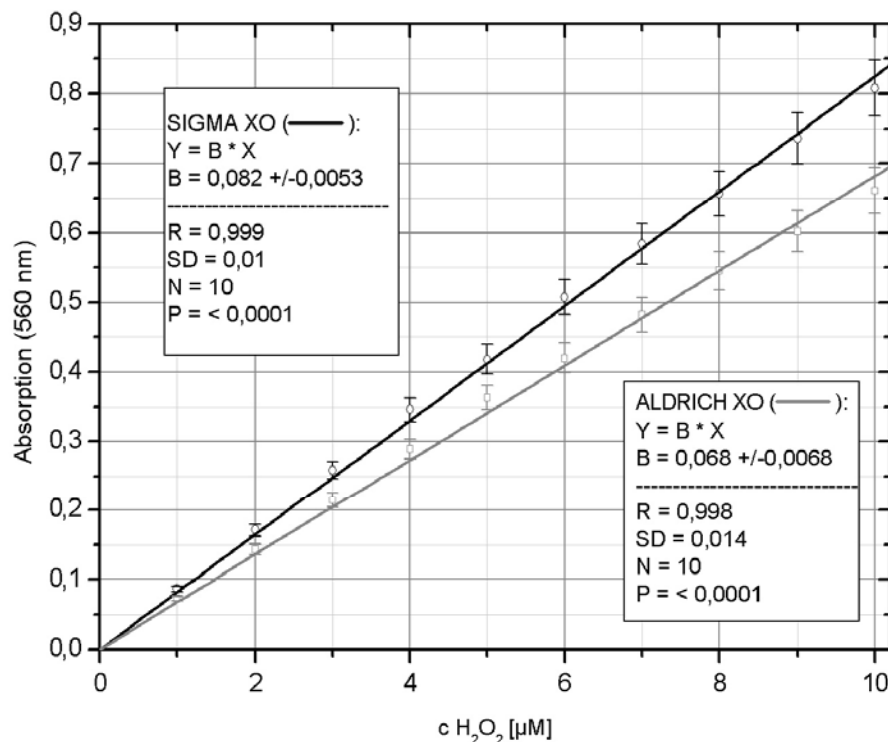


Abbildung 3.11: Beziehung zwischen Absorption und der H_2O_2 -Konzentration beim FOX-Test. Vergleich zwischen SIGMA und ALDRICH Xylenol Orange.

Die hier dargestellten Extinktionskoeffizienten unter Verwendung des Xylenol Orange von Aldrich befinden sich näher an den in der Literatur beschriebenen Werten ($4,52 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ für Lipidperoxide) [Jiang et al, 1992; Gupta, 1973; Wolff, 1994]. Aus diesem Grund wurde für weitere Versuche das Aldrich Produkt verwendet.

3.2.2 Kinetik (Zeit-Wirkungsbeziehung)

In der Literatur wird eine Inkubationszeit von 30 Minuten empfohlen [Jiang, 1990; Wolff, 1994]. Zur Überprüfung dieser Berichte wurde H_2O_2 in Konzentrationen von 2 und 5 μM zum FOX-Reagenz zugegeben und nach kurzer Mischung auf dem Vortex die Absorption jede Minute über insgesamt 1 Stunde gemessen. Abbildung 3.12 zeigt ein exponentielles Ansteigen der Absorption innerhalb 15 Minuten. Danach erreicht die Reaktion nach langsamen Ansteigen ein Plateau. Hierbei beträgt der Zuwachs 2 % nach 20 Minuten und

1 % nach 30 Minuten. Demnach sollte eine Inkubationszeit von 20 Minuten als ausreichend angesehen werden.

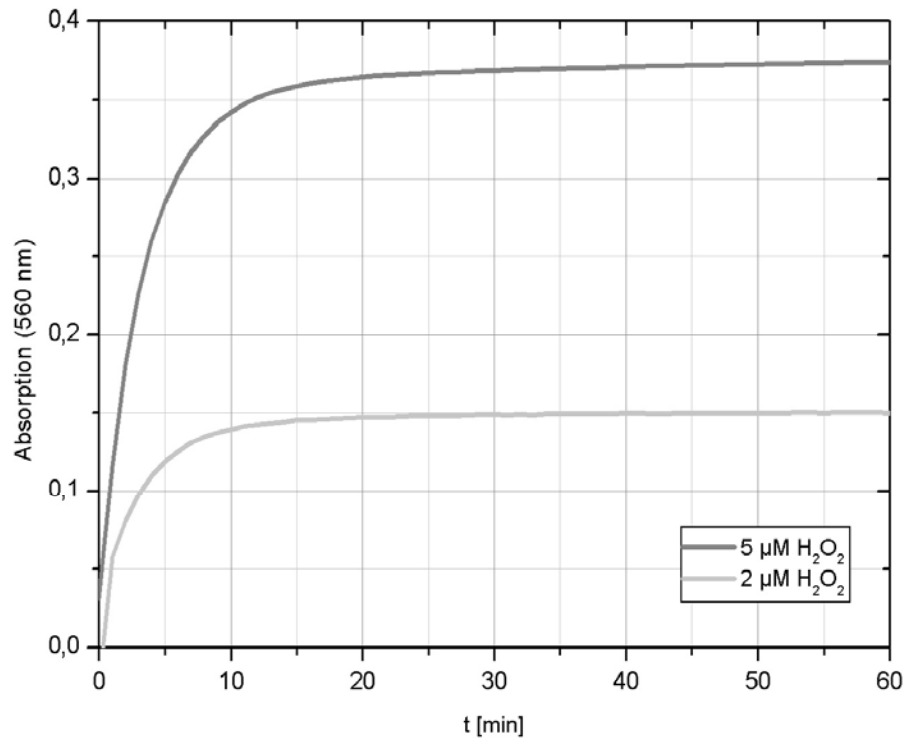


Abbildung 3.12: Kinetik des FOX-Tests. Zugabe von 2 und 5 µM H₂O₂ und Messung der Absorption alle 60 Sekunden über 1 Stunde.

3.2.3 Extinktionskoeffizienten

Die Ermittlung eines Extinktionskoeffizienten erfolgte für das hydrophile H₂O₂ und für das lipophile Butylhydroperoxid (BHP). Hierzu wurden 1-10 µM H₂O₂ bzw. BHP zum FOX-Reagenz zugegeben, auf dem Vortex gemischt und für 30 Minuten inkubiert. Im Anschluss folgte die Messung der Absorption bei 560 nm mittels Miniphotometer und Spektrometer als Kontrolle. Die resultierenden Eichkurven verlaufen linear (Abbildung 3.13 und 3.14). Nach mehrfachen Bestimmungen fanden sich mittlere Extinktionskoeffizienten von $6.8 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ für H₂O₂ und $6.6 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ für BHP.

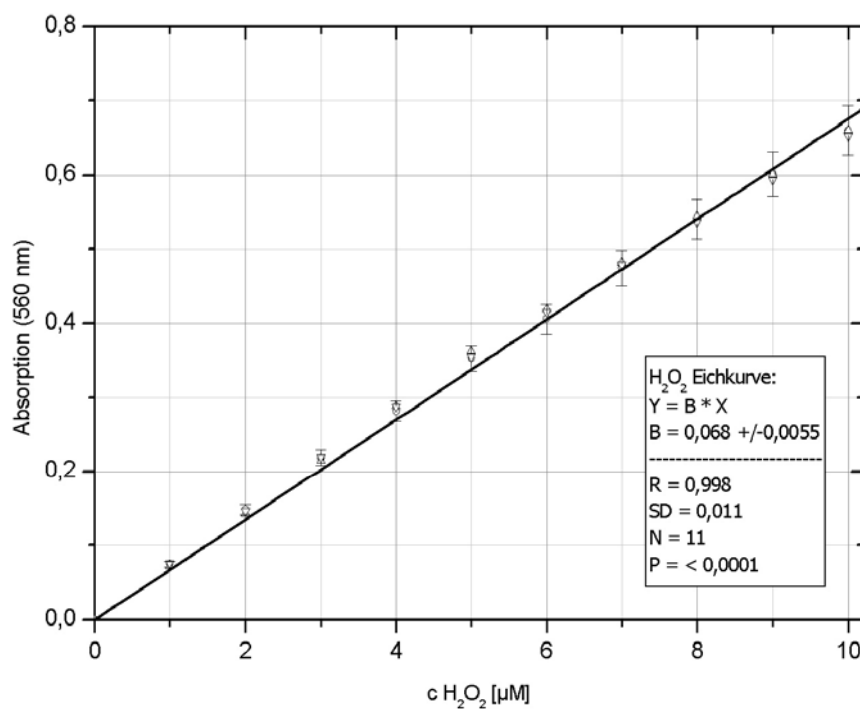


Abbildung 3.13: Beziehung zwischen Absorption und Konzentration von H_2O_2 bzw. Eichkurve für H_2O_2 . Extinktionskoeffizient = $6.8 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

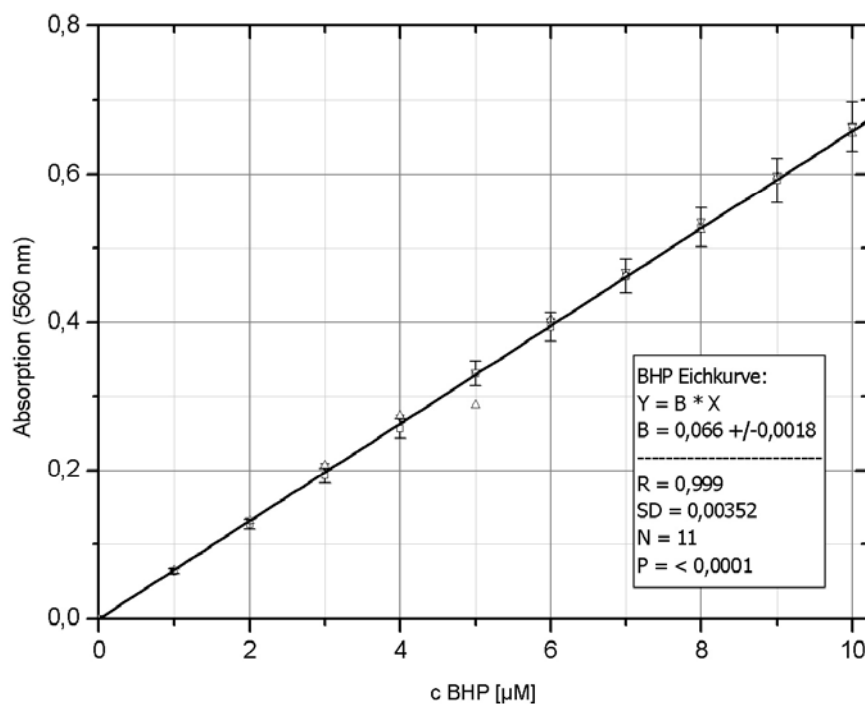


Abbildung 3.14: Beziehung zwischen Absorption und Konzentration von BHP (Butylhydroperoxid) bzw. Eichkurve für BHP. Extinktionskoeffizient = $6.6 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

3.2.4 Störfaktoren

Xylenol Orange wurde ursprünglich neben der Quantifizierung von Fe^{3+} -Ionen [Makoto Otomo, 1965] zur Bestimmung von Titan [Makoto Otomo, 1963], Aluminium [Molot, 1966] und Glucose [Tammes, Nordschow, 1968] verwendet. Hierbei zeigte sich, dass insbesondere Kationen (z.B. Zink, Eisen, Cadmium) Störfaktoren darstellen. Die hohe Verfügbarkeit von Eisen im Blut macht es zu einem besonders relevanten Störfaktor. Anhand von Kupfer-Ionen sollte im folgenden demonstriert werden, dass auch andere Spurenelemente Störpotentiale aufweisen.

Um die Interaktion von Kupfer mit dem FOX-Test zu überprüfen, wurde jeweils ein Spektrum (400-800 nm) des FOX-Reagenz vor und nach Zugabe von Cu^{2+} -Ionen gemessen. Abbildung 3.15 zeigt eine Absorptionsspitze bei 560 nm nach Zugabe von 20 μM Cu^{2+} zum FOX-Reagenz. Die Absorptionserhöhung an dieser Stelle beträgt 0.95. Das Maximum des Signals befindet sich im Messbereich des FOX-Tests (560 nm). Aufgrund dieser Absorptionserhöhung muss bei Anwesenheit von freiem Kupfer mit falsch hohen Ergebnissen gerechnet werden. Die unten beschriebene Verwendung von TPP ermöglicht es, den Einfluss von Kupfer zu kompensieren.

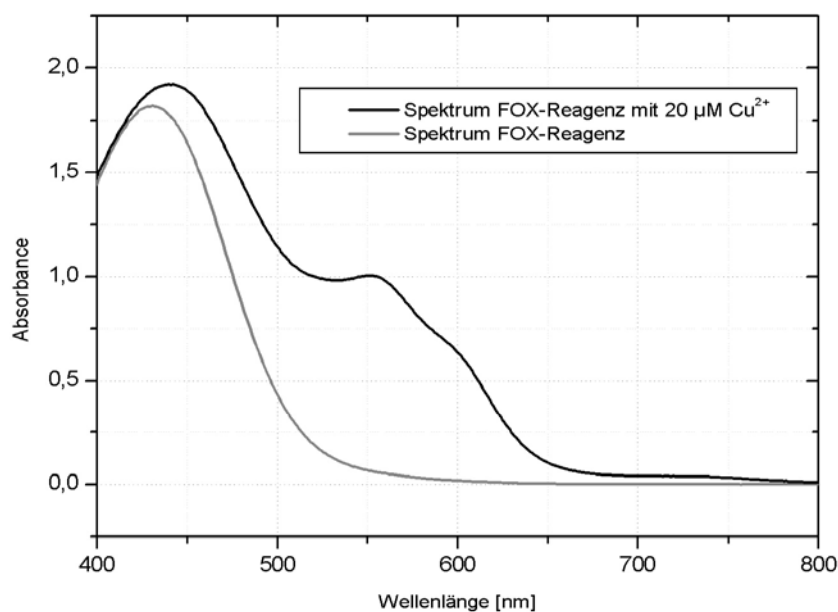


Abbildung 3.15: Spektrum des FOX-Reagenz mit und ohne Zugabe von Cu^{2+} . Bereich von 400-800 nm.

Eisen

Nach Zugabe von Eisen (Fe^{3+}) fanden sich konzentrationsabhängige Veränderungen im Spektrum des FOX-Reagenz (siehe Kapitel 2, Abbildung 2.2). Enthalten die Proben bei Erstellung der Eichkurve neben dem Peroxid eine definierte Menge an Fe^{3+} , so beobachtet man eine konzentrationsabhängige Parallelverschiebung der Gerade nach oben (Abbildung 3.16). Enthält eine Probe $10\text{ }\mu\text{M Fe}^{3+}$, so steigt die Absorption nach Zugabe von Peroxiden um ca. 0,18 höher an als bei einer entsprechenden eisenfreien Probe. Enthält eine Probe $10\text{ }\mu\text{M Fe}^{3+}$, so erhöht sich die Absorption um ca. 0,18 gegenüber der eisenfreien Probe. Eine Absorption von 0.18 entspricht einer Peroxidkonzentration von $2,7\text{ }\mu\text{Mol}$. Unter Berücksichtigung der gemessenen Peroxidkonzentrationen im Plasma gesunder Probanden (s. Kapitel 3.2.5) ist die Bedeutung von freiem Eisen als Störfaktor erheblich.

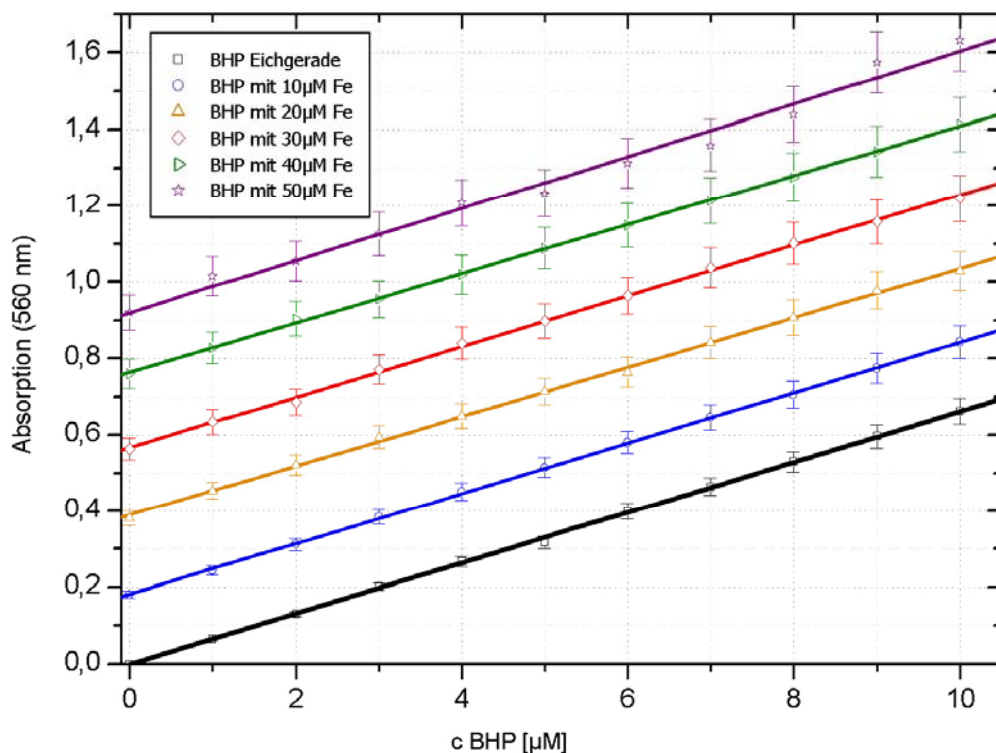


Abbildung 3.16: Parallelverschiebung der Eichkurve von BHP nach Zugabe von 10-50 $\mu\text{M Fe}^{3+}$

3.2.5 Triphenylphosphat (TPP)

Wie bereits in Kapitel 2.3 beschrieben, führt Triphenylphosphat zu einer Reduktion von Lipidperoxiden zum korrespondierenden Alkohol. Nach Zugabe in einer Konzentration von 1 mM, werden die Lipidperoxide aus der Probe entfernt und sind somit nicht mehr an der Signalgebung beteiligt [Nourooz-Zadeh et al, 1994].

Die Verwendung von TPP zur Bestimmung des Hintergrundsignals ist nützlich, um falsch hohe Ergebnisse zu vermeiden. Störfaktoren wie z.B. freies Fe^{3+} generieren ein Hintergrundsignal. Der Absorptionswert einer Probe wird einerseits durch die Reaktion der Lipidperoxide hervorgerufen, zusätzlich aber auch durch Interaktionen der in der Probe enthaltenen Störfaktoren. Es muss davon ausgegangen werden, dass sich im Plasma multiple Störfaktoren (Fe^{3+} , Kupfer und andere Spurenelemente) befinden. Die Verwendung von TPP ermöglicht es, die Lipidperoxide selektiv aus der Probe zu entfernen. Die resultierende Absorption muss somit durch die Störfaktoren generiert werden, und kann von der Absorption der Gesamtprobe (ohne TPP) subtrahiert werden:

Probe ohne TPP = Abs. (Lipidperoxide, H_2O_2 , Fe^{3+} , andere Störfaktoren)

Probe mit TPP = Abs. (H_2O_2 , Fe^{3+} , andere Störfaktoren)

Abs. (Lipidperoxide) = Abs. Probe ohne TPP – Abs. Probe mit TPP

Nach 30minütiger Inkubation von Butylhydroperoxid mit 10mM TPP und Durchführung des FOX-Tests ist kaum ein Signal messbar (Abbildung 3.17).

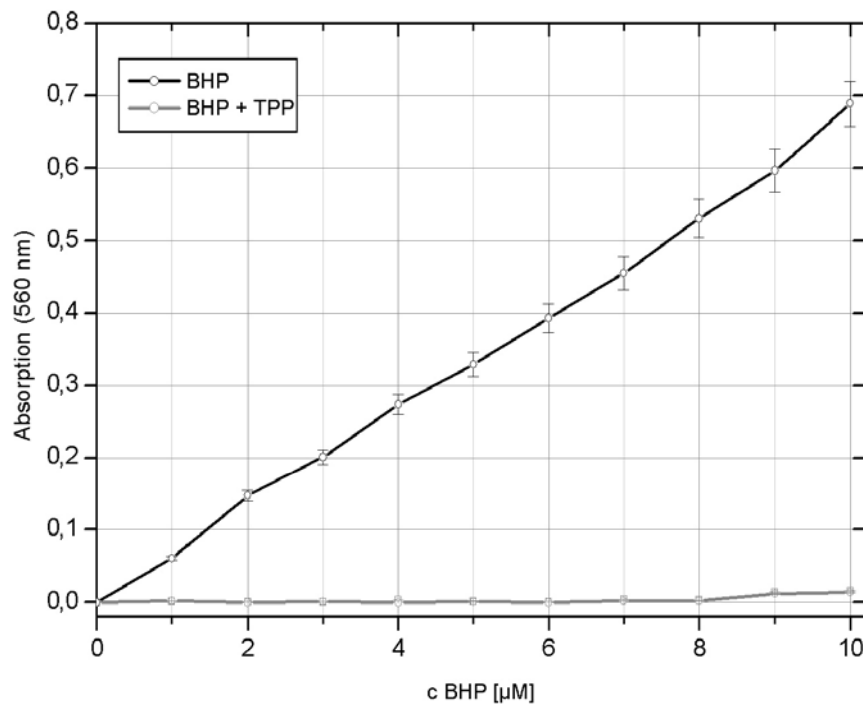
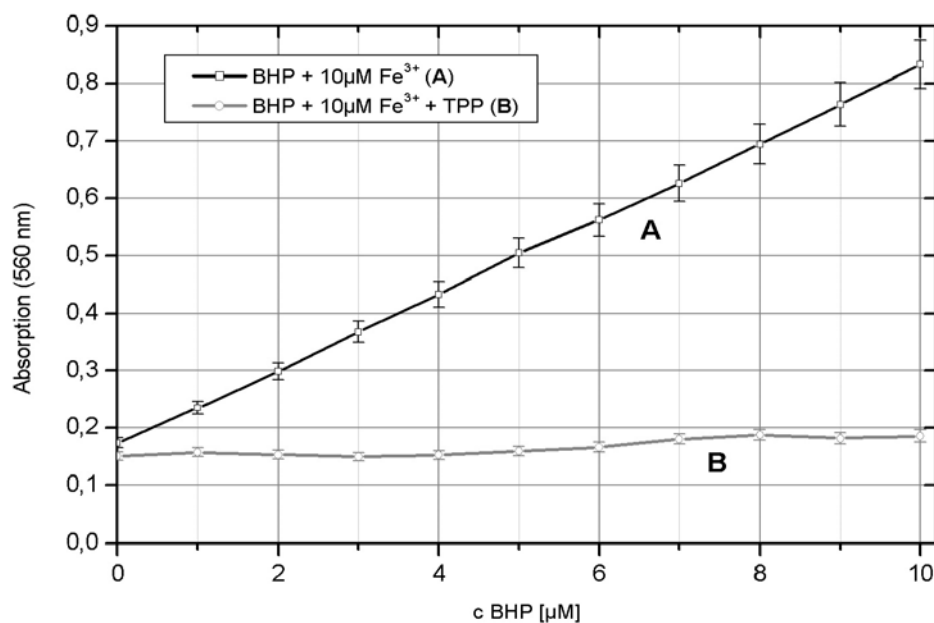


Abbildung 3.17: FOX-Test mit 1-10 μM BHP vor und nach 30minütiger Inkubation mit 10 mM TPP.

Im gleichen Versuchsansatz mit zusätzlich 10 μM Fe^{3+} in der Probe, wird das Hintergrundsignal durch den Störfaktor Eisen nach der Zugabe von TPP darstellbar (Abbildung 3.18). Das BHP wurde durch TPP reduziert und kann somit Fe^{2+} nicht mehr zu Fe^{3+} oxidieren. Das Signal (Kurve B in Abbildung 3.18) mit einer mittleren Absorption von 0,71 kann somit nur Folge einer Reaktion mit dem zugegebenen Fe^{3+} sein. Subtrahiert man diesen Wert von dem Gesamtsignal (Kurve A in Abbildung 3.18), so erhält man den erwarteten Absorptionswert des BHP in einem Testansatz ohne zugefügtes Eisen. In Tabelle 3.2 ist dies für jeden Wert vorgenommen und in Abbildung 3.19 aufgetragen. Abbildung 3.19 stellt die Differenz der Kurven A und B aus Abbildung 3.18 dar, und entspricht im wesentlichen der Eichkurve für BHP. Vergleicht man diese Abbildung mit Abbildung 3.14 und berechnet anhand der Gerade den Extinktionskoeffizienten, so erhält man den gleichen Wert für BHP ($6.6 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) wie bereits oben ermittelt. Es ist demnach gelungen, den Störfaktor Eisen nach Zugabe von TPP herauszurechnen und das Signal des Butylhydroperoxids darzustellen.

Abbildung 3.18: Darstellung des Hintergrundsignals (grau) durch Fe³⁺ unter Verwendung von TPP (10 mM)

c BHP [µM]	Absorption BHP + 10 µM Fe	Absorption BHP + 10 µM Fe + TPP	Mittelwert der Absorptionswerte nach Inkubation mit TPP	Differenz
0	0,173	0,156	0,171	0,002
1	0,235	0,163	0,171	0,064
2	0,299	0,159	0,171	0,128
3	0,368	0,154	0,171	0,197
4	0,433	0,16	0,171	0,262
5	0,505	0,166	0,171	0,334
6	0,562	0,173	0,171	0,391
7	0,626	0,189	0,171	0,455
8	0,694	0,191	0,171	0,523
9	0,764	0,179	0,171	0,593
10	0,833	0,185	0,171	0,662

Tabelle 3.2: Berechnung der Absorption nur durch BHP

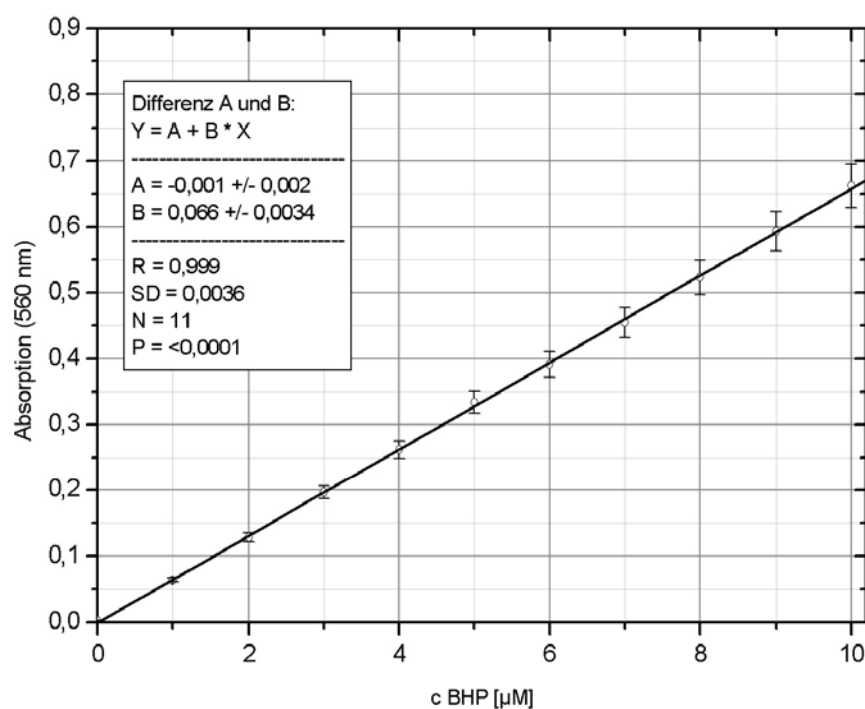


Abbildung 3.19: Graph der Differenzwerte aus Tabelle 3.2. Die Kurve entspricht der Eichkurve von BHP.

3.2.6 Lipidperoxidation im Plasma gesunder Probanden

Lipidperoxide im Plasma von 17 gesunden Probanden im Alter von 22-56 Jahren wurden mit dem FOX-Test untersucht. Hierbei wurden 2 Proben entnommen und eine wie bereits oben beschrieben für 30 Minuten mit TPP inkubiert.

Es konnten Lipidperoxidwerte von 0.12 bis 7.15 μM mit einem Mittelwert von 2.2 μM und einer Standardabweichung von 1.9 μM gemessen werden.

Proband	Absorption	Absorption mit TPP	Differenz	Plasma Lipidperoxide [μM]
11	0,039	0,031	0,008	0,12
6	0,034	0,010	0,024	0,37
5	0,045	0,020	0,025	0,38
13	0,112	0,074	0,038	0,58
3	0,074	0,024	0,05	0,76
8	0,091	0,034	0,057	0,86
4	0,129	0,065	0,064	0,97
10	0,097	0,029	0,068	1,03
12	0,153	0,069	0,084	1,27 (med)
7	0,139	0,029	0,110	1,66
15	0,195	0,028	0,167	2,53
14	0,257	0,039	0,218	3,3
17	0,265	0,04	0,225	3,4
1	0,419	0,168	0,251	3,80
16	0,314	0,037	0,277	4,19
9	0,389	0,101	0,288	4,36
2	0,512	0,04	0,472	7,15

Tabelle 3.3: Lipidperoxide im Plasma von 17 gesunden Probanden

3.2.7 Validierung des Miniphotometers

Die Validierung des Miniphotometers erfolgte durch den Vergleich zum Zweistrahlsspektrometer Lambda 19 von Perkin Elmer. Hierzu wurden 167 Messwerte aus Versuchen die an beiden Geräten durchgeführt wurden korreliert.

Wie Abbildung 3.20 verdeutlicht, besteht eine hochsignifikante Korrelation zwischen dem Miniphotometer und dem Spektrometer Lambda 19 mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit (P) von < 0.0001 . Die 99,9 % Konfidenzintervalle liegen so dicht an der Linear Fit Gerade, dass sie graphisch nicht darstellbar sind.

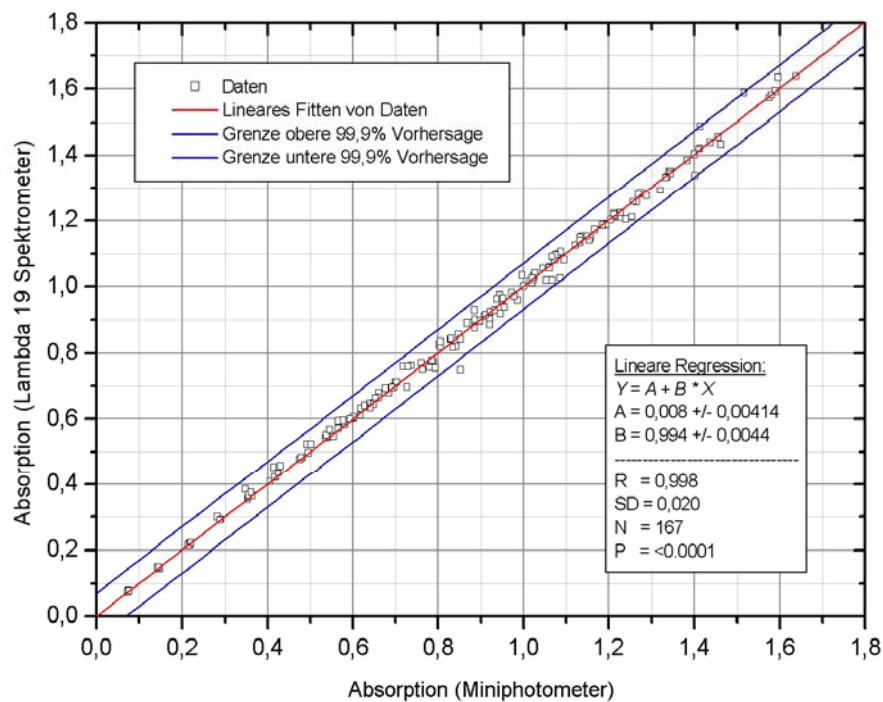


Abbildung 3.20: Korrelation zwischen Miniphotometer und Spektrometer Lambda 19 bei 167 Messungen

4 DISKUSSION

Es wurde ein Miniphotometer entwickelt, das in der Lage ist, Absorptionsmessungen an bestimmten Wellenlängen einfach und kostengünstig durchzuführen. Es besteht aus einer einfachen LED-Lichtquelle, die nach Einschalten innerhalb weniger Sekunden konstant leuchtet. Je nach Wahl der LED besitzt das emittierte Licht mit geringen Abweichungen bereits die benötigte Wellenlänge. Hierdurch kann auf dispersive Elemente zur Monochromatisierung des Lichts verzichtet werden. Wesentliche Vorteile ergeben sich aus der schnell erreichten Leuchtstabilität der LED, der langen Lebensdauer und den geringen Kosten. Der Detektor besteht aus einer Photodiode, die ein Frequenz-Signal proportional zum Photostrom ausgibt. Ein Mikroprozessor steuert die LED an, regelt den Versuchsablauf, berechnet die Absorptionswerte und stellt diese auf einem Display dar.

Es bietet sich an, für dieses einfache kostengünstige Miniphotometer (Materialkosten ca. 100 Euro) Anwendungen zu finden, die von breitem Interesse sind. In der vorliegenden Arbeit wurde der FOX-Test, ein Verfahren zur Messung von Lipidperoxiden, herangezogen. Lipidperoxide sind als Folge von oxidativem Stress interessante Parameter um die Radikalbelastung in vitro zu überprüfen. Die FOX-Methode basiert auf einer Oxidation von Fe^{2+} zu Fe^{3+} durch Lipidperoxide. Die gebildeten Fe^{3+} Ionen werden durch den Farbstoff Xylenol Orange komplexiert und bilden ein Absorptionsmaximum bei 560 nm. Die Inkubation einer zweiten Probe mit Triphenylphosphat, einem spezifischen Reduktionsmittel für Lipidperoxide, ermöglicht die differenzspektroskopische Kompensation von Störfaktoren.

Die vorliegende Arbeit bestätigt prinzipiell die von den Autoren [*Jiang et al*, 1992; *Nourooz-Zadeh*, 1994; *Wolff*, 1994] publizierten Beobachtungen bezüglich der FOX-Methode. Folgende Ergebnisse sollten dabei diskutiert werden:

Es bestehen signifikante Unterschiede des Farbstoffs Xylenol Orange in Abhängigkeit der Herstellerwahl. Im Vergleich der Spektren des FOX-Reagenz jeweils mit Xylenol Orange von Sigma und Aldrich zeigte sich eine geringere Absorption im Bereich von 420 bis 580 nm bei Verwendung des Aldrich Produktes (s. Kapitel 3, Abbildung 3.9). Die Bestimmung der Extinktionskoeff-

fizienten für Fe^{3+} und H_2O_2 brachte ebenfalls herstellerspezifische Unterschiede hervor. Die Differenz betrug hierbei $0.9 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ für Fe^{3+} und $1.4 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ für H_2O_2 . Um vergleichbare Ergebnisse zu erhalten, sollte deshalb das Xylenol Orange von einem Hersteller herangezogen werden.

In früherer Literatur wird die Einhaltung von 30 Minuten Inkubationszeit vorgeschlagen [Jiang et al, 1992]. Eigene Messungen haben ergeben, dass bei der FOX-Reaktion nach 20 Minuten nur noch 2 % Absorptionszuwachs zu erwarten sind. Unter Berücksichtigung dieser Ergebnisse (s. Kapitel 3, Abbildung 3.11), ist eine Inkubationszeit von 20 Minuten ausreichend.

Bei Erstellung der Eichkurven wurden leicht höhere Absorptionswerte als in früheren Publikationen gemessen. Messungen mit $1\text{-}10 \mu\text{M}$ H_2O_2 bzw. Butylhydroperoxid ergaben Extinktionskoeffizienten von $6.8 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ für H_2O_2 und $6.6 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ für BHP. Der gemessene Extinktionskoeffizient für Fe^{3+} beträgt $1.8 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Es werden pro Mol Peroxid demnach ca. 3.7 Mol des Eisen(III)-Xylenol Orange Komplexes gebildet. Diese stöchiometrische Ungenauigkeit der FOX-Reaktion kann auf eine Kettenoxidation von Fe^{2+} zurückgeführt werden. Jiang et al bestimmten 1990 und 1991 Extinktionskoeffizienten für H_2O_2 und Fe^{3+} von $4.56 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ und $1.5 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [Jiang et al, 1990; Jiang et al, 1991].

Blutplasma als komplexes System beinhaltet zahlreiche Faktoren die den FOX-Test stören können. Insbesondere bilden neben Eisen(III) auch andere Spurenelemente Komplexe mit dem Farbstoff Xylenol Orange [Paull et al, 1999]. Die Tatsache, dass Eisen wesentlicher Bestandteil der Nachweisreaktion ist, legt nahe, dass zusätzlich im Test befindliche Eisenmengen den Test beeinflussen. In dem methanolhaltigen, schwach sauren Milieu des FOX-Reagenz kommt es zur Denaturierung der Serumproteine. Das an das Transportprotein Transferrin gebundene dreiwertige Eisen wird hierdurch zumindest teilweise freigesetzt und steht der Komplexbildung mit Xylenol Orange zur Verfügung. Der Referenzwert für Eisen im Serum/Plasma liegt bei Männern im Bereich von 10,6 bis 28,3 $\mu\text{mol/l}$ bzw. bei Frauen zwischen 6,6 und 26,0 $\mu\text{mol/l}$ [Weippl et al, 1973]. Bei Abnahmefehlern (z.B. Hämolyse) oder einer Eisenüberladung (Hämochromatose, Hepatitis, intravenöse Eisenpräparate), können diese Werte wesentlich höher liegen und dement-

sprechend ein höheres Störsignal generieren. Befinden sich in der Probe zusätzlich $10 \mu\text{M Fe}^{3+}$, so erhöht sich die Absorption um ca. 0,18 gegenüber einer Probe ohne Eisenzugabe (s. Kapitel 3.2.4). Eine Absorptionserhöhung der Probe von 0,18 entspricht einer Erhöhung der Lipidperoxidkonzentration um $2,7 \mu\text{M}$. Unter Berücksichtigung der gemessenen Peroxidkonzentrationen im Plasma gesunder Probanden (s. Kapitel 3.2.5) hat freies Eisen als Störfaktor der FOX-Methode eine erhebliche Bedeutung.

Zusätzlich wurde bewiesen, dass Kupfer-Ionen mit Xylenol Orange interagieren, und den FOX-Test stören können (s. Kapitel 3.2.4). Die Normalwerte im Plasma für Kupfer betragen $11\text{-}22 \mu\text{mol/l}$ bei Männern, und $12\text{-}24 \mu\text{mol/l}$ bei Frauen. Die Konzentration an freiem Kupfer im Plasma ist sehr gering ($< 10 \mu\text{g/dl}$), da der überwiegende Teil fest in Coeruloplasmin eingebaut ist [Mason, 1979]. Besonders bei Erkrankungen, die mit einer höheren Konzentration an freiem Kupfer im Plasma einhergehen (z.B. Leberversagen, Morbus Wilson), könnten falsch hohe Ergebnisse entstehen.

Störfaktoren generieren letztendlich durch die Interaktion mit dem FOX-Test einen Absorptionswert. Triphenylphosphat führt durch spezifische Reduktion der Lipidperoxide in der Probe zu Darstellung der Summe aller signalgebenden Störfaktoren (z.B. H_2O_2 , Eisen, Kupfer). Es besteht die Notwendigkeit 2 Proben zu messen. Die erste Probe wird vorher mit TPP inkubiert und enthält somit keine Lipidperoxide mehr. Die zweite Probe wird direkt gemessen und enthält Lipidperoxide und Störfaktoren. Durch Subtraktion erhält man den durch Lipidperoxide generierten Extinktionswert. Da im Blutplasma mit weiteren Störfaktoren gerechnet werden muss, ist die Verwendung von TPP essentiell. Dies führt zu einer Verdopplung der Zeit eines Testablaufs, da eine Inkubationszeit der Probe mit TPP von 30 Minuten eingehalten werden muss.

Im Verlauf der Versuche ergab sich eine hochsignifikante Korrelation zwischen Miniphotometer und dem Zweistrahlenspektrometer Lambda 19 von Perkin Elmer. In keinem Versuch gab es relevante Abweichungen. Das Miniphotometer liefert damit zuverlässig und schnell die gefragten Werte. Die Durchführung der Versuche gestaltete sich besonders einfach durch die unkomplizierte Bedienung des Miniphotometers. Die kurze Aufwärmzeit

ermöglichte es, innerhalb von Sekunden nach Einschalten des Gerätes erste Absorptionswerte zu messen. Für die weitere Entwicklung des Gerätes wäre eine serielle Schnittstelle für die Verbindung mit einem Computer sinnvoll. Neben der Vermeidung von Ablesefehlern könnte hiermit die Datenverarbeitung erleichtert werden. Im Bezug auf die Praktikabilität ist das Miniphotometer besonders für die Durchführung von photometrischen Tests unter einfachen Laborbedingungen (z.B. in der Praxis) geeignet. Die Bestimmung von Lipidperoxiden unter der Verwendung des hier dargestellten Miniphotometers ist somit sehr gut für die schnelle Abschätzung der Lipidperoxide im Plasma geeignet.

An einem kleinen Kollektiv ($n=17$) wurden die Plasmakonzentrationen von Lipidperoxiden bestimmt. Es konnten Werte von 0.12 bis 7.15 μM mit einem Mittelwert von 2.2 μM und einer Standardabweichung von 1.9 μM gemessen werden. Ebenfalls mit der FOX-Methode bestimmten Nourooz-Zadeh et al 1993 bei 23 Individuen Lipidperoxidwerte von 0.22 bis 7.8 μM mit einem Mittelwert von 3.02 μM und einer Standardabweichung von 1.85 μM [Nourooz-Zadeh et al, 1994].

Der Aussagewert von Einzelbestimmungen ist ohne gültige Referenzwerte eingeschränkt. Um valide Normalwerte zu bestimmen, muss jedoch ein größeres Kollektiv untersucht werden. Es stellt sich die Frage, ob es wirklich sinnvoll ist, zu diesem Zeitpunkt Normalwerte zu erheben, da das Gebiet noch nicht ausreichend erforscht ist. Der Einfluss z.B. durch Ernährung, Rauchen, Infekte, sportliche Betätigung, Umweltbelastung und des Antioxidantienstatus auf die messbaren Lipidperoxide im Plasma müssen noch weiter geklärt werden. Es bietet sich daher an, den FOX-Test mit dem hier vorgestellten Miniphotometer zur Verlaufsbeobachtung von oxidativen Stresssituationen zu verwenden.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Die Lipidperoxidation wird als wichtiger pathophysiologischer Faktor zahlreicher Erkrankungen und des Alterungsprozesses angesehen. In vivo Bestimmungen von Lipidperoxiden erfordern oft einen hohen apparativen Aufwand, sind kostenintensiv und unter einfachen Laborbedingungen kaum durchführbar. Ziel dieser Arbeit war es die Messung der Lipidperoxide unter basalen Laborbedingungen zu ermöglichen. Dies sollte sowohl eine apparative Innovation in Form eines Miniphotometers ermöglichen, als auch die Anwendung und Validierung der im Folgenden beschriebenen FOX-Methode.

Die 1973 von Gupta erstbeschriebene und von Jiang et al 1991 weiterentwickelte FOX-Methode stellt einen leicht durchführbaren photometrischen Test zur Bestimmung der Lipidperoxide im Blutplasma dar. Die Methode basiert auf einer durch Lipidperoxide vermittelten Oxidation von Fe^{2+} zu Fe^{3+} im sauren Milieu. Die Fe^{3+} Ionen bilden dabei einen Farbkomplex mit Xylenol Orange mit einem Absorptionsmaximum bei 560 nm.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Miniphotometer entwickelt, dass sich aufgrund seiner einfachen Bedienbarkeit und seines kostengünstigen Aufbaus besonders für die Anwendung der FOX-Methode eignet. Ein wichtiges Merkmal ist die Verwendung einer LED als Lichtquelle. Da die LED bereits in der erforderlichen Messwellenlänge strahlt, wird auf eine Monochromatisierung des Lichts verzichtet. Weitere Vorteile der LED sind das geringe Intervall bis zur konstanten Lichtemission, die lange Lebensdauer und die geringen Kosten. Die Steuerung erfolgt über einen Mikroprozessor. Die Messwerte können an einem Display abgelesen werden.

Die FOX-Methode und das Miniphotometer werden im Verlauf dieser Arbeit validiert. Dabei stellt sich heraus, dass die FOX-Methode besonders für die Bestimmung von Lipidperoxiden unter basalen Laborbedingungen geeignet ist. Die Ergebnisse bestätigen die Zuverlässigkeit des Miniphotometers. Die Ermittlung von Normalwerten und die Überprüfung von Einflussfaktoren (Rauchen, Ernährung, Umweltbelastung) auf die Lipidperoxidation im Blutplasma würden dieses Forschungsgebiet bereichern.

6 LITERATURVERZEICHNIS

Basum G. von, Dahnke H., Halmer D., Hering P., Mürtz M.: Online recording of ethane traces in human breath via infrared laser spectroscopy. *J Appl Physiol* 2003, 95: 2583-2590.

Biesalski H.: The role of antioxidants in nutritional support. *Nutrition* 2000, 16: 593-596.

Burton G.W., Joyce A., Ingold K.U.: First proof that vitamin E is the major lipid-soluble, chain-breaking antioxidant in human blood plasma. *Lancet* 1982, 2: 327.

Burton G.W., Ingold K.U.: Vitamin E as an in vitro and in vivo antioxidant. *Ann NY Acad Sci* 1989, 570: 7-22.

Chirico S.: High performance liquid chromatography-based thiobarbituric acid tests. *Methods Enzymol* 1994, 233: 314-318.

Czapski G., Ilan Y. : *Photochemistry Photobiology* 1978, 28 : 651-653.

Diplock A.T.: Fat-soluble vitamins, their biochemistry and applications. London: Heinemann, 1985: 154-224.

Diplock A.T., Charleux J.L., Crozier-Willi G., Kok F.J., Rice-Evans C., Roberfroid M., Stahl W., Vina-Ribes J.: Functional food science and defence against reactive oxidative species, *British Journal of Nutrition* 1998, 80: 82 – 84.

Gabig T.G., Babior B.M.: The O₂⁻-forming Oxidase Responsible for the Respiratory Burst in Human Neutrophils. *J. Biol. Chem.* 1979, 254: 9070-9074.

Gay C., Collins J., Gebicki J.M.: Hydroperoxide assay with the ferric-xylenol orange complex. *Anal Biochem* 1999, 273: 149-155.

Gerthsen C., Kneser H.O., Vogel H.; *Physik* s.520-521. 16. Auflage, Springer Heidelberg, 1989.

Gupta B.L.: Microdetermination Techniques for H₂O₂ in Irradiated Solutions. *Microchem J* 1973, 18: 363-374.

Gutteridge J.M.: Aspects to consider when detecting and measuring lipid peroxidation. *Free Radic Res Com* 1986, 1: 173-184.

Gutteridge J.M., Halliwell B.: The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. Trends Biochem Sci, 1990, 15: 129-135.

Gutteridge J.M.: Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. Clin Chem 1995, 41: 1819-1828.

Halliwell B.: How to characterize a biological antioxidant. Free Radic Res Commun 1990, 9: 1.32.

Halliwell B., Chirico S.: Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. Am J Clin Nutr 1993, 57: 715-725.

Halliwell B., Gutteridge J.M.: Role of iron in oxygen radical reactions. Methods Enzymol. 1984, 105: 47-56.

Halliwell B., Gutteridge J.M.: Free radicals in biology and medicine. 2nd ed. Oxford: Clarendon Press 1989.

Halliwell B.: Free radicals and antioxidants: a personal view. Nutr Rev 1994, 52: 253-265.

Halliwell B., Antioxidants and human disease: a general introduction. Nutr Rev 1997, 55: 44-49.

Hermes M., Willmore W.G., Storey KB: Quantification of lipid peroxidation in tissue extracts based on Fe^(III)xylénol orange complex formation. Free Radic Biol Med 1995, 19: 271-280.

Hyslop P.A., Hinshaw D.B., Halsey W.A. Jr., et al.: Mechanisms of oxidant mediated cell injury: the glycolytic and mitochondrial pathways of ADP phosphorylation are major intracellular targets inactivated by hydrogen peroxide. J Biol Chem 1988, 263: 1665-1675.

Janero D.R.: Malodialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipiperoxidation and peroxidative tissue injury. Free Radic Biol Med 1990, 9: 515-540.

Jiang Z.Y., Woollard A., Wolff S.P.: Hydrogen peroxide production during experimental protein glycation. FEBS Lett 1990, 268: 69-71.

Jiang Z.Y., Woollard A., Wolff S.P.: Lipid hydroperoxide measurement by oxidation of Fe²⁺ in the presence of xylénol orange. Comparison with the TBA assay and an iodometric method. Lipids 1991, 26: 853-856.

Jiang Z.Y., Hunt J.V., Wolff S.P.: Ferrous ion oxidation in the presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxide in low density lipoprotein. *Anal Biochem* 1992, 202: 384-389.

Kappus H., Sies H.: Toxic drug effects associated with oxygen metabolism: redox cycling and lipid peroxidation. *Experientia* 1981, 37: 1233-1241.

Makoto Otomo: Photometric determination of titanium with H_2O_2 and xylenol orange. *Bull. Chem* 1963, 36: 1341-1346.

Makoto Otomo: Composition of the xylenol orange complexes of Fe^{+++} and their application to the determination of iron or xylenol orange. *Bunseki Kagaku* 1965, 14: 677-682.

Marshall P.J., Warso M.A., Lands W.E.M.: Selective microdetermination of lipid hydroperoxides. *Anal Bioch* 1985, 145: 192-199.

Mason K.E.: A conspectus of research on copper metabolism and requirements of man. *J Nutr* 1979, 109: 1979-2066.

Molot L.A., Mustafin I.S., Zagrebina R.F.: Determination of coexistent aluminium and iron with xylenol orange. *Izv. Vyssh. Ucheb. Zaved.* 1966, 9: 873-875.

Nourooz-Zadeh J., Tajaddini-Sarmadi J., Wolff P.: Measurement of plasma hydroperoxide concentrations by the ferrous oxidation xylenol orange assay in conjunction with triphenylphosphine. *Anal Bioch* 1994, 220: 403-409.

Paull B., Haddad P.R.: Chelation ion chromatography of trace metal ions using metallochromic ligands. *Trends in Analytical Chemistry* 1999, 18: 107-113.

Rice-Evans C., Leake D., Bruckdorfer K.R., Diplock A.T.: Practical approaches to low density lipoprotein oxidation: Whys, wherefores and pitfalls. *Free Rad Res*, 1996, 25: 285-311.

Ross D., Moldeus P.: Antioxidant defense systems and oxidative stress. *CRC State of the Art Series on Membrane Lipid Oxidation*, 1991, Vol. 2: 151-170. CRC Press.

Sastre J., Pallardo F.V., Asuncion J. G. de la, Vina J.: Mitochondria, oxidative stress and aging. *Free Radic Res* 2000, 32: 189-198.

Sies H., Oxidative stress: from basic research to clinical application.

American Journal of Medicine 1991, 91: 31-39.

Slater T.F.: Free-radical mechanisms in tissue injury. Biochem J 1984, 222: 1-15.

Von Sonntag C.: The chemical basis of radiation biology. London: Taylor and Francis, 1987.

Steinberg D.: Oxidative modification of LDL and arteriogenesis. Circulation 1997, 95: 1062-1071.

Tammes A.R., Nordschow C.D. : An approach to specificity in glucose determinations. Amer. J. Clin. Pathol. 1968, 49: 613.

Wagner B.A., Buettner G.R., Burn C.P.: Free radical-mediated lipid peroxidation in cells: oxidizability is a function of cell lipid bis-allylic hydrogen content. Biochemistry 1994, 33: 4449-4453.

Weippl G., Pantlitschko M., Bauer P., Lund S.: Blut 1973, 27: 261.

Wolff S.P.: Ferrous Ion Oxidation in Presence of Ferric Ion Indicator Xylenol Orange for Measurement of Hydroperoxides. Methods in Enzymology 1994, 233: 182-189.

7 DANKSAGUNG

Meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. R. Bayer gilt besonderer Dank für das interessante und aktuelle Thema, die intensive Betreuung und die Ermöglichung, eine Dissertation unter außerordentlich guten Rahmenbedingungen verfassen zu können.

Herrn Dr. G. Laschinski danke ich für die stets freundliche Beratung hinsichtlich der Methodik und der Grundlagen dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. S. Cleveland danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferates.

Meinem Kommilitonen und Mitdoktoranden Herrn L. Schlösser danke ich für die treue Begleitung während des Studiums und seine Freundschaft.

Darüber hinaus danke ich allen Mitarbeitern des Instituts für Lasermedizin für die angenehme Arbeitsatmosphäre und stetige Hilfsbereitschaft.

Großer Dank gilt meiner Mutter Vera Lange, die mich während des Studiums stets unterstützt hat.

Ebenso gilt mein besonderer Dank meinem Bruder Kai Lange, der mich überhaupt erst zum Studium der Humanmedizin bewegt hat.

Meiner Frau Monika Lange danke ich ganz besonders für ihr liebevolles Verständnis und ihre stete Hilfsbereitschaft während der Erstellung dieser Arbeit.

Meiner Tochter Antonia Lange möchte ich für Ihr unkompliziertes Wesen in Ihrem ersten Lebensjahr und die damit verbundene Erleichterung meiner Tätigkeit danken.

LEBENS LAUF

Name: Tim Lange

Geburtsdatum: 27.06.1976

Geburtsort: Neuss

Eltern: Vera Lange, geb. am 10.06.1942
Gerd Lange, geb. am 9.10.1939, Bankdirektor, 1991 verstorben

Familienstand: verheiratet, 1 Kind

Schulbildung: 1982 - 1986: Agnes Miegel Schule, Willich
1986 - 1988: Deutsche Schule London, Richmond,
1988 - 1990: American Community School, Cobham,
1990 - 1993 : International School of Düsseldorf,
1993 - 1997 : Cecilien Gymnasium, Düsseldorf
1997: Abitur

Universitätsstudium: 1997 – 2004: Studium der Humanmedizin
an der Heinrich-Heine-
Universität Düsseldorf

März 2000: Physikum
März 2001: 1. Staatsexamen
März 2003: 2. Staatsexamen
2003-2004: Praktisches Jahr
April 2004: 3. Staatsexamen
Oktober 2004: Approbation als Arzt

Promotion: Promotionsarbeit bei Prof. R. Bayer, Institut für Lasermedizin,
Universitätsklinikum Düsseldorf

Thema: „Entwicklung und Anwendung eines Miniphotometers
zur Messung der Lipidperoxidation im Plasma mittels der
FOX-Methode“

Düsseldorf, den 16. Dezember 2004

(Tim Lange)

Zusammenfassung (Abstract)

Entwicklung und Anwendung eines Miniphotometers zur Messung der Lipidperoxidation im Plasma mittels der FOX-Methode

Die Lipidperoxidation wird als wichtiger pathophysiologischer Faktor zahlreicher Erkrankungen und des Alterungsprozesses angesehen. In vivo Bestimmungen von Lipidperoxiden erfordern oft einen hohen apparativen Aufwand, sind kostenintensiv und unter einfachen Laborbedingungen kaum durchführbar. Ziel dieser Arbeit war es die Messung der Lipidperoxide unter basalen Laborbedingungen zu ermöglichen. Dies sollte sowohl durch eine apparative Innovation in Form eines Miniphotometers realisiert werden, als auch die Anwendung und Validierung der im Folgenden beschriebenen FOX-Methode.

Die 1973 von Gupta erstbeschriebene und von Jiang et al 1991 weiterentwickelte FOX-Methode (Ferrous Oxidation using Xylenol Orange) stellt einen leicht durchführbaren photometrischen Test zur Quantifizierung der Lipidperoxide im Blutplasma dar. Die Methode basiert auf einer durch Lipidperoxide vermittelten Oxidation von Fe^{2+} zu Fe^{3+} im sauren Milieu. Die Fe^{3+} Ionen bilden dabei einen Farbkomplex mit Xylenol Orange mit einem Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 560 nm.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Miniphotometer entwickelt, dass sich aufgrund seiner einfachen Bedienbarkeit und seines kostengünstigen Aufbaus besonders für die Anwendung der FOX-Methode eignet. Ein wichtiges Merkmal ist die Verwendung einer LED als Lichtquelle. Da die LED bereits in der erforderlichen Messwellenlänge strahlt, wird auf eine Monochromatisierung des Lichts verzichtet. Weitere Vorteile der LED sind das geringe Intervall bis zur konstanten Lichtemission, die lange Lebensdauer und die geringen Kosten. Die Steuerung erfolgt über einen Mikroprozessor. Die Messwerte können an einem Display abgelesen werden.

Die FOX-Methode und das Miniphotometer werden im Verlauf dieser Arbeit validiert. Dabei stellt sich heraus, dass die FOX-Methode besonders für die Bestimmung von Lipidperoxiden unter basalen Laborbedingungen geeignet ist. Die Ergebnisse bestätigen die Zuverlässigkeit des Miniphotometers. Die Ermittlung von Normalwerten sowie die Überprüfung von Einflussfaktoren (Rauchen, Ernährung, Umweltbelastung) auf die Lipidperoxidation im Blutplasma würden dieses Forschungsgebiet bereichern.