



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Einfluss von Eisen auf die Bildung von oxidativem Stress in vivo und in vitro

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Naturwissenschaften (Mag. rer.nat.)

Verfasserin:	Kathrin Haider
Studienrichtung /Studienzweig (lt. Studienblatt):	A 474 Ernährungswissenschaften
Betreuer:	Univ. Prof. Dr. Hans Goldenberg
Wien, im	August 2010

Danksagung

In erster Linie gilt mein Dank Univ. Prof. Dr. Hans Goldenberg, der mir durch die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe diese Diplomarbeit ermöglicht hat.

Ganz besonders möchte ich mich bei meiner Betreuerin Dr. Barbara Scheiber-Mojdehkar bedanken, die mir in allen Bereichen meiner Tätigkeit mit wissenschaftlichem und praktischem Rat stets hilfsbereit zur Seite stand.

Mein Dank gilt auch Dr. Rayko Evstatiev, der mir die Rattenleberproben sowie die Ausgangsdaten der klinischen Blutparameter der Ratten zur Verfügung gestellt hat.

Weiters bedanke ich mich bei allen Mitarbeitern und Kollegen im Institut und dabei ganz besonders bei Dr. Brigitte Nina Sturm, Dr. Hannes Steinkellner sowie Matej Sack.

Vor allem gilt ein herzliches Dankeschön meiner Familie, meinem Freund und meinen Freunden, die mich über die ganze Studienzeit hinweg, aber vor allem in den anstrengenden Monaten während meiner Diplomarbeit unterstützt und mich unermüdlich auf andere Gedanken gebracht haben.

Inhaltsverzeichnis

- I Abbildungsverzeichnis
- II Tabellenverzeichnis
- III Abkürzungsverzeichnis

1. Einleitung und Fragestellung	1
2. Literaturüberblick	3
2.1. Eisenstoffwechsel	3
2.1.1. Transferrin	4
2.1.2. Transferrinrezeptor	6
2.1.3. Ferritin	6
2.1.4. Eisenaufnahme in die Zelle	7
2.1.5. Bereitstellung von Eisen im Körper, Intestinale Eisenaufnahme	8
2.2. Oxidativer Stress	11
2.3. Anämie	14
2.3.1. Eisenmangelanämie	15
2.3.2. Anämie chronischer Nierenerkrankungen	16
2.4. Eisentherapie – Parenterale Eisenpräparate	18
2.4.1. Eisenpräparate im Überblick	20
3. Material und Methoden.....	22
3.1. Rattenmodell.....	22
3.1.1. Aufbereitung der Rattenleberproben	23
3.1.2. Proteinbestimmung nach Bradford	24
3.1.3. Eisenbestimmung – Ferrozin-Methode.....	25
3.1.4. Hämoglobinbestimmung mittels 2,7-Diaminofluoreszein (DAF)	27
3.1.5. Bestimmung des Peroxidgehalts	28
3.1.5.1. FOX Assay.....	28
3.1.5.2. Überprüfung des FOX Assay mit TCEP	30
3.1.5.3. Peroxid Assay	31
3.1.5.4. Überprüfung des Peroxid Assay	32

3.2.	Harnstoffgelelektrophorese	33
3.2.1.	Herstellung der Gele	33
3.2.2.	Gewinnung von Serum	34
3.2.3.	Inkubation von humanem Serum mit parenteralen Eisenpräparaten	34
3.3.	Messung der ROS-Bildung in humanen HepG2 Zellen	38
3.3.1.	Zellkultur	38
3.3.2.	Messung von oxidativem Stress mittels DCF-Methode.....	38
3.3.2.1.	Messung von oxidativem Stress mittels DCF-Methode in Anwesenheit der Fe-Präparate in der Inkubationslösung	39
3.3.2.2.	Messung von oxidativem Stress mittels DCF-Methode nach Vorinkubation der Zellen mit Fe-Präparaten	39
3.4.	Statistik.....	40
4.	Ergebnisse und Diskussion	41
4.1.	Eisenstoffwechsel und oxidativer Stress	41
4.1.1.	Etablierung eines Rattenmodells für Eisenmangelanämie.....	41
4.1.1.1.	Einfluss des Fütterungsversuchs auf den Eisenstatus	42
4.1.2.	Oxidativer Status bei Eisenmangelanämie	53
4.1.2.1.	Einfluss des Fütterungsversuchs auf den Gehalt an Lipidperoxiden in der Leber (Bestimmung mit FOX Assay)	54
4.1.2.2.	Abschätzung des Einflusses von endogenem Eisen auf die Per- oxidmessung mittels FOX Assay und TCEP	56
4.1.2.3.	Einfluss des Fütterungsversuchs auf den Gehalt an wasserlöslichen Peroxiden in der Leber (Bestimmung mit Peroxid Assay)	58
4.1.2.4.	Abschätzung des Einflusses von endogenem Eisen auf die Peroxidmessung mittels Peroxid Assay und Kontrollreagenz...	60
4.1.2.5.	Korrelation des Eisengehalts mit dem Peroxidgehalt der Lebern	62
4.1.3.	Fazit Eisenstoffwechsel und oxidativer Stress	64
4.2.	Parenterale Eisengaben.....	67
4.2.1.	Bindung von Eisen aus parenteralen Eisenpräparaten an Transferrin in humanem Serum	69

4.2.1.1. Ergebnisse der Harnstoffelektrophorese.....	71
4.2.2. Oxidativer Stress durch Eisenpräparate	77
4.2.2.1. Messung in Anwesenheit der Fe-Präparate mittels DCF- Methode	77
4.2.2.2. Vorinkubation mit den Fe-Präparaten (Messung mittels DCF- Methode).....	80
4.2.3. Fazit Parenterale Eisengaben	86
5. Schlussbetrachtung	89
6. Zusammenfassung	92
7. Summary	94
8. Literaturverzeichnis.....	96

I Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Eisenaufnahme in die Zelle	8
Abbildung 2: Erythropoese	14
Abbildung 3: Einfluss des Fütterungsversuchs auf die Erythrozytenzahl (RBC)	45
Abbildung 4: Einfluss des Fütterungsversuchs auf die Hämoglobinwerte	46
Abbildung 5: Einfluss des Fütterungsversuchs auf die Hämatokritwerte	47
Abbildung 6: Einfluss des Fütterungsversuchs auf das mittlere korpuskulären Volumen (MCV).....	48
Abbildung 7: Vergleich der relativen Gewichtszunahme während dem Fütterungsversuch.....	49
Abbildung 8: Einfluss des Fütterungsversuchs auf den Eisengehalt der Leber	50
Abbildung 9: Einfluss des Fütterungsversuchs auf den Eisengehalt der Leber ohne Hämoglobin-Eisen	51
Abbildung 10: Eisengehalt der Leber im zeitlichen Verlauf.....	52
Abbildung 11: Einfluss des Fütterungsversuchs auf den Peroxidgehalt der Leber (Fox Assay)	55
Abbildung 12: Einfluss der Dauer des Fütterungsversuchs auf den Peroxidgehalt (FOX Assay)	56
Abbildung 13: Signal des FOX Assay mit bzw. ohne TCEP	57
Abbildung 14: Einfluss des Fütterungsversuchs auf den Peroxidgehalt der Leber korrigiert um die Farbkomplexbildung durch endogenes Eisen (FOX Assay +/- TCEP)	57
Abbildung 15: Einfluss des Fütterungsversuchs auf den Peroxidgehalt der Leber (Peroxid Assay)	59
Abbildung 16: Einfluss des Fütterungsversuchs auf den Peroxidgehalt der Leber korrigiert um die Farbkomplexbildung durch endogenes Eisen (Überprüfung des Peroxid Assay)	61

Abbildung 17: Einfluss des Fütterungsversuchs auf den Peroxidgehalt der Leber korrigiert um die Peroxidbildung durch endogenes Eisen im zeitlichen Verlauf	62
Abbildung 18: Harnstoffelektrophoresegel Ferinject.....	71
Abbildung 19: Harnstoffelektrophoresegel Venofer.....	72
Abbildung 20: Harnstoffelektrophoresegel Fe-Pyrophosphat.....	73
Abbildung 21: Harnstoffelektrophoresegel Eisen(III)ammoniumcitrat (FAC)....	73
Abbildung 22: Semiquantitative Auswertung der Transferrinsättigung	74
Abbildung 23: Bildung von intrazellulären ROS durch i.v. Eisenpräparate in HepG2 Zellen (Messung während der Inkubation mit dem Präparat, mit 10 % FCS)	78
Abbildung 24: Bildung von intrazellulären ROS durch i.v. Eisenpräparate in HepG2 Zellen (Messung mit dem Präparat, ohne FCS)	79
Abbildung 25: Bildung von intrazellulären ROS durch i.v. Eisenpräparate in HepG2 Zellen (Vorinkubation mit dem Präparat; mit 10 % FCS)	81
Abbildung 26: Bildung von intrazellulären ROS durch i.v. Eisenpräparate in HepG2 Zellen (Vorinkubation mit dem Präparat; ohne FCS)	82
Abbildung 27: Anstieg des oxidativen Stress im Verhältnis zur Kontrolle (mit 10 % FCS)	83
Abbildung 28: Anstieg des oxidativen Stress im Verhältnis zur Kontrolle (ohne FCS)	84

II Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Codierung und Zuweisung der Rattenleberproben zu den Gruppen	23
Tabelle 2: Pipettierschema zur Erstellung der Standardreihe, Proteinbestimmung.....	25
Tabelle 3: Pipettierschema zur Erstellung der Standardreihe, FOX Assay.....	29
Tabelle 4: Pipettierschema zur Erstellung der Standardreihe, Peroxid Assay ..	31
Tabelle 5: Verwendete Eisenpräparate und ihr Eisengehalt.....	35
Tabelle 6: Klinische Parameter der Tiere (Baseline)	43
Tabelle 7: Zunahme bzw. Abnahme der klinischen Parameter der Tiere	44
Tabelle 8: Korrelation zwischen Leber-Fe und wasserlöslichem Peroxidgehalt	63
Tabelle 9: Konzentrationen in mg Fe/l und mmol Fe/l der eingesetzten Eisenpräparate	70

III Abkürzungsverzeichnis

BHT	Butylhydroxytoluol
BSA	Bovine serum albumin
DAF	2,7-Diaminofluoreszin
DCF	Dichlorodihydrofluorescein
DCF-DA	Dichlorodihydrofluorescein-diazetat
Dcytb	Duodenal cytochrome B
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMT1	Divalent metal transporter 1
FAC	Eisen(III)ammoniumcitrat
FCS	Fötales Kälberserum
FeM	Eisenmangelgruppe
FOX	Ferrous Oxidation Xylenol Orange
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
GSH-Px	Glutathionperoxidase
Hb	Hämoglobin
HCT	Hämatokrit
i.v.	intravenös
Fpn (IREG1)	Ferroportin
K	Kontrollgruppe
LIP	Labiler Eisenpool
LPI	Labiles Plasmaeisen
MCV	mittleres korpuskuläres Volumen
NTBI	nicht-Transferrin gebundenes Eisen
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RBC	Erythrozyten / Red Blood Cells
rhuEPO	rekombinantes humanes Erythropoietin
ROS	Reactive oxygen species, Reaktive Sauerstoffverbindungen

TCEP	Tris(2-carboxyethyl)phosphin
TBARS	Thiobarbituric Acid Reactive Substances
TfR	Transferrinrezeptor
TPP	Triphenylphosphin
W	Woche
8-OHdG	8-Hydroxydeoxyguanosine

1. Einleitung und Fragestellung

Eisen ist für unseren Körper essentiell, da es für verschiedene Stoffwechselreaktionen gebraucht wird, eine wichtige Rolle in der Funktion von Hämoglobin und Myoglobin spielt und für das Zellwachstum und die Proliferation unentbehrlich ist. [CRICHTON et al. 2008, PONKA 1999]

Allerdings stellt Eisen ein Paradoxon für Lebewesen dar: als Übergangsmetall hat es wichtige und notwendige Ligand-Bindungs- und Redox-Eigenschaften, aber gleichzeitig kann Eisen auch enorme Probleme verursachen, da der leichte Übergang von Fe^{2+} zu Fe^{3+} ermöglicht, sich an schädlichen Redox-Reaktionen zu beteiligen. „Freies“ Eisen muss deshalb auf einem möglichst niedrigen Niveau gehalten werden. Um das zu gewährleisten, ist der Organismus mit einem ausgeklügelten System ausgestattet, das die zelluläre Eisenaufnahme und -speicherung koordiniert sowie reguliert und somit das Eisen im intrazellulären labilen Pool in angemessenen Dimensionen hält. [EDISON et al. 2008; PONKA 1999]

Die selben Eigenschaften die es dem Eisen erlauben als effizienter Cofaktor in kontrollierten Redox-Reaktionen zu fungieren, verursachen auch, dass es als potentiell Toxin wirkt, wenn es nicht von oxidativ empfindlichen Biomolekülen abgeschirmt wird. Somit kann Eisen oxidativen Stress verursachen. [GEISSER 1998] Dieser wird als Status im Körper beschrieben, in dem die Prooxidantien/Antioxidantien-Balance zu Gunsten des Ersteren beeinträchtigt ist, was im Anschluss zu einer potentiellen Schädigung führt. Diese Definition beinhaltet zwei Bedingungen: 1.) erhöhte oxidative Belastung (und möglicherweise niedrige Antioxidantienlevel); und 2.) Bildung von Indikatoren für oxidative Schäden an Biomolekülen, besonders DNA, Proteine und Lipide. [GIUSTARINI et al. 2009]

Eisenmangelanämie tritt auf, wenn der Eisenmangel schwerwiegend genug ist, um die Erythropoese zu mindern und um somit die Entstehung einer Anämie auszulösen. Ein Ziel dieser Arbeit war, ein Eisenmangel-Rattenmodell zu etablieren, mit Hilfe dessen die pathophysiologischen Folgen eines Eisenmangels, sowie mögliche therapeutische Interventionen untersucht werden können.

In weiterer Folge sollte anhand dieses Rattenmodells untersucht werden, ob Eisenmangel oxidativen Stress verursacht, was kontrovers diskutiert wird. [DIAZ-CASTRO 2008] Eine Studie von Yoo et al. (2009) an weiblichen Patienten mit Eisenmangelanämie zeigte zum Beispiel eine signifikant höhere oxidative Aktivität verglichen mit nicht anämischen Kontrollpersonen, während die Gesamtantioxidantienkapazität sowie die Katalaseaktivität signifikant geringer waren. [YOO et al. 2009] Somit gingen wir davon aus, dass die Eisenmangelgruppe höheren oxidativen Stress verglichen mit der Kontrollgruppe haben wird.

Der zweite Teil dieser Arbeit bestand darin, festzustellen, inwieweit intravenöse Eisengaben, die für die Behandlung einer Eisenmangelanämie eingesetzt werden, zur Bildung von oxidativem Stress beitragen. Diese parenteral verabreichbaren Eisenpräparate bestehen aus Eisenkomplexen, welche in ihrer chemischen Form und Struktur dem physiologisch vorkommenden Eisenspeicherprotein Ferritin nachempfunden sind. Das heißt, dass Eisen nicht in seiner ionischen Form vorliegt und mit Hilfe von Komplexbildung abgeschirmt wird. Andernfalls könnte Eisen eine hohe Toxizität entwickeln, da es mit bestimmten Substanzen im Körper reagieren und dabei zum Beispiel Hydroxylradikale bilden könnte. [CRICHTON et a. 2008] Aufgrund dessen, sowie angesichts potentieller anderer Nebenwirkungen bleibt die Verabreichung von parenteralem Eisen weiter umstritten. Es ist sogar von einem zweiseitigen Schwert die Rede. [CAVILL 2003]

Um darüber Auskunft zu erhalten, inwieweit dies zutrifft, sollten zwei wichtige Eigenschaften parenteraler Eisenpräparate untersucht werden: Einerseits die Fähigkeit das Eisen direkt auf Transferrin im Plasma zu übertragen, sowie andererseits die Bildung von reaktiven Sauerstoffverbindungen durch parenterale Eisenpräparate in humanen HepG2 Zellen und somit die Entstehung von oxidativem Stress in vitro.

2. Literaturüberblick

2.1. Eisenstoffwechsel

Eisenmangel und Eisenmangelanämie treten weltweit sehr häufig auf. Während davon vor allem Frauen betroffen sind, kommt bei Männern eher eine Eisenüberladung vor. [CRICHTON et al. 2008]

Eisen ist ein essentielles Element, da es für verschiedene Stoffwechselreaktionen gebraucht wird: den Sauerstoff- und Elektronentransport, katalysiert Oxygenierung, Hydroxylierung sowie andere grundlegende Stoffwechselprozesse. Ebenso ist es für das Zellwachstum und die Proliferation unentbehrlich. [CRICHTON et al. 2008, PONKA 1999]

Der große biologische Vorteil des Eisens ist, dass dieses Element in verschiedenen Oxidationsstufen vorkommt, wobei Fe^{2+} und Fe^{3+} die wichtigsten darstellen. Da vor allem Fe^{3+} eine sehr geringe Löslichkeit hat, ist es für Transport und Speicherung so gut wie immer an Proteine gebunden. [CRICHTON et al. 2008]

Allerdings stellt Eisen ein Paradoxon für Lebewesen dar: seine chemische Reaktivität ist essentiell für viele verschiedene Stoffwechselprozesse, kann aber auch gefährlich sein. Redoxreaktionen bei denen Fe als Elektronendonator und -akzeptor fungiert, können dem Organismus schaden. Bei physiologischem pH und Sauerstoffpartialdruck wird Fe^{2+} sofort zu Fe^{3+} oxidiert. Dieses wiederum bildet umgehend essentielle, unlösliche $\text{Fe}(\text{OH})_3$ Polymere. Wenn Eisen nicht ausreichend an Chelatoren gebunden ist, kommt es wegen seiner hohen katalytischen Aktivität zur Bildung von schädlichen Sauerstoffradikalen, die schließlich peroxidative Schädigungen an lebensnotwendigen Zellstrukturen verursachen. „Freies“ Eisen muss deshalb auf einem möglichst niedrigen Niveau gehalten werden. Um das zu gewährleisten, sind Organismen mit einem ausgeklügelten System ausgestattet, das die zelluläre Eisenaufnahme und -speicherung koordiniert sowie reguliert und somit das Eisen im intrazellulären labilen Pool in angemessenen Dimensionen hält. [PONKA 1999]

Der Hauptweg des Eisens im Körper führt vom Plasmatransferrin zum Erythron, weiter zu den Makrophagen und wieder zurück zum Plasmatransferrin. [CRICHTON et al. 2008]

Drei wichtige Proteine sind daran beteiligt die Eisenversorgung sicher zu stellen:

- Transferrin, ein Plasmaglykoprotein, das Eisen von Zellen, die Eisen abgeben, zu Zellen, die Eisen benötigen im Plasma und in der Extrazellulärflüssigkeit transportiert.
- Der Transferrinrezeptor ist ein Glykoprotein in der Zellmembran, das die rezeptorvermittelte Aufnahme des eisenbeladenen Transferrin, die Abgabe des Eisen innerhalb der Zelle und das Recycling von Apotransferrin zurück an die Zelloberfläche ermöglicht.
- Ferritin ist ein Protein zur Eisenspeicherung, das das Eisen in einer löslichen, nicht toxischen und wieder verfügbaren Form bindet und wieder abgibt, so dass Eisen für den zellulären Bedarf bereitgestellt werden kann. [CRICHTON et al. 2008]

1-2 mg Eisen werden pro Tag aus der Nahrung absorbiert. Der durchschnittliche Eisengehalt des Körpers beträgt 3-4 g, wobei 60 % davon im Hämoglobin in den Erythrozyten zu finden ist. Der restliche Anteil entfällt auf Myoglobin, Häm- und Nicht-Hämenzyme sowie das Retikuloendotheliale System. Frauen haben einen niedrigeren Körpereisengehalt als Männer. [CRICHTON et al. 2008]

2.1.1. Transferrin

Apotransferrin ist ein eisenfreies Plasmaglykoprotein. Es besteht aus einer Kette von rund 700 Aminosäureresten sowie aus zwei gleichwertigen Domänen mit jeweils einer hochaffinen Bindungsstelle für Fe^{3+} . Die zwei Bindungsstellen für Eisen können unabhängig voneinander jeweils ein Eisenatom binden. Das heißt, Transferrin kann in vier verschiedenen Formen vorkommen, als Apotransferrin (hat kein Fe gebunden), in zwei Varianten als Monotransferrin (die C- oder N-terminale Eisenbindungsstelle ist mit je einem Fe^{3+} besetzt) sowie als

Holo-transferrin (mit zwei gebundenen Fe^{3+} -Atomen). [CRICHTON et al. 2008, PONKA 1999]

Die Affinität von Transferrin zu Eisen ist pH-abhängig. Im Plasma ist sie bei einem pH um 7.4 stark, während bei einem $\text{pH} \leq 4.5$ keine Bindung erfolgt. Dieses Phänomen spielt eine große Rolle bei der Freisetzung von Eisen. Sobald das Eisen an die Bindungsstelle bindet, verursacht das eine dramatische Konformationsänderung im Protein. [PONKA 1999]

Transferrin fungiert als Transportprotein, um das Eisen von den Orten der Absorption und Speicherung zu den Stellen im Körper zu bringen, an denen es gebraucht wird. Das Eisen stammt entweder aus den Darmzellen, die Fe aus der Nahrung aufgenommen haben oder von Makrophagen, die das Fe aus der Phagozytose von Erythrozyten erhalten. [CRICHTON et al. 2008, PONKA 1999]

Bei normalem Fe-Status ist das Plasmatransferrin zu etwa einem Drittel mit Fe gesättigt, wobei im Plasma dann eine Mischung der verschiedenen Beladungsformen von Transferrin vorkommt. Transferrin wird wiederverwertet und hat eine Halbwertszeit von 8 Tagen. Normalerweise beträgt die Eisenkonzentration im Plasma ca. $18 \mu\text{mol/l}$ und die Eisenbindungskapazität (total iron-binding capacity) als Maß für Plasmatransferrinlevel beträgt ca. $56 \mu\text{mol/l}$. [CRICHTON et al. 2008]

Es ist bemerkenswert, dass in gesunden Erwachsenen der Gesamtplasmaeisengehalt, der ca. 3 mg beträgt, ziemlich konstant bleibt, obwohl der Pool mehr als 10 Mal am Tag umgesetzt wird und praktisch unbeeinflusst von gespeichertem Eisen in Ferritin und Hämosiderin bleibt. [PONKA 1999] Neue Erkenntnisse zeigen, dass das Leberpeptid Hepcidin als zentraler Regulator der Homöostase des Eisens im Körper fungiert [ANDERSON et al. 2009], worauf später noch eingegangen wird.

Bei Eisenüberladung, wenn eine gewisse Transferrinsättigung überschritten ist, kann das Plasma außerdem noch chelatierbare Fraktionen an niedermolekularem Eisen enthalten, die nicht an Transferrin gebunden sind. Sie werden allerdings vor allem von der Leber schnell aus dem Plasma entfernt. [ESPOSITO et al. 2002; PONKA 1999]

Transferrin wird zum Großteil in den Hepatozyten der Leber synthetisiert. Kleine Mengen werden aber auch in verschiedenen anderen Geweben wie Lymphkno-

ten, zirkulierenden Lymphozyten, Makrophagen, Knochenmark, Speicheldrüsen, Thymus, Milz, Brustdrüsen und Sertolizellen des Hoden gebildet. [CRICHTON et al. 2008, PONKA 1999]

2.1.2. Transferrinrezeptor

Bei der Aufnahme von zweifach beladenem Transferrin in fast alle Zelltypen des Organismus ist der Transferrinrezeptor beteiligt. Der Transferrinrezeptor 1 (TfR 1) besteht aus einem disulfid-verknüpften transmembranen Glykoprotein-Homodimer, wobei jede Untereinheit ein Transferrinmolekül bindet. [PONKA 1999]

Es wurde auch ein zweiter Transferrinrezeptor (TfR 2) beschrieben. Anscheinend wird er hauptsächlich in der Leber und in Vorstufen der Erythrozyten im Knochenmark exprimiert. [KWABATA et al. 1999]

TfR 1 wird in nahezu allen Zellen exprimiert, wobei die Zahl der Transferrinrezeptoren den zellulären Eisenbedarf repräsentiert. Weiters variiert die Anzahl an Rezeptoren je nach Zelltyp und zellspezifischer morphologischer Entwicklung. [CRICHTON et al. 2008]

Der Eisengehalt von Transferrin hat einen wichtigen Effekt auf die Affinität von Transferrin für seinen Rezeptor. Zweifach beladenes Transferrin hat die höchste, einfach beladenes mittlere und Apotransferrin sehr geringe Affinität zu TfR. Deshalb erfolgt die Aufnahme von Eisen in die Zellen in erster Linie über Holotransferrin. Die Konzentration an zweifach beladenem Transferrin in normalem Plasma ist ausreichend, um alle zellulären Transferrin Rezeptoren mit dem Liganden zu sättigen. [CRICHTON et al. 2008; PONKA 1999]

2.1.3. Ferritin

In den Zellen kann Eisen in zwei Formen gespeichert werden. Zum einen im Zytosol als Ferritin und zum anderen als Hämosiderin nach dem Abbau von Ferritin im Lysosom. [PONKA 1999, CRICHTON et al. 2008]

Ferritin ist ein oligomeres Protein, das eine Proteinhülle bildet, in dessen innerem Hohlraum beträchtliche Mengen an Eisen, nämlich bis zu 4500 Eisenatome, gespeichert werden können. Das Bemerkenswerte hierbei ist, dass dies in

einer löslichen, nicht toxischen, aber dennoch bioverfügbaren Form erfolgt. Innerhalb des Proteins wird Eisen als Fe^{3+} in Form von Eisenoxyhydroxid Phosphat gespeichert. Leider ist aber noch wenig über die Freisetzung von Eisen aus Ferritin in intakten Zellen bekannt. Es wird vermutet, dass der Abbau des Ferritinproteins einen wichtigen Mechanismus für die Freisetzung von Eisen in die Zelle darstellt. [PONKA 1999, CRICHTON et al. 2008]

Im Gegensatz dazu ist Hämosiderin wasserunlöslich und hat ein höheres Verhältnis von Eisen zu Protein. [CRICHTON et al. 2008] Hämosiderin ist ein Abbauprodukt von Ferritin, das bei hohem Eisenstatus vorkommt. [MUNOZ et al. 2009]

Ferritin kommt in nahezu allen menschlichen Zellen vor. Die Hauptspeicherorte von Ferritin in gesunden Menschen sind Leber, Milz und Skelettmuskel. Hämosiderin ist vor allem in Makrophagen zu finden und hat einen verhältnismäßig geringen Anteil am gesamten Eisenspeicher bei gesunden Menschen. Bei Eisenüberladung kann es aber beträchtlich erhöht sein. [CRICHTON et al. 2008]

2.1.4. Eisenaufnahme in die Zelle

Da das einfach beladene Transferrin eine geringe Affinität zum Rezeptor hat, wird vor allem Holotransferrin (Holo-Tf) von den Zellen zur Eisenbedarfsdeckung verwendet. Das zweifach beladene Transferrin bindet an den Transferrinrezeptor in der Plasmamembran. Der Transferrin-Transferrinrezeptor-Komplex wird dann in sogenannte Clathrin-coated pits (das sind Vertiefungen, die mit einem Gitter aus Clathrin-Molekülen ausgekleidet sind) internalisiert, die sich anschließend von der Membran lösen. Nach dem Verlust der Clathrin-Hülle fusionieren sie mit der Zielmembran der Endosomen und laden den Vesikelinhalt ins Innere der Endosomen ab. Eine ATP-abhängige Protonenpumpe hält den pH der Endosomen bei pH 5-6. Durch den schwach sauren pH in den Endosomen und die dadurch ausgelösten Konformationsänderungen des Holo-Tf/Transferrinrezeptor-Komplexes kommt es zur Freisetzung von Fe^{3+} aus dem Komplex. [CRICHTON et al. 2008] Das nunmehr eisenfreie Apotransferrinmolekül, das bei einem pH von rund 5.5 weiterhin an den Rezeptor gebunden bleibt, wird an die Zelloberfläche zurücktransportiert, wo das Apotransferrin aus den

Zellen freigesetzt und wieder verfügbar ist. Es kann nun wieder Eisen von den Makrophagen, sowie zu einem geringeren Anteil von Hepatozyten, Darm- und anderen Zellen aufnehmen. [PONKA 1999] und der Kreislauf beginnt erneut.

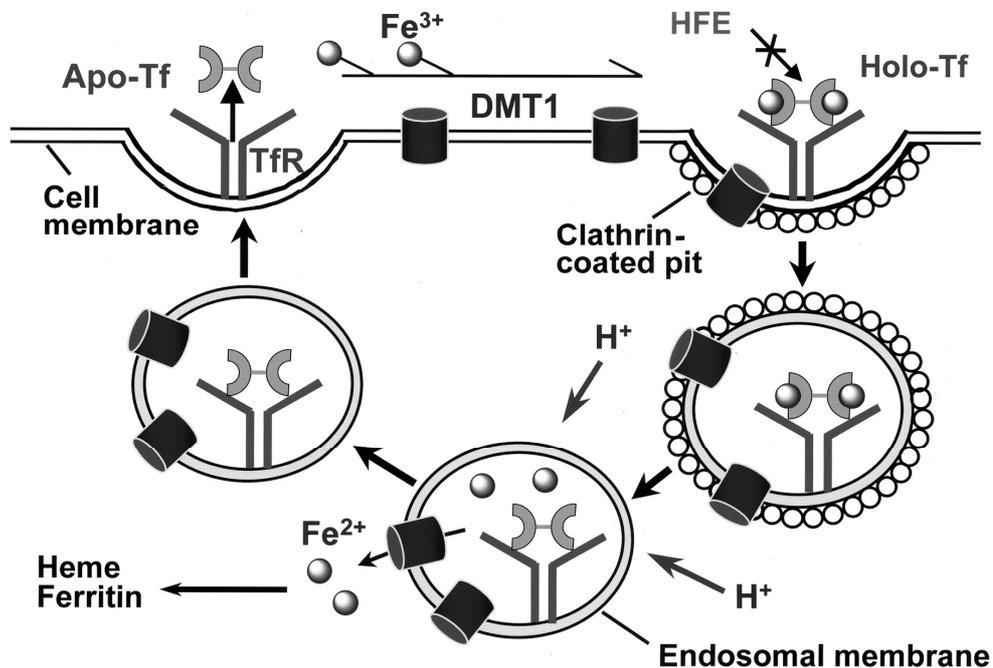


Abbildung 1: Eisenaufnahme in die Zelle

<http://pharmrev.aspetjournals.org/content/54/4/561/F3.large.jpg>

Es gibt nun schon viele Untersuchungen die zeigen, dass, obwohl unter normalen Umständen in erster Linie transferrin gebundenes Eisen von den Zellen aufgenommen wird, auch alternative Mechanismen des Eisentransports existieren. In gesunden Individuen ist die Plasmakonzentration an nicht-Transferrin gebundenem Eisen (NTBI, non-transferrin bound iron) extrem niedrig. DMT1 wurde als möglicher Transporter von NTBI in die Zelle diskutiert. Andere Aufnahme-mechanismen stellen z.B. Calciumkanäle dar, die auch als Eisentransporter in Myokardzellen unter Eisenüberladung fungieren. [EDISON et al. 2008] Genauere Mechanismen müssen noch untersucht werden.

2.1.5. Bereitstellung von Eisen im Körper, Intestinale Eisenaufnahme

Die Aufrechterhaltung der Eisenhomöostase im Körper erfolgt in erster Linie durch eine regulierte Absorption aus der Nahrung. Unter normalen Bedingungen ist der Eisenmetabolismus sehr sparsam, da der Körper nur ca. 1-2 mg

Eisen pro Tag verliert, was vor allem durch das Ablösen von Zellen des Gastrointestinaltraktes und der Haut passiert. Bei prämenopausalen Frauen kommt noch der Blutverlust während der Menstruation hinzu. Daher werden täglich ca. 1-2 mg Eisen aus der Nahrung absorbiert, wobei sich die Menge bei prämenopausalen Frauen im Vergleich zu Männern bei Bedarf verdoppeln kann. [CRICHTON et al. 2008]

Physiologisch gesehen sind die bestimmenden Faktoren der Aufnahmemenge über die Mukosa der Eisengehalt in den Speichern des Körpers und der Grad an Erythropoese (Bildung und Entwicklung der roten Blutkörperchen). Hepcidin spielt als Regulator der Eisenaufnahme eine große Rolle, da es den Eisenstatus im Körper reflektiert. Es handelt sich hierbei um ein Peptid, das in der Leber synthetisiert wird. Mikrobielle Infektionen oder erhöhte Transferrinsättigung führt zu einem Anstieg der Hepcidinsynthese in den Hepatozyten der Leber. Das Plasmahepcidin blockiert dann die Aufnahme von Eisen ins Duodenum und blockiert außerdem die Eisenfreisetzung aus Makrophagen [CRICHTON et al. 2008] und Hepatozyten. Auch eine Veränderung in der Erythropoeserate sowie Hypoxie hat Auswirkungen auf die Hepcidinexpression. [ANDERSON et al. 2009]

Die Bioverfügbarkeit von Eisen variiert stark und wird definiert durch die Menge an Eisen in der Nahrung, die vorliegende chemische Form, die Zusammensetzung der Nahrung und Faktoren, die vom Gastrointestinaltrakt selbst abhängig sind (wie zB Magensäuresekretion, pH usw.). Nahrungseisen kann in Häm- und Nicht-Hämeisen eingeteilt werden. Ersteres kommt zwar in kleineren Mengen in der Nahrung vor, es wird aber leichter absorbiert (20-30 % absorbierbar). Das meiste Eisen in der Nahrung, nämlich mehr als 90 %, liegt als Nicht-Hämeisen vor. Es wird aber oft nur 5 % des Nicht-Hämeisens absorbiert. [CRICHTON et al. 2008]

Die Eisenabsorption im Gastrointestinaltrakt findet an der apikalen Oberfläche der intestinalen Mukosazellen über zwei Hauptwege statt. [CRICHTON et al. 2008] Hämeisen wird über das Membranprotein HCP1 (heme carrier protein 1) aufgenommen [SHAYEGHI et al. 2005] und in weiterer Folge von der Hämoxygenase abgebaut. Somit wird Biliverdin und Fe^{2+} freigesetzt, das in den intrazellulären Eisenpool eintritt. Nicht-Hämeisen liegt normalerweise als Fe^{3+} vor und

muss von der Ferrireduktase (Dcytb) zu Fe^{2+} reduziert werden. Das Fe^{2+} wird von DMT1, einem protongekoppelten divalenten Kationentransporter, durch die apikale Membran transportiert. In der Zelle geht Fe^{2+} in einen „Low molecular weight pool“ ein oder wird in Ferritin gespeichert, wohingegen eine erhebliche Menge Eisen die Zelle über die basolaterale Membran verlässt. Von dort kann es über ein transmembranes Transporterprotein, nämlich Ferroportin oder auch IREG1 genannt, in den Blutkreislauf gebracht werden. [CRICHTON et al. 2008]

2.2. Oxidativer Stress

Ebenso wie Eisen hat auch Sauerstoff eine essentielle und eine toxische Seite. Ungefähr 90–95 % des täglich aufgenommenen Sauerstoffs wird bei der mitochondrialen Atmung zu harmlosen, unschädlichen Wasser umgewandelt, während die restlichen 5–10 % des Sauerstoffs einwertiger und zweiwertiger Reduktion unterliegen. Daraus ergeben sich reaktive Sauerstoffmoleküle (reactive oxygen species, ROS) wie Superoxid, Wasserstoffperoxid und Hydroxylradikale. Diese reaktiven Moleküle können, sofern sie nicht abgefangen werden, DNA, Proteine, Lipide und Kohlenhydrate oxidieren und werden somit mit verschiedenen Toxizitäten und Pathologien in Verbindung gebracht. Dieser schädliche Effekt wird unter dem Begriff „oxidativer Stress“ zusammengefasst. [GEISSER 1998]

Oxidativer Stress wurde 1985 von Helmut Sies als ein Ungleichgewicht zwischen Prooxidantien und Antioxidantien zu Gunsten von Ersteren definiert. Später wählte er eine detaillierte Begriffsbestimmung, da weder oxidative Belastung (die in vielen Zelltypen unter normalen Bedingungen vorkommen) noch ein Mangel an Antioxidantien (was vielleicht durch eine zu geringe Aufnahme aus der Nahrung resultiert) alleine ausreichen, um oxidativen Stress zu verursachen. Daher beschrieb er den Status „oxidativer Stress“ als eine Beeinträchtigung der Prooxidantien/Antioxidantien-Balance zu Gunsten der Ersteren, die im Anschluss zu einer potentiellen Schädigung führt. Diese Definition beinhaltet zwei Bedingungen: 1.) erhöhte oxidative Belastung (und möglicherweise niedrige Antioxidantienlevel); und 2.) Entstehung von Indikatoren der oxidativen Schädigung an Biomolekülen, besonders DNA, Proteine und Lipide. [GIUSTARINI et al. 2009]

Eisen kann oxidativen Stress verursachen. Die selben Eigenschaften die es dem Eisen erlauben als effizienter Cofaktor in kontrollierten Redox-Reaktionen zu fungieren, verursachen auch, dass es als potentielles Toxin wirken kann. [GIUSTARINI et al. 2009; GEISSER 1998]

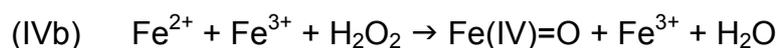
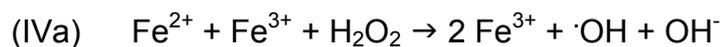
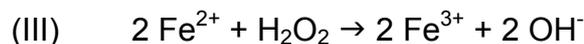
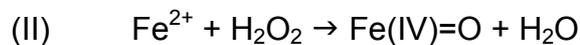
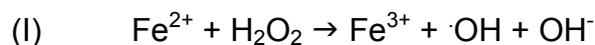
Zu den ROS zählen folgende Verbindungen:

- $\cdot\text{O}^{2-}$ Superoxidanion, reagiert mit Superoxiddismutase (SOD)
- H_2O_2 Wasserstoffperoxid, reagiert mit Katalase (CAT) und Peroxidase
- $\cdot\text{OH}$ Hydroxylradikal, ein starkes Oxidationsmittel [Geisser 1998]

Zweiwertiges Eisen (Fe^{2+}) und dreiwertiges Eisen (Fe^{3+}) können diese Prozesse maßgeblich beeinflussen. Es wurde gezeigt, dass zweiwertige Eisensalze bei pH \sim 7 Superoxidanionen und Hydroxylradikale produzieren, die sehr toxisch sind. [GEISSER 1998]

Die so genannte Fenton Reaktion ist die wichtigste Reaktion, wenn es um toxische Effekte von ROS geht. Das hydratisierte zweiwertige Eisen wirkt stark reduzierend in Beziehung zu Wasserstoffperoxid. [GEISSER 1998]

Yamazaki und Piette (1990) gehen davon aus, dass die Fenton Reaktion in mehreren Varianten verlaufen kann, die nicht alle zum hoch reaktiven Hydroxylradikal führen. Reaktion (I) stellt die klassische Fenton Reaktion dar, während Reaktion (II) als alternativer Weg über eine Ferrylverbindung abläuft. Interessanterweise führt Reaktion (III) nicht zu hoch reaktiven Sauerstoffmolekülen, sondern stellt lediglich eine einfache Oxidation von zwei Mol Fe^{2+} dar. Reaktionen (IVa) und (IVb) kommen nur zum Tragen, wenn die Konzentrationen von Fe^{2+} und Fe^{3+} vergleichbar sind.



[YAMAZAKI und PIETTE 1990; FREINBICHLER et al. 2008]

Das Hydroxylradikal ist ein starkes Oxidationsmittel. Es reagiert sehr schnell in Anwesenheit von potentiellen Substraten mit Molekülen wie Zucker, Aminosäu-

ren, Phospholipiden, Nucleotiden und Fettsäuren. Das Hydroxylradikal ist eine der am höchsten reaktiven chemischen Verbindungen und ist sehr unselektiv. Deshalb ist es auch offensichtlich, dass es als solches nicht lange im Organismus vorkommt und daher nicht direkt detektierbar ist.

Superoxid $\cdot\text{O}^{2-}$ ist die Quelle der reaktiven Sauerstoffverbindungen H_2O_2 und $\cdot\text{OH}$. Eigentlich ist Superoxidanion ein unvermeidbares Nebenprodukt des Sauerstoffverbrauchs vieler Enzymsysteme wie z.B. in der Atmungskette, in Mikrosomen der Leberzellen, die Xenobiotika abbauen können und in aktivierten Leukozyten während der Phagozytose von Mikroben. [GEISSER 1998]

Erhöhter oxidativer Stress wurde bei fast allen bekannten Krankheiten berichtet, wobei die Ergebnisse auf diesem Gebiet häufig falsch positiv sind. Daher ist eine klare Korrelation zwischen Krankheit und oxidativem Stress bei den meisten pathologischen Zuständen weit entfernt davon, bewiesen zu sein. Allein bei einer handvoll Krankheiten konnte bis jetzt ein definitiver Zusammenhang festgestellt werden.

Mittlerweile ist die Annahme weit verbreitet, dass die Pathogenese und/oder das Fortschreiten der meisten Krankheiten des Menschen mit etabliertem oxidativem Stress in Verbindung gebracht werden kann. Es gab im letzten Jahrzehnt einen regelrechten Boom in der Forschung mit oxidativem Stress. Leider konnte bis heute keine Krankheit überzeugend und erfolgreich mit einer Antioxidantientherapie behandelt werden. Eine der einfachsten von vielen verschiedenen Erklärungen für den mangelnden Erfolg könnte das relativ geringe Wissen über die genauen molekularen Mechanismen, die zu oxidativem Stress in einem bestimmten Gewebe führen, sein. Ein weiterer wichtiger Grund könnte der relative Mangel an Methoden für Nachweis und Messung von oxidativem Stress bzw. oxidativer Schädigung sowie zur Beurteilung eines positiven Effekts einer potentiellen Therapie sein. [GIUSTARINI et al. 2009]

2.3. Anämie

Die Bildung und Entwicklung der Erythrozyten, Erythropoese genannt, findet im Knochenmark statt. Sie erfolgt über Stimulierung mit dem zu 90 % in der Niere gebildeten Hormon Erythropoetin durch Differenzierung von pluripotenten Stammzellen über kernhaltige Erythroblasten zu den Erythrozyten.

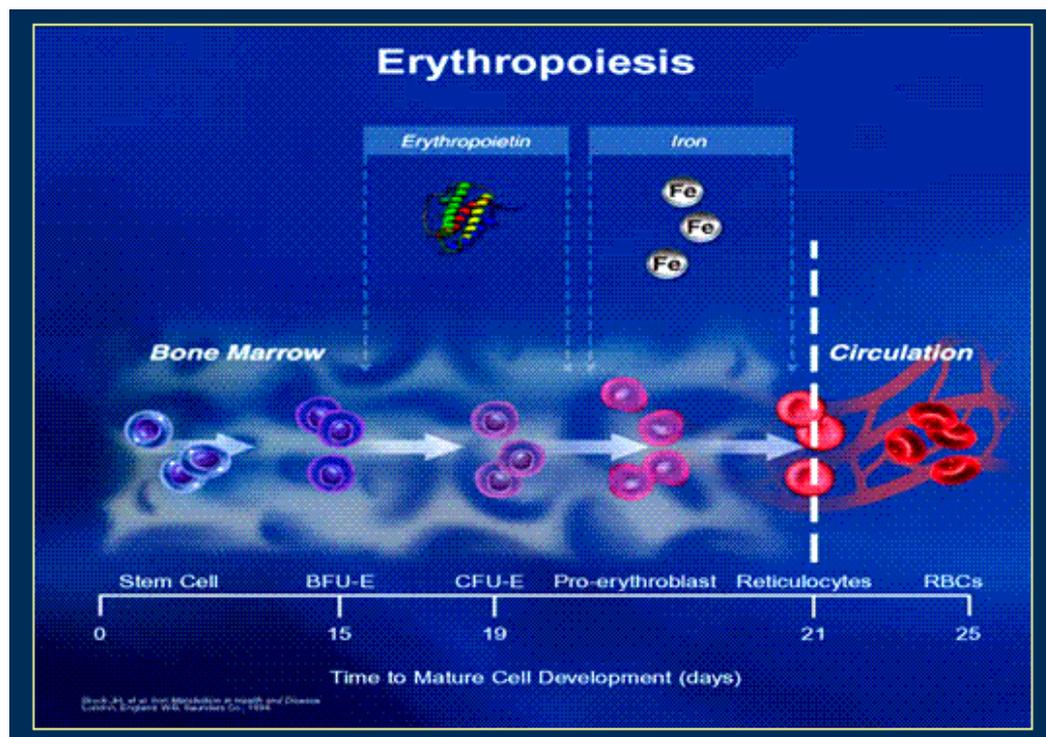


Abbildung 2: Erythropoese [<http://www.hdcn.com/symp/06anna/01/eas/eas1.htm> Stand 8. Juli 2010]

Eine Anämie ist charakterisiert durch eine Verminderung von Erythrozytenzahl (RBC), Hämoglobinkonzentration (Hb) und/oder Hämatokrit (HCT) unter die Referenzwerte, die dem Alter und dem Geschlecht entsprechen. Man unterscheidet verschiedene Formen der Anämie. Somit empfiehlt es sich für die Diagnose einer Anämie alle drei Blutparameter (RBC, Hb und HCT) zu bestimmen sowie die Erythrozytenindizes MCH, MCV und MCHC zu berechnen. MCH entspricht dem Hämoglobingehalt der Erythrozyten, der aus dem Hämoglobinwert und der Erythrozytenzahl berechnet wird. MCV steht für das mittlere Volumen eines einzelnen Erythrozyten und MCHC ist die mittlere Hämoglobinkonzentration. Die Erythrozytenindizes erlauben eine Einteilung der Anämie nach

Morphologie und Hämoglobingehalt der Erythrozyten in mikro-, normo- oder makrozytär sowie hypo-, normo- oder hyperchrom.

Die verschiedenen Formen der Anämie können nach ihrer Pathogenese folgendermaßen eingeteilt werden:

a.) Anämien durch übermäßigen Blutverlust

b.) Anämien infolge verminderter oder ineffektiver Erythropoese

Dazu zählen unter anderem die Eisenmangelanämie sowie die Anämie bei Nierenkrankheiten.

c.) Anämien infolge übermäßigen Erythrozytenabbaus (hämolytische Anämie)

[PSCHYREMBEL 259. Auflage]

2.3.1. Eisenmangelanämie

Die Eisenmangelanämie ist die häufigste Form der Anämie weltweit. Durch den Eisenmangel ist die Biosynthese von Häm verzögert. Infolge dessen, sowie aufgrund der zusätzlich gestörten Erythropoese, ist der Gehalt an Hämoglobin im Blut erniedrigt. Dies führt zur Bildung mikrozytärer Erythrozyten. Deshalb wird die Eisenmangelanämie auch als hypochrome mikrozytäre Anämie bezeichnet. Die Ursachen können vielfältig sein:

a.) Akuter oder chronischer Blutverlust (sowohl physiologisch, als auch pathologisch bedingt)

b.) Ungenügende Nahrungseisenzufuhr

c.) Erhöhter Eisenbedarf (z.B. im Wachstum, bei Schwangerschaft etc.)

d.) Eisenresorptionsstörung

e.) Eisenverteilungsstörung

f.) Eisentransport- und Eisenverwertungsstörung

Der Eisenmangel manifestiert sich in der Regel allerdings erst nach Verbrauch des gespeicherten Eisen in Form von Ferritin und Hämosiderin. Sind diese Speicher erst einmal aufgebraucht, sind typische Symptome der Eisenmangelanämie unter anderem Müdigkeit und Blässe. Das primäre Therapieziel ist das

Ausschalten der Ursache des Eisenmangels. Zum Ausgleich des Eisendefizits sollten, wenn möglich, orale Eisenpräparate (2-wertige Eisenverbindungen) verabreicht werden. Die parenterale Eisenzufuhr in Form von 3-wertigen Eisenverbindungen sollte möglichst vermieden werden und wird nur in Ausnahmefällen empfohlen. [PSCHYREMBEL 259. Auflage]

2.3.2. Anämie chronischer Nierenerkrankungen

Die Anämie bei chronischen Nierenerkrankungen wird auch nephrogene bzw. renale Anämie genannt. Die Schwere der renalen Anämie korreliert mit dem Ausmaß der Nierenfunktionseinschränkung. Ursachen der Anämie bei chronischer Niereninsuffizienz sind die verminderte Produktion von Erythropoetin, der Eisenverlust bei der Dialyse-Behandlung, eine verkürzte Erythrozytenlebensdauer sowie Folsäuremangel. [PSCHYREMBEL 259. Auflage]

Die chronische Nierenerkrankung ist entweder durch Nierenschädigung oder durch eine Glomeruläre Filtrationsrate (GFR) unter 60 ml/min/1,73 m² für mindestens drei Monate gekennzeichnet. Nierenschädigung ist eine pathologische Auffälligkeit oder durch Schädigungsmarker charakterisiert wie zum Beispiel Auffälligkeiten in Blut- und Urintests. Die chronische Nierenschädigung wird je nach Abnahme der GFR in fünf Phasen eingeteilt, wobei die letzte Phase die terminale Niereninsuffizienz (engl.: End-stage renal disease, ESRD) darstellt. [NKF KDOQI 2002, Internet]

Die Anämie, die mit der chronischen Nierenkrankheit einhergeht, wird routinemäßig mit rekombinantem humanem Erythropoietin (rhuEPO) behandelt. Dies führt zu einer allgemeinen Verbesserung des Gesundheitszustands des Patienten, zu einer Reduktion der Größe des linken Ventrikel und zu einer geringeren kardiovaskulären Mortalität. Aber der Einsatz von rhuEPO führt auch zu einer effizienten Ausnutzung und einer raschen Entleerung der Eisenspeicher, so dass die meisten Dialysepatienten ab einem gewissen Stadium Eisensupplementation benötigen, um die Erythropoese aufrecht zu erhalten. [ESPOSITO et al. 2002] Die Eisendefizienz tritt außerdem aufgrund der schlechten Eisenabsorption der Patienten sowie der laufenden Blutverluste (z.B. bei der Dialyse, häufigen Blutabnahmen für Diagnosen) auf. [JOHNSON et al. 2010] Deshalb wird heutzutage die Behandlung fast routinemäßig mittels intravenöser Eisen-

therapie in Form von Eisen-Kohlenhydratkomplexen durchgeführt. [ZAGER 2006]

Die zur Zeit benutzten i.v.-Eisenpräparate bestehen aus einem Eisen(III)-Kern umgeben von einer Kohlenhydrathülle. Letztere soll die Belastung mit freien Fe^{3+} verhindern, die eiseninduzierten oxidativen Stress verursachen könnten. Inwieweit die verschiedenen Präparate dieses Ziel erreichen, und daher potentielle klinische Nebenwirkungen verhindern, bleibt ein heiß umstrittenes Thema. [AGARWAL et al. 2007; ZAGER et al. 2002; JOHNSON et al. 2010]

2.4. Eisentherapie – Parenterale Eisenpräparate

Das Therapieziel bei Eisenmangelanämie ist, genügend Eisen zur Verfügung zu stellen, um die Anämie zu korrigieren und die Eisenspeicher wieder aufzufüllen. Orales Eisen ist die Behandlung der Wahl für den Großteil der Patienten, da sie effektiv, sicher und ökonomisch ist. Das Risiko einer lokalen und systemischen Nebenwirkung hat bis jetzt den Gebrauch von parenteralem Eisen eingeschränkt. Unter bestimmten Voraussetzungen muss allerdings mit intravenösem Eisen therapiert werden. Indikationen für eine intravenöse Eisentherapie stellen folgende klinische Situationen dar:

- Intoleranz zu oralen Präparaten
- Schwere oder sehr schwere Eisendefizienz, bei der ein rascher therapeutischer Effekt gebraucht wird
- Malabsorption des Eisens durch intestinale Erkrankungen
- Patienten mit schlechter Compliance bei oralen Eisengaben
- Funktionelle Eisendefizienz z.B. bei Patienten die eine rhuEPO Behandlung erhalten, bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz oder bei Eigenblutspende
- Eisendefizienz, bei der orale Eisengaben unzureichend sind, z.B. bei chronischem Blutverlust
- Bedingungen mit einem Risiko der Interaktion zwischen Eisen und Begleitmedikation
- Bedingungen, bei denen die Eisenspeicher spärlich bzw. vollständig entleert sind, z.B. aufgrund von chronischem Blutverlust, die aber wichtig für die weitere Therapie sind, z.B. in Kombination mit Erythropoietin [CRICHTON et al. 2008]
- Genetisch bedingter Hepcidinüberschuss (Matriptasedefizit)

Polynukleäre Eisenhydroxidkomplexe wie Eisensaccharose, Eisendextran und Eisendextrin, die für die parenterale Anwendung geeignet sind, zeigen eine geringe Toxizität. Das ist der Tatsache zu verdanken, dass die chemische Form und Struktur dieser Eisenkomplexe ähnlich der des physiologisch vorkommen-

den Ferritins ist, was bedeutet, dass das Eisen in einer polynukleären, nicht-ionischen Eisen(III)-Hydroxid Form gebunden ist. Der große Vorteil dieser Präparate ist die Abwesenheit von redoxaktiven Eisenionen. [CRICHTON et al. 2008]

Im Gegensatz zur potentiellen Eisenüberladung gibt es keinen einheitlichen oberen Grenzwert für Serumferritin, so dass sogar Patienten mit Serumferritin-Werten von $>600 \text{ ng mL}^{-1}$ von einer Eisensupplementierung profitieren könnten, was durch einen Anstieg des Hämoglobin angedeutet wird. Eine Transferrinsättigung $>45 \%$ könnte auch auf eine Eisenüberladung von Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz sowie bei nichtrenalen Patienten hinweisen. Allerdings gibt es wenig Informationen über den Metabolismus oder die potentielle Langzeittoxizität von regelmäßig verabreichtem i.v. Eisen. Die Kapazität des Transportproteins Transferrin wird, möglicherweise vorübergehend, jedoch regelmäßig überschritten, was zu einer Akkumulation von labilem Plasmaeisen (LPI) führt während die Transferrinsättigung im Normalbereich (30-35 %) bleibt. [ESPOSITO et al. 2002]

LPI entspricht dem nicht-transferrin gebundenem Plasmaeisen (NTBI) und besteht, wie man annimmt, aus einer heterogenen Fraktion Eisen welches entweder an Plasmaalbumin oder an Citrat und anderen wenig definierten, negativ geladenen Liganden gebunden ist. [BREUER et al. 2000] Die pathophysiologische Relevanz des LPI liegt darin, dass die Aufnahme in die Gewebe im Gegensatz zu Transferrineisen nicht durch das streng geregelte Transferrinrezeptorsystem vermittelt wird. [KLAUSNER et al. 1993] Stattdessen kann LPI in die Zellen über sekundäre Transportwege aufgenommen werden, die nicht durch den zellulären Eisenstatus gesteuert sind. Das kann zu einer Eisenüberladung in empfindlichen Geweben wie dem Herzen führen. Außerdem dient das LPI für Bakterien eher als sofort verfügbare Eisenquelle als transferringebundenes Eisen, was Infektionen fördert. LPI wird mit der Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) assoziiert, die mit der Pathogenese eines Herzinfarkts [SALONEN et al. 1992] sowie mit einer Bakterieninfektion [TIELEMANS et al. 1989] in Verbindung stehen. Das sind die zwei Hauptgründe für Todesfälle bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz [VAN-DIJK et al. 2001; ADAMSON und ESCHBACH 1998]. Daher wurde vorgeschlagen, die Messung des LPI als frü-

hen Marker für Gewebeschäden durch ROS zu verwenden. [ESPOSITO et al. 2002]

Steigt also das LPI, kann es zu einer hohen Eisenaufnahme in die Zellen kommen, was wiederum den intrazellulären labilen Eisenpool (LIP) erhöhen kann. Dieses „freie“ Eisen oder labile Eisen ist der Teil des intrazellulären Eisens, der nicht an Enzyme oder andere Proteine gebunden ist und deshalb toxische Radikalreaktionen auslösen kann. Normalerweise wird der LIP von den zellulären Eisenhomöostasemechanismen streng reguliert und somit auf niedrigem Niveau gehalten, um oxidative Schäden zu vermeiden. Wenn der intrazelluläre LIP ansteigt, wird zwar die Ferritinsynthese erhöht, trotzdem sind die Zellen, etwa nach parenteralen Eisengaben, eine gewisse Zeit einem erhöhten LIP ausgesetzt, bis dieses Eisen in Ferritin eingebaut wurde. [STURM et al. 2003]

Die einzelnen Eisenpräparate, die für eine parenterale Verabreichung zur Verfügung stehen, sind sehr unterschiedlich, was einen Vergleich untereinander sehr schwierig macht. Die gängigen Medikamente unterscheiden sich stark in wichtigen pharmakologischen Parametern wie Halbwertszeit, Molekulargewicht und Verabreichungsmenge. Daher ist es offensichtlich, dass auch die Effekte in vivo verschieden sind, wobei jedes Präparat seine Vor- und Nachteile hat. [AGARWAL 2004]

2.4.1. Eisenpräparate im Überblick

Für die parenterale Eisentherapie steht eine Reihe von Eisenpräparaten zur Verfügung. Die Eisenhydroxid-Kohlenhydrat-Komplexe können wie folgt unterteilt werden (nach CRICHTON et al. 2008):

- Eisendextran (zB Dexferrum, InFeD) und Eisendextrin (zB Ferric Carboxymaltose: Ferinject). Diese Eisenkomplexe zeigen große strukturelle Homogenität und deshalb nur langsame und kompetitive Verteilung des komplexierten Eisen zu endogenem Eisenbindungsprotein. Diese werden vom Plasma über das retikuloendotheliale System aufgenommen; das Eisen wird abgespalten und bindet an Transferrin und geht teilweise wieder ins Plasma zurück, von wo aus es als Transferrin das Knochenmark erreicht und so für die Hämoglobinsynthese zur Verfügung steht.

- Eisensaccharatkomplexe: Venofer®, Fesin®. Diese Komplexe verteilen das komplexierte Eisen vom Serum zu endogenen Eisenbindungsproteinen mit einer Halbwertszeit von zirka 6 Stunden. Hierbei wird das Eisen hauptsächlich über das retikuloendotheliale System der Leber aufgenommen, sowie über Transferrin und Apoferritin der Milz und des Knochenmarks. Es wird rasch metabolisiert und ist für die Erythropoese verfügbar.
- Eisen(III)-gluconate: Ferrlecit®; Eisen(III)-citrat und Eisen(III)-Sorbitol: Jectofer®. Diese Eisenkomplexe verteilen ihr komplexiertes Eisen an alle Proteintypen. Nur bei Eisengaben in kleinen Dosen kann das Eisen quantitativ von Transferrin aufgenommen werden. Bei einer Plasmaeisenkonzentration welche die Eisenbindungskapazität des Transferrin überschreitet, wird Eisen an Proteine wie Albumin gebunden und laufend in den Stoffwechsel geliefert. Alle Eisenkomplexe mit einem Molekulargewicht unter 18000 sind anfällig für eine ungünstige renale Ausscheidung. [CRICHTON et al. 2008]

Da das optimale Präparat noch nicht gefunden wurde, werden auch mit weiteren Fe-Verbindungen Studien durchgeführt:

- Eisenpyrophosphat: Lösliches Fe-Pyrophosphat (Fe-PP) wurde von Gupta und Crumbliss (2000) als direkter Zusatz in das Dialysat vorgeschlagen. [GUPTA und CRUMBLISS 2000] Es wurde außerdem an Ratten getestet, ob es über Iontophorese transdermal aufgenommen werden kann. [MURTHY und VAKA 2008] Wie sicher und effektiv Fe-PP in der Behandlung der Eisenmangelanämie ist, muss allerdings noch geklärt werden.
- Ferumoxytol: Das erst kurzlich für die parenterale Eisentherapie entdeckte Ferumoxytol (FMX) ist ein Eisenoxid-Nanopartikel, umhüllt von einem Polyglukose-Sorbitol-Carboxymethylether. Das eigentliche Ziel war, diese Verbindung in der Magnetresonanz-Angiographie einzusetzen. Deshalb kann FMX rasch und in großen Dosen verabreicht werden. Sowohl im Zellexperiment, als auch im Mausmodell scheint FMX ersten Untersuchungen zufolge katalytisch inaktiv zu sein. [JOHNSON et al. 2010] Humanstudien werden sicherlich bald folgen.

3. Material und Methoden

3.1. Rattenmodell

An der Abteilung für Gastroenterologie und Hepatologie der Medizinischen Universität Wien wurde von Dr. Rayko Evstatiev eine Studie an eisenarm gefütterten Ratten durchgeführt, wobei die Leberproben dieser sowie der Kontrolltiere dem Institut für Medizinische Chemie zur weiteren Untersuchung zur Verfügung gestellt wurden.

Es handelt sich um outbred Sprague-Dawley Ratten, die zu Beginn der Studie zwischen zwei und drei Wochen alt waren. Insgesamt wurden 48 Ratten auf zwei Gruppen, die „Eisenmangel-“ bzw. „Kontrollgruppe“, aufgeteilt. Die Ausgangswerte bei Gewicht und hämatologischen Parametern waren dabei in beiden Gruppen vergleichbar. Die „Eisenmangelgruppe“ wurde 3 Wochen lang mit „C1038/low Fe“ Futter der Firma Altromin mit einem Eisengehalt von unter 10 mg/kg Futter gefüttert, während die Kontrollgruppe „C1000 control diet“ Futter der Firma Altromin mit einem Eisengehalt von 180 mg Fe/kg Futter erhielt. Wasser und Futter standen während der Studie ad libitum zur Verfügung. Es erfolgte eine Blutabnahme von jeweils 250 µl/Abnahme zur Baseline (vor Verabreichung des speziellen Futters) sowie eine weitere unmittelbar am Ende der Studie. Nach 7, 14 und 21 Tagen wurden aus jeder Gruppe je 8 Ratten mittels Überdosis Thiopental-Na i.p. getötet und anschließend mittels Herzpunktion ausgeblutet. Die Lebern wurden entnommen, ein Aliquot bei -80° C eingefroren und anschließend in dieser Studie untersucht. Den Rattenleberproben wurden fortlaufende Nummer vergeben (siehe Tabelle 1).

Rattenleberprobe Nr. 33 aus Woche 3 der Kontrollgruppe war nicht verfügbar.

Probennummer	Code	Gruppe	Probennummer	Code	Gruppe
1	1.1	Woche 1 Kontrolle	25	4.1	Woche 2 Fe-Mangel
2	1.2		26	4.2	
3	1.3		27	4.3	
4	1.4		28	4.4	
5	1.5		29	4.5	
6	1.6		30	4.6	
7	1.7		31	4.7	
8	1.8		32	4.8	
9	2.1	Woche 1 Fe-Mangel	33	5.1	Woche 3 Kontrolle
10	2.2		34	5.2	
11	2.3		35	5.3	
12	2.4		36	5.4	
13	2.5		37	5.5	
14	2.6		38	5.6	
15	2.7		39	5.7	
16	2.8		40	5.8	
17	3.1	Woche 2 Kontrolle	41	6.1	Woche 3 Fe-Mangel
18	3.2		42	6.2	
19	3.3		43	6.3	
20	3.4		44	6.4	
21	3.5		45	6.5	
22	3.6		46	6.6	
23	3.7		47	6.7	
24	3.8		48	6.8	

Tabelle 1: Codierung und Zuweisung der Rattenleberproben zu den Gruppen

3.1.1. Aufbereitung der Rattenleberproben

Die Rattenleberproben wurden modifiziert nach der Methode von Cook und Yu (1998) aufbereitet.

Verwendeter Puffer: 5 mM Na-K-Phosphatpuffer (pH 7,4), 1 mM PMSF in DMSO

Herstellung (1 Liter): Kaliumdihydrogenphosphat wurde eingewogen (0,68 g/l = 5 mM) und in Aqua bidest. gelöst. Mit NaOH wurde der pH auf 7,4 eingestellt und mit Aqua bidest. auf ein Volumen von 1 Liter ergänzt.

1 μ l 1 M PMSF in DMSO/ 1 ml Puffer

Das Leberstück wurde kurz in 5 mM Na-K-Phosphatpuffer eingetaucht, um noch außen anhaftendes Blut zu entfernen. Anschließend wurden ungefähr 300 mg Leber in einem Eppendorfgefäß eingewogen und 1 ml 5 mM Na-K-Puffer, pH 7,4, 1 mM PMSF in DMSO/300 mg Leber dazugegeben. Mit Hilfe einer Schere wurde die Leber grob zerschnitten und dann 2 Mal ca. 20 Sekunden mit dem Homogenisierer Ultra-Turrax T8 (IKA Labortechnik) behandelt. Dazwischen wurden die Proben immer auf Eis gekühlt.

Nach der Homogenisierung der Proben wurden die Homogenate auf mindestens 4 Aliquote in Eppendorfgefäße aufgeteilt und bei -80°C gelagert.

3.1.2. Proteinbestimmung nach Bradford

Der Proteingehalt der Rattenleberproben wurde mit der Methode nach Bradford (1976) mit dem „BioRad Bradford-Reagenz“ (von BioRad, Wien) gemessen. Die Methode beruht darauf, dass sich je nach Proteingehalt die Farbe von Coomassie Brilliant Blue durch Proteinbindung von grün-braun zu blau verändert. Das Absorptionsmaximum einer sauren Lösung dieses Farbstoffs verschiebt sich dabei von 465 nm auf 595 nm.

Bei jeder Messung wurden zur Erstellung der Eichgeraden Proteinstandards (Bovines Serum Albumin, BSA; Amresco) mit einer Konzentration von 0, 2, 4, 6, 8 und 10 μ g/ml hergestellt (siehe Pipettierschema, Tabelle 2).

	H₂O	BSA (1 mg/ml)	Konzentration
Leerwert	800 µl	--	--
Standard 1	780 µl	20 µl	2 µg/ml
Standard 2	760 µl	40 µl	4 µg/ml
Standard 3	740 µl	60 µl	6 µg/ml
Standard 4	720 µl	80 µl	8 µg/ml
Standard 5	700 µl	100 µl	10 µg/ml

Tabelle 2: Pipettierschema zur Erstellung der Standardreihe, Proteinbestimmung

Alle Rattenleberproben wurden zeitgleich aufgetaut und 10 min. bei 2300xg, 4°C zentrifugiert. Es wurden 1:50 Verdünnungen aller Proben hergestellt und davon jeweils 10 µl für die Proteinbestimmung eingesetzt. Alle Ansätze wurden ebenfalls mit Aqua bidest. auf ein Volumen von 800 µl ergänzt. Anschließend wurde sowohl zu den Proben, als auch zu den Standards 200 µl Farbreagenz (Bio-Rad, Protein Assay) mittels Dispenser dazugegeben und gevortext. Nach 20 min. Inkubation wurden die Proben noch einmal gevortext und jeweils von jeder Probe zwei Aliquots à 200 µl in eine 96-Well-Platte (Greiner) pipettiert. Die Extinktionsmessung erfolgte nach ca. 35 min. bei 595 nm im Plattenphotometer Anthos Zenyth 3100 von HVD, Wien.

Die Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe des Programms GraphPad Prism® 5 der Firma GraphPad Software.

3.1.3. Eisenbestimmung – Ferrozin-Methode

Für die Bestimmung des Eisengehalts der Leberproben wurde die Ferrozin Methode nach Fish (1988) verwendet. Die Methode beruht darauf, dass Ferrozin, ein Eisenchelator für zweiwertiges Eisen, einen violetten Eisen(II)-Ferrozin-Komplex bildet, der photometrisch bei einer Wellenlänge von 540 nm gemessen werden kann.

Zuerst wird durch saures Permanganat und Inkubation bei 60°C das Eisen aus Proteinen und stabilen Eisenkomplexen freigesetzt. Danach wird das Eisen durch Ascorbinsäure vollständig zu zweiwertigem Eisen reduziert und quantitativ mit Ferrozin komplexiert.

Da Kupferionen auch mit Ferrozin reagieren, ist dem zweiten Reagenz der Cu-Chelator Neocuproin zugesetzt. Cu-Neocuproin absorbiert bei 540 nm kein Licht.

Weiters wurde in einem Kontrollversuch mit reinem Hämoglobin getestet, ob möglicherweise in den Proben enthaltenes Hämoglobin in diesem Wellenlängenbereich Licht absorbiert und dadurch die Bestimmung stört. Bei dem Kontrollversuch zeigte sich jedoch, dass auch Hämoglobin durch die Inkubation mit Permanganat abgebaut wird (Daten nicht gezeigt). Mit der Ferrozin-Methode wird also auch das Häm-Eisen mitgemessen.

Verwendete Reagenzien (Reagenzien A und B sind vor Licht zu schützen):

Reagenz A: 10 ml 1,2 M HCl (Merck) wurden mit

10 ml 4,5 % (w/v) KMnO_4 (Merck) gemischt und sofort verwendet.

Reagenz B (für 20 ml Reagenz):

64 mg Ferrozin (3-(2-Pyridyl)-5,6-bis(4-Phenylsulfonsäure)-1,2,4-Triazine (Sigma)

64 mg Neocuproin (Sigma)

7,04 g Ascorbinsäure (Sigma)

7,76 g Ammoniumacetat (Merck)

Bei der Herstellung von Reagenz B wurden zuerst Ascorbinsäure und Ammoniumacetat in etwas Aqua bidest. gelöst, da sich sonst Präzipitate bilden. Anschließend wurde Ferrozin und Neocuproin zugegeben und mit Aqua bidest. auf 20 ml ergänzt. Das Reagenz wurde lichtgeschützt bei 4° C für maximal 4 Wochen gelagert.

Durchführung:

Die Proben wurden bei 300xg, 4°C, 10 min. zentrifugiert. Mit einer Eisenstandardlösung wurde eine Standardreihe mit einer Konzentration zwischen 0,1 und 2,0 µg Fe/ml hergestellt. Von den Proben wurden jeweils 40 µl eingesetzt und mit Aqua bidest. auf ein Volumen von 500 µl ergänzt. Zu den Standards, Pro-

ben und dem Leerwert wurden jeweils 250 µl Reagenz A zugegeben, gevortext und 2 h in einem Wasserbad bei 60°C inkubiert. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur wurden zu jedem Ansatz 50 µl Reagenz B mittels Handdispenser zugegeben und gevortext. Die Proben wurden 15 min. inkubiert und anschließend 10 min. bei 300xg zentrifugiert.

Danach wurden von jedem Ansatz jeweils 200 µl in eine 96-Well-Platte (Greiner) im Doppelansatz pipettiert. Die Messung der Absorption erfolgte 30 min. nach Zugabe von Reagenz B bei 540 nm im Plattenphotometer Victor1420 Multilabel Counter (Wallac).

Die Auswertung erfolgte mittels linearer Regression und Standardkurvenkalkulation mit dem Programm GraphPad Prism® 5 der Firma GraphPad Software.

3.1.4. Hämoglobinbestimmung mittels 2,7-Diaminofluoreszein (DAF)

Die Rattenleberhomogenate wurden auf ihren Hämoglobingehalt mittels 2,7-Diaminofluoreszein (DAF), nach einer Methode von Kaiho und Mizuno (1985), getestet, um auf den Häm-Eisengehalt schließen zu können. Die Reaktion beruht darauf, dass die Pseudoperoxidaseaktivität von Hämoglobin die Oxidation von DAF in Gegenwart von H₂O₂ zu Fluorenblau katalysiert.

Verwendete Reagenzien (je nach Probemenge hergestellt):

DAF-Reagenz (lichtempfindlich):

100 µl TRIS-HCl (200mM, pH 7,5)

10 µl Diaminofluoreszein (10mg/ml Eisessig (90%ig))

1 µl Wasserstoffperoxid (30%ig; Merck)

Durchführung:

Es wurde eine Standardreihe mit einer 0,3 mg/ml Hämoglobinlösung mit Konzentrationen zwischen 2,5 und 50 µg/ml erstellt. Die Rattenleberproben wurden bei 300xg, 4°C, 10 min. zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand 1:30 verdünnt und jeweils 100 µl dieser Verdünnung bzw. der Standards und des Leerwerts in Doppelbestimmung auf eine 96-Well-Platte aufgetragen. Nach Zu-

satz von 100 µl DAF-Reagenz wurde die Platte mit Alufolie abgedeckt und 10 min. am Rotationsschüttler The Belly Dancer (Stovell Life Science Inc.) inkubiert. Anschließend erfolgte die Messung der Absorption bei 620 nm im Plattenphotometer Anthos Zenyth 3100 (HVD, Wien).

Die Auswertung erfolgte mittels linearer Regression mit dem Programm GraphPad Prism® 5 der Firma GraphPad Software.

3.1.5. Bestimmung des Peroxidgehalts

3.1.5.1. FOX Assay

Mit dem FOX (= Ferrous Oxidation Xylenol Orange) Assay nach Nourooz-Zadeh et al. (1994) können (Lipid-)Hydroperoxide nachgewiesen werden. Die Methode beruht auf der Oxidation von Fe^{2+} durch Hydroperoxide im sauren Milieu und einer anschließenden Farbreaktion mit Xylenolorange. Xylenolorange bindet Fe^{3+} -Ionen mit hoher Selektivität und bildet dabei einen violetten Farbkomplex mit einem Extinktionsmaximum bei 560 nm.



Verwendete Reagenzien:

Stammlösung 1 (10x)

7,6 mg Xylenolorange (Sigma)

9,8 mg Ammonium-Eisen-Sulfat (Merck)

in 10 ml 250 mM H_2SO_4 (Merck) gelöst

Stammlösung 2

9,69 mg Butylhydroxytoluol (BHT; Sigma)

in 10 ml Methanol (100 %; Fisher Scientific) gelöst

Herstellung FOX Reagenz:

Stammlösung 1 und 2 wurden erst kurz vor dem Versuch 1:10 (Lsg. 1: Lsg. 2) gemischt. Beide Reagenzien wurden bei 4° C gelagert. Stammlösung 1 wurde maximal 48 Stunden gelagert.

Standard:

Zuerst wurde eine 25 mM H₂O₂-Stammlösung hergestellt: 43 µl H₂O₂ (35 %) wurden in 20 ml Aqua bidest. pipettiert. Diese H₂O₂-Stammlösung wurde dann 1:100 verdünnt wodurch eine 250 µM H₂O₂-Lösung erhalten wurde. Für die Messung von niedrigen Peroxidmengen in der Probe wurde diese Lösung noch einmal 1:10 verdünnt, um Standards mit niedrigeren Konzentrationen herzustellen.

	Konzentration	250 µM H ₂ O ₂	25 µM H ₂ O ₂	Aqua bidest.	FOX Reagenz
Standard 1	250 µM	10 µl	--	--	350 µl
Standard 2	200 µM	8 µl	--	2 µl	350 µl
Standard 3	150 µM	6 µl	--	4 µl	350 µl
Standard 4	100 µM	4 µl	--	6 µl	350 µl
Standard 5	50 µM	2 µl	--	8 µl	350 µl
Standard 6	25 µM	--	10 µl	--	350 µl
Standard 7	12,5 µM	--	5 µl	5 µl	350 µl
Leerwert	--	--	--	10 µl	350 µl

Tabelle 3: Pipettierschema zur Erstellung der Standardreihe, FOX Assay

Durchführung:

Die Rattenleberproben wurden vor dem Versuch bei 2300xg, 4°C 10 min. zentrifugiert. 10 µl der Probe sowie des Leerwerts und der Standardreihe, mit Konzentrationen zwischen 12,5 und 250 µM, wurden mit 350 µl frisch zubereitetem FOX Reagenz versetzt und 5 min. inkubiert. Danach wurden die Proben zentrifugiert (1000xg, 3 min.), um die durch die Methanolzugabe ausgefallenen Proteine zu entfernen.

Jeweils 200 µl der Überstände der Proben wurden in eine 96-Well-Platte (Greiner) pipettiert und mit einer Plastikfolie abgedeckt, um das Verdampfen von Methanol zu verhindern. Nach einer Gesamtinkubationszeit von 30 min. wurde die Extinktion bei 540 nm im Plattenphotometer Victor1420 Multilabel Counter (Wallac) bzw. bei 535 nm im Plattenphotometer Anthos Zenyth 3100 (HVD, Wien) gemessen.

Die Auswertung erfolgte mittels linearer Regression mit dem Programm GraphPad Prism® 5 der Firma GraphPad Software.

3.1.5.2. Überprüfung des FOX Assay mit TCEP

Nach Nourooz-Zadeh et al. (1994) und Thermo Fisher Scientific Inc. (2010) sollten Proben mit niedrigem Peroxidlevel einer Überprüfung der Absorption des Assays unterzogen werden. Dafür wird TCEP (= Tris(2-carboxyethyl)phosphin) verwendet, da dieses mit den Lipidperoxiden reagiert und diese zu ihren entsprechenden Alkoholen reduziert. Somit bildet nur endogenes Fe^{3+} den violetten Komplex mit Xylenolorange. Es erfolgt ein Vergleich der Messung mit TCEP bzw. mit Methanol alleine als Kontrolle mit dem in Kapitel 3.1.5.1 beschriebenen FOX Assay.

Reagenz: 10 mM Tris(2-carboxyethyl)phosphin (Calbiochem.) in Methanol;
Lagerung bei 4° C

Durchführung:

30 µl Probe (zentrifugiert bei 2300xg, 4°C, 10 min.) wurden mit 10 µl Methanol oder 10 µl 10 mM TCEP in Methanol versetzt (in Doppelbestimmung). Der Ansatz wurde 30 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 350 µl FOX Reagenz (siehe Kapitel 3.1.5.1) dazugegeben und für weitere 30 min. inkubiert. Währenddessen wurden die Proben bei 1000xg, 3 min. zentrifugiert und je 200 µl des Überstandes wurden in eine 96-Well-Platte (Greiner) transferiert.

Die Extinktionsmessung erfolgte bei 535 nm im Plattenphotometer Anthos Zenyth 3100 (HVD, Wien) und die Auswertung mit dem Programm GraphPad Prism® 5 der Firma GraphPad Software.

3.1.5.3. Peroxid Assay

Hydroperoxide oxidieren Fe^{2+} zu Fe^{3+} bei saurem pH. Bei dem verwendeten Assay reagieren die Peroxide zuerst mit Sorbitol, welches zum Peroxidradikal reagiert. In weiterer Folge löst dieses Radikal die Oxidation von Fe^{2+} zu Fe^{3+} aus. Sorbitol erhöht also in diesem Assay die Sensitivität für Peroxide. Das gebildete Fe^{3+} bildet einen violetten Komplex mit Xylenolorange dessen Absorption photometrisch bei 560 nm gemessen werden kann.

Verwendete Reagenzien:

Reagenz A: 25 mM H_2SO_4 (Merck)

Reagenz B: 200 μM Ammoniumeisensulfat (Merck)

200 μM Xylenolorange (Sigma)

200 mM Sorbitol (Anstalts-Apotheke, AKH Wien)

in 25 mM H_2SO_4 gelöst

Lagerung bei 4° C für maximal eine Woche.

Standard: 250 μM H_2O_2 (siehe FOX Assay)

Doppelansatz in der 96-Well-Platte (Greiner) nach folgendem Pipettierschema:

	Konzentration	250 μM H_2O_2	Aqua bidest.	Reagenz A	Reagenz B
Standard 1	250 μM	10 μl	--	170 μl	180 μl
Standard 2	200 μM	8 μl	2 μl	170 μl	180 μl
Standard 3	150 μM	6 μl	4 μl	170 μl	180 μl
Standard 4	100 μM	4 μl	6 μl	170 μl	180 μl
Standard 5	50 μM	2 μl	8 μl	170 μl	180 μl
Leerwert	--	--	10 μl	170 μl	180 μl

Tabelle 4: Pipettierschema zur Erstellung der Standardreihe, Peroxid Assay

Die Proben wurden bei 2300xg, 4° C 10 min. zentrifugiert und jeweils 8 μl des Überstandes im Doppelansatz in eine 96-Well-Platte pipettiert. Das Volumen

wurde auf 10 µl mit Aqua bidest. ergänzt, sowie eine Standardreihe und ein Leerwert (im Doppelansatz) hergestellt. In jedes Well wurde zuerst 170 µl Reagenz A und anschließend 180 µl Reagenz B pipettiert. Nach 30 min. Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Extinktion bei 595 nm im Plattenphotometer Anthos Zenyth 3100 (HVD, Wien) gemessen.

Die Auswertung erfolgte mittels linearer Regression mit dem Programm Graph Pad Prism® 5 der Firma GraphPad Software.

3.1.5.4. Überprüfung des Peroxid Assay

Um den Anteil, des durch bereits in der Probe vorhandenen Fe^{3+} , abzuschätzen, welches im Peroxid Assay mit Xylenolorange reagiert, wurde das Reagenz B ohne Ammoniumeisensulfat als Kontrolle hergestellt. Die Proben wurden bei 2300xg, 4° C, 10 min. zentrifugiert und jeweils 10 µl Überstand wurde sowohl mit normalem Reagenz B (siehe 3.1.5.3 Peroxid Assay), als auch mit dem Kontrollreagenz B (ohne Ammoniumeisensulfat) im Doppelansatz 30 min. lang inkubiert. Die Extinktion wurde bei 595 nm im Plattenphotometer Anthos Zenyth 3100 (HVD, Wien) gemessen.

Kontrollreagenz B: 200 µM Xylenolorange (Sigma)

200 mM Sorbitol (Anstalts-Apotheke, AKH Wien)

in 25 mM H_2SO_4 (Merck) gelöst

Lagerung bei 4° C für maximal eine Woche.

3.2. Harnstoffgelelektrophorese

Die Auftrennung und Visualisierung der unterschiedlich stark mit Eisen beladenen Formen des Transferrin (Apotransferrin, Monoferrisches Transferrin und Holotransferrin) wurde mittels Harnstoffgelelektrophorese nach einer Methode von Makey und Seal (1976) durchgeführt.

3.2.1. Herstellung der Gele

Zum Gießen der Gele wurden Mini PROTEAN Tetra System Apparaturen von Bio-Rad, entsprechende Gläser, 1,5 mm Spacer und 1,5 mm 10-Well-Kämme verwendet.

Die Gläser, Spacer und Kämme wurden zur Fettentfernung mit 70 % Ethanol gereinigt. Der Gummibelag der Ständer wurde zuerst mit Parafilm und etwas Vaseline bedeckt, um ein Auslaufen der Gele zu verhindern. Danach wurden die Glasplatten sorgfältig in die Halterung sowie in den Ständer eingespannt. Anschließend wurden die Kämme platziert.

Die Gellösung wurde mit Hilfe einer Pipette zwischen die Gläser pipettiert, so dass diese vollständig befüllt waren. Dies wurde so lange wiederholt bis sich der Gel-Spiegel nicht mehr gesenkt hat.

Die Gele konnten mindestens zwei Stunden auspolymerisieren, danach wurden die Probenauftragskammern mit 1 x Laufpuffer gefüllt und über Nacht mit nassen Tüchern und Plastikfolie bedeckt bei 4° C gelagert.

Verwendete Reagenzien und Lösungen:

Laufpuffer (Lagerung bei 4° C)

20 x Laufpuffer (2 M-Tris, 0,2 M-Borat, pH 8,4)

60,57 g Tris (Merck)

3 g Na-Borat (Pharmacia Biotech)

pH 8,4

ad 250 ml mit Aqua bidest.

1 x Laufpuffer: 50 ml 20 x Laufpuffers (siehe oben) wurden mit Aqua bidest auf ein Volumen von 1000 ml ergänzt.

Gellösung für 2 Gele:

4 ml 30 % Acrylamid (Roth)

1 ml 20 facher Laufpuffer

15 ml 8 M Harnstoff (Roth)

Direkt vor dem Gießen der Gele wurden

100 µl 10 %iges Ammoniumpersulfat (APS) und

10 µl N,N,N',N'-Tetramethylenediamin (TEMED; Bio-Rad)

zugesezt. APS und TEMED dienen als Radikalstarter für die Gelpolymerisation.

3.2.2. Gewinnung von Serum

Blut eines gesunden Probanden wurde mittels Blutentnahmeröhrchen (Vacuette Serum-Röhrchen) abgenommen, ungefähr 15 min. bei Raumtemperatur stehen gelassen, um vollständig koaguliertes Blut zu erhalten, und anschließend bei 800xg, 15 min zentrifugiert. Das Serum wurde abpipettiert und der Blutkuchen verworfen.

3.2.3. Inkubation von humanem Serum mit parenteralen Eisenpräparaten

Serum wurde mit vier verschiedenen Eisenpräparaten (siehe Tabelle 5) mit unterschiedlichen Eisenkonzentrationen beladen. Die sieben verschiedenen Eisenkonzentrationen wurden über eine Verdünnungsreihe hergestellt, wobei die höchste Konzentration 330 mg Fe/ml betrug. Die Proben wurden 5 Stunden im Wasserbad bei 37°C inkubiert. Für die Kontrolle wurde reines Serum verwendet.

Eisenpräparat	Substanz	Eisengehalt des Präparats	Ausgangslösung für Verdünnungsreihe (330 mg Fe/ml)
Eisenammonium-citrat (FAC)	Modell für niedermolekulares Eisen	20 mg Fe/ml	1,65 µl FAC/ 100 µl Serum
Venofer (Fa. Vifor)	Eisensaccharat	20 mg Fe/ml	1,65 µl Venofer/ 100 µl Serum
Ferinject (Fa. Vifor)	Eisencarboxymaltose	50 mg Fe/ml	0,66 µl Ferinject/ 100 µl Serum
Fe-Pyrophosphat (Fe-PP)	Lösliches Fe-PP, pH 7	4 mg Fe/ml	8,25 µl Fe-PP/ 100 µl Serum

Tabelle 5: Verwendete Eisenpräparate und ihr Eisengehalt

Nach 5-stündiger Inkubation bei 37° C wurden jeweils 20 µl Probe entnommen. Anschließend wurde eine Fällung mit Rivanol durchgeführt, wodurch im Serum enthaltene Plasmaproteine, wie Albumin und alpha1- bzw. alpha2-Globuline, ausgefällt wurden. Beta-Globuline, welche Transferrin enthalten, sowie gamma-Globuline bleiben in Lösung. Für die Fällung wurden 20 µl Serum mit 70 µl 0,6 % Rivanol (Acridin) (30 mg/ 5 ml 1 x Tris-Borat-Laufpuffer) und 10 µl Glycerin versetzt. Die dadurch ausgefällten Plasmaproteine sind durch Trübung der Lösung sichtbar und konnten durch 5 min. Zentrifugation bei 2300xg entfernt werden.

Danach wurden 40 µl des Überstandes in ein neues Eppendorfgefäß transferiert und entweder direkt für die Harnstoffelektrophorese verwendet oder bei -20° C gelagert.

Vor dem Auftragen wurden die Proben bei 800xg für 1 min. zentrifugiert um die gesamte Probemenge in der Spitze des Eppendorfgefäßes zu sammeln.

Für die Elektrophorese wurde die unter Kapitel 3.2.1. beschriebenen Harnstoffgele in die Apparatur nach Anleitung eingebaut und die Kammern mit 1 x Laufpuffer befüllt. Die Probenauftragstaschen der Gele wurden mit Hilfe einer Spritze mit 1 x Laufpuffer gespült, um ausgefallenen Harnstoff zu entfernen. Die Proben wurden vorsichtig in jeweils eine Tasche pipettiert. Zum Schluss wurde als Kontrolle Apo- sowie Holotransferrin aufgetragen.

Apotransferrin (pro Gel): 15 µl Apotransferrinlösung (1 mg/ml)

5 µl Sample buffer

Holotransferrin (pro Gel): 15 µl Apotransferrinlösung (1 mg/ml)

2 µl FAC-Lösung

5 µl Sample buffer

5x Sample buffer: 5 ml Glycerol

500 µl 20 x Laufpuffer

5 ml Aqua bidest

500 µl 0,05 % Bromphenolblau

Anschließend wurden die Gelkammern mit Laufpuffer aufgefüllt und die Apparatur in den Kühlschrank gestellt. Die Gelelektrophorese erfolgte bei 120 V (V = const.) 2,5 Stunden bei 4° C.

Im Anschluss wurden die Gele aus der Apparatur genommen und mit Amidoschwarz gefärbt. Anschließend wurde mit Amidoschwarz-Destain entfärbt, wobei ein Schwämmchen zur Pigmentabsorption in die Entfärbelösung getaucht wurde. Die Gele wurden so lange entfärbt, bis der Hintergrund des Gels wieder transparent war.

Färbelösung:

Amidoschwarz-Lösung: 5 mg Amidoblack (BioRad)

222 ml Methanol (Merck)

56 ml Eisessig (Merck)

ad 500 ml Aqua bidest.

Entfärbelösung:

Amidoschwarz-Destain: 222 ml Methanol (Merck)

56 ml Eisessig (Merck)

ad 500 ml Aqua bidest.

Das gefärbte Gel wurde mit dem Imager Fusion Fx7 (Peqlab Biotechnologie GmbH) fotografiert und anschließend mit dem Programm AlphaEase FC™, Version 3.2.1 der Firma Alpha Innotech Corporation densitometrisch ausgewertet.

3.3. Messung der ROS-Bildung in humanen HepG2 Zellen

3.3.1. Zellkultur

HepG2 Zellen wurden als Modell verwendet, da diese menschliche Leberzellen sind und die Leber sowohl ein Hauptspeicherort für Eisen ist, als auch als erstes von oxidativen Schäden betroffen ist. [MUNOZ et al. 2009] Die Zellen wurden in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) mit 10 % FCS (Fötale Kälberserum), 2 mM L-Glutamin und 50 µg/ml Gentamycin kultiviert. Die Zellen wurden unter Standardzellkulturbedingungen, bei 5 % CO₂ und 37°C, kultiviert.

3.3.2. Messung von oxidativem Stress mittels DCF-Methode

2',7'-Dichlorodihydrofluorescein-diazetat (DCF-DA) wurde dazu verwendet, die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies in den Zellen zu bestimmen. Die Methode beruht darauf, dass die Acetatgruppe nach der Aufnahme in die Zellen durch intrazelluläre Esterase hydrolysiert wird und dadurch das nicht fluoreszierende Dichlorodihydrofluorescein entsteht. Diese Verbindung wird dann durch verschiedene reaktive Sauerstoffspezies (ROS) zum fluoreszierenden, aber nicht stabilen Dichlorofluorescein (DCF) oxidiert. [JAKUBOWSKI und BARTOSZ 2000]

Verwendete Lösungen:

2',7'-Dichlorodihydrofluorescein-diazetat (DCF-DA) Stammlösung:

103 mM DCF-DA in DMSO

Reagenz: 9,7 µl 103 mM DCF-DA/ 10 ml Medium

DMEM, 20 mM HEPES, pH 7,4

DMEM, 20 mM HEPES, pH 7,4, 10 % FCS

Für den Versuch wurden HepG2 Zellen in einer 96-Well-Platte (SPL Tissue Culture Testplatte) bei einer Zelldichte von 100.000 Zellen/Well ca. 48 Stunden

kultiviert. Die Zellzahl wurde mit Hilfe des Zellzählers Microcellcounter CC-108 (Fa. Sysmex) gemessen. Dazu wurden in der Sterilbank 200 µl der zu untersuchenden Zellsuspension entnommen und in ein Zählgefäß pipettiert. Anschließend wurde die Suspension mit 9,8 ml isotoner Zählerflüssigkeit (Cellpack PK-30, Sysmex) auf ein Volumen von 10 ml ergänzt, gut vermischt und die Zellzahl im Microcellcounter CC-108 (Fa. Sysmex) bestimmt.

Für die Versuche wurden Verdünnungsreihen mit den Fe-Präparaten Venofer (Vifor), Ferinject (Vifor) und Eisenpyrophosphat (Fe-Konzentrationen der Präparate siehe Tabelle 5) vorbereitet, wobei die höchste Konzentration 330 µg Fe/ml betrug und die weiteren sechs Konzentrationen jeweils 1:1 Verdünnungen darstellten (siehe Tabelle 9 in Ergebnisse und Diskussion).

3.3.2.1. Messung von oxidativem Stress mittels DCF-Methode in Anwesenheit der Fe-Präparate in der Inkubationslösung

Die Zellen wurden mit 200 µl warmem DMEM-Nullmedium pro Well gewaschen und anschließend mit 100 µl 10 µM DCF-DA (37° C) pro Well 30 min. im Brutschrank inkubiert. Danach wurde zwei Mal mit 100 µl DMEM (ohne Methylrot) gewaschen. Jeweils drei Wells wurden mit 100 µl einer Konzentration des Fe-Präparats in DMEM (ohne Methylrot) +/- FCS (10 %) aus der Verdünnungsreihe versetzt. Es wurde sofort mit der Messung bei 485/20 nm (Ex/Em) bei 37°C im Anthos Zenyth 3100 begonnen. Das Programm war so eingestellt, dass 60 min. lang alle 15 min. die Fluoreszenz gemessen wurde. Anschließend wurde der Anstieg der Fluoreszenzintensität mit der Zeit ermittelt.

3.3.2.2. Messung von oxidativem Stress mittels DCF-Methode nach Vorinkubation der Zellen mit Fe-Präparaten

Die Zellen wurden mit 200 µl warmem DMEM-Nullmedium pro Well gewaschen. Danach wurden jeweils drei Wells mit 100 µl einer Konzentration des Fe-Präparats in DMEM (ohne Methylrot) mit oder ohne FCS (10 %) aus der Verdünnungsreihe inkubiert. Nach Inkubationszeiten von 1 h, 2,5 h sowie 4,5 h wurden die Zellen zuerst zwei Mal mit 200 µl/Well DMEM-Nullmedium gewaschen und mit 100µl DCF-DA pro Well im Brutschrank bei 37° C 30 min. lang

inkubiert. Anschließend wurde zwei Mal mit 100 µl warmem DMEM (ohne Methylrot) gewaschen. Für die Messung wurde 100 µl/Well DMEM + Hepes in die Wells pipettiert. Die Platten wurden ca. 5 min. in den Brutschrank gestellt, um sie auf 37°C zu temperieren. Anschließend wurde 60 min. lang alle 15 min. die Fluoreszenz bei 485/20 nm (Ex/Em), 37° C im Anthos Zenyth 3100 (HVD, Wien) gemessen. Aus den einzelnen Messungen wurde der Anstieg der Fluoreszenzintensität mit der Zeit ermittelt.

Die erhaltenen Daten wurden mit dem Programm GraphPad Prism® 5 der Firma GraphPad Software ausgewertet.

3.4. Statistik

Alle Versuche wurden mit dem Programm GraphPad Prism® 5 der Firma GraphPad Software statistisch ausgewertet. Um die statistische Signifikanz der Ergebnisse zu ermitteln, wurde ein zweiseitiger t-Test (gepaart oder ungepaart je nach Stichprobe) angewendet. In den Abbildungen wurden diese signifikanten Unterschiede mit * für $p < 0,05$, ** für $p < 0,01$ oder *** für $p < 0,001$ markiert.

Für die Überprüfung einer Korrelation wurden die Tests nach Pearson und Spearman angewendet.

4. Ergebnisse und Diskussion

4.1. Eisenstoffwechsel und oxidativer Stress

4.1.1. Etablierung eines Rattenmodells für Eisenmangelanämie

Die Ratte ist ein weit verbreitetes Modell, um Eisenmangel zu erforschen. Eisenmangelanämie tritt auf, wenn der Eisenmangel schwerwiegend genug ist, um die Erythropoese zu mindern und um somit die Entstehung einer Anämie auszulösen. [PSCHYREMBEL 259. Auflage] Unser Ziel war, ein Eisenmangel-Rattenmodell zu etablieren, um die pathophysiologischen Folgen eines Eisenmangels, sowie mögliche therapeutische Interventionen untersuchen zu können.

Pinero et al. (2000) untersuchten den Eisenstoffwechsel im Gehirn sehr junger Sprague-Dawley Ratten. Eine der Gruppen wurde bis zum 21. Tag nach der Geburt eisenarm ernährt. Anschließend wurde die Eisenkonzentration im Gehirn dieser FeMangel-Gruppe untersucht und festgestellt, dass diese um rund 20-25 % niedriger war als die der Kontrollgruppe. [PINERO et al. 2000]

Erikson et al. (1997) zeigten in einem ähnlichen Versuch mit 3 Wochen alten Sprague-Dawley Ratten, dass zwei Wochen eisenarmes Futter (3 mg Fe/kg), gemessen anhand der erniedrigten Blutparameter Hämoglobin und Hämatokrit ausreichen, um eine Anämie in den Tieren auszulösen. In weiterer Folge konnte auch gezeigt werden, dass weitere zwei Wochen in denen Futter mit adäquater Eisenmenge (35 mg Fe/kg) verabreicht wurde, ausreichten, um die Anämie erfolgreich zu behandeln. [ERIKSON et al. 1997]

Es stellt sich allerdings die Frage, ab wann von einem schweren Eisenmangel ausgegangen werden kann und ob es reicht, zur Bestimmung des Eisenstatus klinische Blutparameter wie Hämoglobin, Hämatokrit, Erythrozytenzahl und mittleres korpuskuläres Volumen (MCV) heranzuziehen, da eine Anämie auch von anderen Faktoren ausgelöst werden kann. Weiters kann zwischen absolutem und funktionellem Eisenmangel unterschieden werden, wobei ersteres eine Ent-

leerung der Speicher darstellt und letzteres auf eine unzureichende Mobilisierung der vorhandenen Eisenspeicher hinweist. [MUNOZ et al. 2009] Deshalb haben wir uns entschieden, Leberproben von Ratten, die für ein bis drei Wochen Kontrollfutter bzw. eisenarmes Futter erhielten, zu untersuchen. Die Leber wurde ausgewählt, da dieses Organ den wichtigsten Eisenspeicher darstellt und somit eine mögliche Eisenmangelanämie festgestellt werden kann.

4.1.1.1. Einfluss des Fütterungsversuchs auf den Eisenstatus

Zur Etablierung eines Rattenmodell für Eisenmangelanämie wurden 48 2-3 Wochen alte outbred Sprague-Dawley Ratten auf zwei Gruppen aufgeteilt: Eisenmangelgruppe und Kontrollgruppe. Erstere erhielten Fe-armes Futter mit einem Eisengehalt von unter 10 mg/kg Futter, Letztere wurden mit Kontrollfutter mit 180 mg Fe/kg Futter gefüttert (siehe Material und Methoden, Kapitel 3.1). Wasser und Futter standen beiden Gruppen über die gesamte Studie hinweg ad libitum zur Verfügung. Der Fütterungsversuch dauerte insgesamt drei Wochen, wobei jede Woche je 8 Ratten der Eisenmangel- bzw. Kontrollgruppe getötet wurden.

Zu Studienbeginn wurden die Ausgangswerte (Baseline) der klinischen Blutparameter Erythrozytenzahl (RBC), Hämoglobin (Hb), Hämatokrit (HCT) und mittleres korpuskuläres Volumen (MCV) sowie das Gewicht der einzelnen Tiere untersucht. Diese Daten wurden mir dankenswerterweise von Dr. Rayko Evstatiev zur Verfügung gestellt. In Tabelle 6 sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung der Gruppen angegeben.

	W1 K	W1 FeM	W2 K	W2 FeM	W3 K	W3 FeM
RBC [$\times 10^6/\mu\text{l}$]	5,91 $\pm 0,34$	5,83 $\pm 0,39$	5,65 $\pm 0,19$	5,71 $\pm 0,23$	5,70 $\pm 0,36$	5,77 $\pm 0,17$
Hb [g/dl]	11,9 $\pm 0,5$	11,7 $\pm 0,7$	11,8 $\pm 0,4$	11,8 $\pm 0,4$	11,6 $\pm 0,4$	11,7 $\pm 0,3$
HCT [%]	39,3 $\pm 1,8$	38,8 $\pm 2,3$	42,2 $\pm 8,8$	38,8 $\pm 1,1$	38,7 $\pm 1,4$	39,0 $\pm 1,2$
MCV [fl]	66,5 $\pm 1,3$	66,7 $\pm 1,3$	68,7 $\pm 1,8$	67,9 $\pm 1,7$	68,1 $\pm 2,1$	67,6 $\pm 1,4$
Gewicht [g]	99 ± 8	97 ± 22	95 ± 16	116 ± 13	112 ± 14	116 ± 11

Tabelle 6: Klinische Parameter der Tiere (Baseline) – Gezeigt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung der Gruppen (n = 8, außer W3 K: n = 7) vor Beginn des Fütterungsversuchs (Baseline). Daten zur Verfügung gestellt von Dr. Rayko Evstatiev. W = Woche, K = Kontrollgruppe; FeM = Eisenmangelgruppe, RBC = Erythrozyten, Hb = Hämoglobin, HCT = Hämatokrit, MCV = mittleres korpuskuläres Volumen.

Zur Baseline des Versuchs gab es keine signifikanten Unterschiede der klinischen Parameter zwischen den Gruppen. Das mittlere Körpergewicht der Tiere in der Kontrollgruppe unterschied sich jedoch signifikant ($p < 0,05$) von dem der Eisenmangelgruppe, die in Woche 2 getötet werden sollten.

Die klinischen Blutparameter und das Körpergewicht wurden auch vor der Tötung der Ratten untersucht. Somit konnte ein Vergleich der Ausgangswerte mit denen nach einer, zwei bzw. drei Wochen Verabreichung der beiden Futtermitteln der einzelnen Ratten gemacht werden. In Tabelle 7 ist die Zunahme bzw. Abnahme dieser Parameter in Prozent der Ausgangswerte für die jeweilige Gruppe zusammengefasst zu sehen (Baseline = 100 %).

	W1 K	W1 FeM	W2 K	W2 FeM	W3 K	W3 FeM
RBC [x10⁶/μl]	102,35 %	96,42 %	115,85 %	107,31 %	125,86 %	115,24 %
Hb [g/dl]	101,6 %	87,3 %	105,0 %	81,3 %	112,5 %	75,8 %
HCT [%]	99,6 %	86,0 %	102,8 %	86,9 %	117,7 %	81,6 %
MCV [fl]	97,7 %	89,2 %	96,3 %	80,8 %	93,3 %	70,9 %
Gewicht [g]	154 %	152 %	217 %	187 %	235 %	214 %

Tabelle 7: Zunahme bzw. Abnahme der klinischen Parameter der Tiere – Angaben in Prozent der Ausgangswerte (Baseline = 100 %) der jeweiligen Mittelwerte der Gruppen (n = 8, außer W3 K: n = 7). Daten zur Verfügung gestellt von Dr. Rayko Evstatiev. W = Woche, K = Kontrollgruppe; FeM = Eisenmangelgruppe, RBC = Erythrozyten, Hb = Hämoglobin, HCT = Hämatokrit, MCV = mittleres korpuskuläres Volumen.

Wie man aus Tabelle 7 gut erkennen kann, ist die Erythrozytenzahl (RBC) bei der Kontrollgruppe im Laufe der drei Wochen stärker angestiegen als die der Eisenmangelgruppe. Nach Woche 1 gab es bei den eisendefizienten Ratten sogar eine leichte, aber nicht signifikante Abnahme der roten Blutkörperchen. In den folgenden zwei Wochen ist die Zahl der RBC auch in der Eisenmangelgruppe gestiegen. Zur übersichtlicheren Darstellung soll Abbildung 3 dienen.

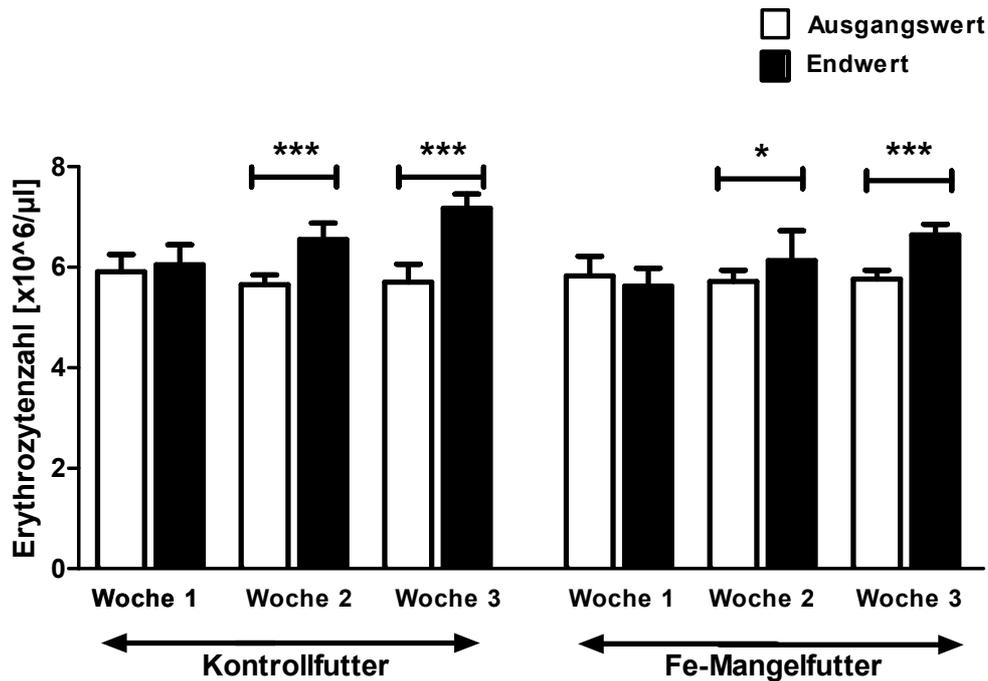


Abbildung 3: Einfluss des Fütterungsversuchs auf die Erythrozytenzahl (RBC) – Gezeigt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung der jeweiligen Gruppen nach unterschiedlicher Dauer des Fütterungsversuchs vor (weiß) sowie nach 1, 2 bzw. 3 Wochen (schwarz) Fütterung des Eisenmangel- bzw. Kontrollfutter ($n = 8$, außer W3 K: $n = 7$). Daten zur Verfügung gestellt von Dr. Rayko Evstatiev. Signifikante Unterschiede zwischen Ausgangswert und Endwert markiert mit *** $p < 0,001$ bzw. * $p < 0,05$.

Während die Hämoglobinwerte (Hb) der Kontrollgruppe keinen signifikanten Unterschied zeigten und erst in Woche 3 signifikant anstiegen ($p < 0,05$), war in der Eisenmangelgruppe schon nach einer Woche eine deutliche Abnahme ($p < 0,01$) im Vergleich zu den Ausgangswerten zu beobachten. Nach 14 sowie nach 21 Tagen war die Abnahme der Hb-Konzentration hoch signifikant ($p < 0,001$) im Vergleich zur jeweiligen Baseline (Abbildung 4).

Die Ratten, die in dieser Studie verwendet wurden, waren 2-3 Wochen alt und befanden sich noch im Wachstum, weshalb die Hämoglobinwerte normalerweise ansteigen sollten. Eine Anämie ist durch eine ungewöhnlich niedrige Hämoglobinkonzentration in den roten Blutzellen charakterisiert. [DIAZ-CASTRO 2008] Aufgrund des Eisenmangels ist die Biosynthese von Häm verzögert. Da die gemessenen Hb-Werte bei den Tieren in der Eisenmangelgruppe dieser

Studie signifikant abgesunken sind, könnte schon anhand der Hb-Messung von einer Eisenmangelanämie ausgegangen werden.

Die Erythropoese funktioniert nur korrekt, wenn sowohl genug Erythropoietin, als auch ausreichend Eisen vorhanden sind. Da es sich bei den in dieser Studie verwendeten Ratten um gesunde Tiere handelt, kann davon ausgegangen werden, dass die Tiere keinen Erythropoietin-Mangel haben und die signifikante Abnahme des Hb bereits nach einer Woche Fütterung mit Fe-armem Futter durch einen Eisenmangel ausgelöst wurde.

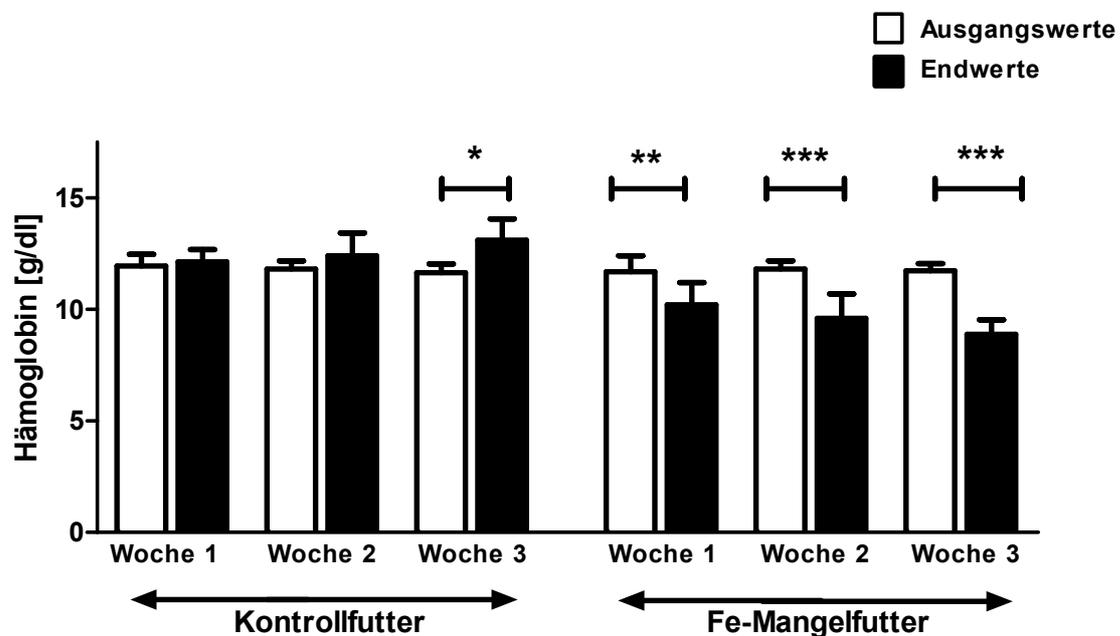


Abbildung 4: Einfluss des Fütterungsversuchs auf die Hämoglobinwerte – Gezeigt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung der jeweiligen Gruppen nach unterschiedlicher Dauer des Fütterungsversuchs vor (weiß) sowie nach 1, 2 bzw. 3 Wochen (schwarz) Fütterung des Eisenmangel- bzw. Kontrollfutter (n = 8, außer W3 K: n = 7). Daten zur Verfügung gestellt von Dr. Rayko Evstatiev. Signifikante Unterschiede zwischen Ausgangswert und Endwert markiert mit *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ bzw. * $p < 0,05$.

Der Hämatokrit (HCT) blieb in der Kontrollgruppe zwei Wochen lang auf dem selben Niveau (Abbildung 5). Erst nach 21 Tagen stieg der HCT signifikant ($p < 0,001$) im Vergleich zur Baseline an. In der Eisenmangelgruppe konnte schon nach der ersten Woche eine signifikante Abnahme ($p < 0,001$) des HCT-Werts nach dem Fütterungsversuch verglichen mit dem Ausgangswert verzeichnet werden. Die Abnahme auf 86,9 % hielt sich auch in Woche 2 ($p = 0,0022$) und sank in Woche 3 sogar auf 81,6 % ($p < 0,001$) des Ausgangswertes ab.

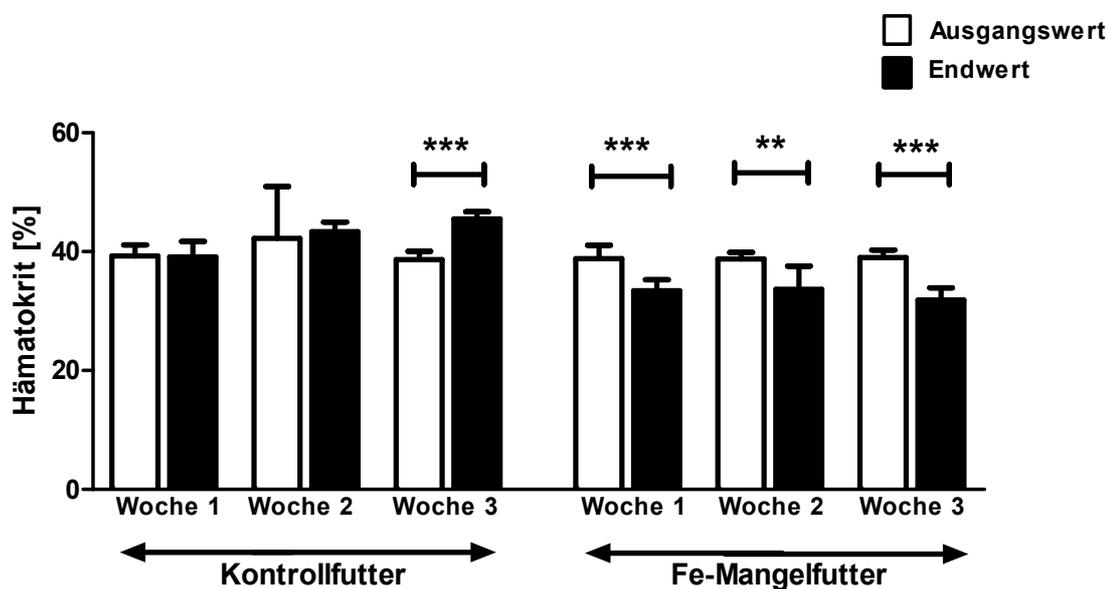


Abbildung 5: Einfluss des Fütterungsversuchs auf die Hämatokritwerte – Gezeigt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung der jeweiligen Gruppen nach unterschiedlicher Dauer des Fütterungsversuchs vor (weiß) sowie nach 1, 2 bzw. 3 Wochen (schwarz) Fütterung des Eisenmangel- bzw. Kontrollfutters ($n = 8$, außer W3 K: $n = 7$). Daten zur Verfügung gestellt von Dr. Rayko Evstatiev. Signifikante Unterschiede zwischen Ausgangswert und Endwert markiert mit *** $p < 0,001$ bzw. ** $p < 0,01$.

Das „mean corpuscular volume“ (MCV) der Erythrozyten nahm bei beiden Gruppen kontinuierlich ab, wobei bei den Eisenmangelratten mit 93 % des Ausgangswertes vs. 71 % nach drei Wochen ein stärkerer Abfall auftrat, was in Abbildung 6 deutlich zu sehen ist. Bei beiden Fütterungsgruppen war die Abnahme in Woche drei stark signifikant (beide $p < 0,0001$). In der Kontrollgruppe wird der Unterschied zwischen den Ausgangswerten und den Werten nach dem Fütterungsversuch erst nach 14 Tagen signifikant ($p < 0,01$), wobei der Abfall des MCV in der Eisenmangelgruppe in allen drei Wochen mit $p < 0,0001$ stark signifikant ist.

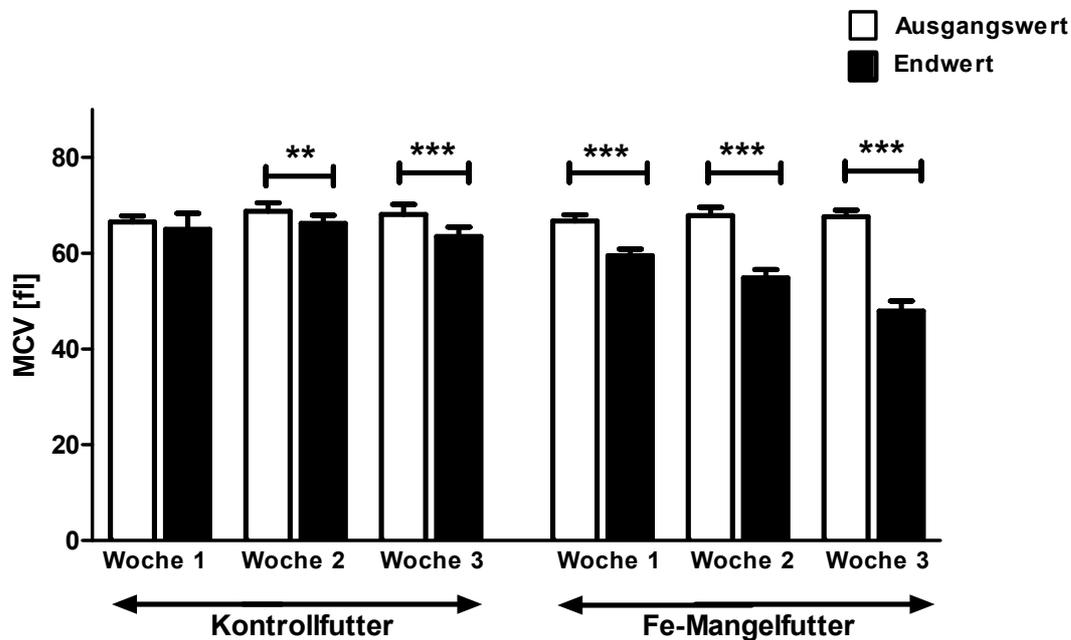


Abbildung 6: Einfluss des Fütterungsversuchs auf das mittlere korpuskulären Volumen (MCV) – Gezeigt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung der jeweiligen Gruppen nach unterschiedlicher Dauer des Fütterungsversuchs vor (weiß) sowie nach 1, 2 bzw. 3 Wochen (schwarz) Fütterung des Eisenmangel- bzw. Kontrollfutter ($n = 8$, außer W3 K: $n = 7$). Daten zur Verfügung gestellt von Dr. Rayko Evstatiev. Signifikante Unterschiede zwischen Ausgangswert und Endwert markiert mit *** $p < 0,001$ bzw. ** $p < 0,01$.

Der Vergleich des Körpergewichts der Ratten der Eisenmangelgruppe mit der Kontrollgruppe der jeweiligen Woche zeigt, dass ab zwei Wochen Fütterung mit Fe-armem Futter die Gewichtszunahme verringert ist, verglichen mit Tieren, die Futter mit normalem Fe-Gehalt während des Beobachtungszeitraums erhielten. Während die Kontrollratten nach zwei Wochen 117 % ihres Ausgangsgewichts zugenommen haben, waren es bei den Eisenmangelratten nur 87 %. Dieser Unterschied der relativen Gewichtszunahme der beiden Gruppen ist, wie in Abbildung 7 dargestellt, signifikant ($p=0,004$). Nach 3-wöchigem Fütterungsversuch ist der Unterschied mit 135 % Gewichtszunahme in der Kontrollgruppe gegenüber 114 % in der Eisenmangelgruppe geringer und nicht signifikant. Vergleicht man allerdings die absolute Zunahme des Körpergewichts der Kontrollgruppe der jeweiligen Woche des Fütterungsversuchs mit der absoluten Zunahme der Eisenmangelgruppe, kann kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen festgestellt werden.

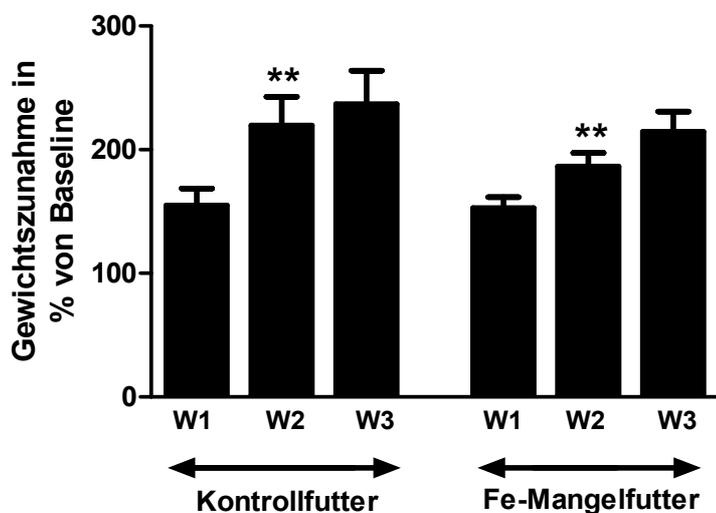


Abbildung 7: Vergleich der relativen Gewichtszunahme während dem Fütterungsversuch – Gezeigt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung in Prozent der Ausgangswerte (Baseline) der jeweiligen Gruppen ($n = 8$, außer W2 FeM und W3 K: $n = 7$) nach unterschiedlicher Dauer des Fütterungsversuchs. Daten zur Verfügung gestellt von Dr. Rayko Evstatiev. W = Woche. Signifikanter Unterschied der relativen Gewichtszunahme in Woche 2 zwischen Kontrollfutter und Fe-Mangelfutter ** $p=0,004$.

Um sicher von einer Eisenmangelanämie der Ratten ausgehen zu können, wurde der Eisengehalt der Leber mit der Ferrozin Methode nach Fish (1988) gemessen (siehe Material und Methoden, Kapitel 3.1.3.). Die Ergebnisse sind in Abbildung 8 gezeigt.

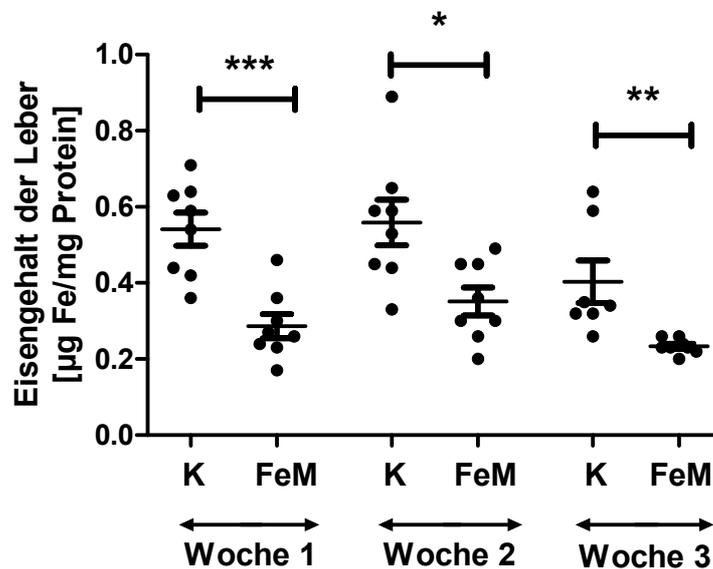


Abbildung 8: Einfluss des Fütterungsversuchs auf den Eisengehalt der Leber – Gezeigt sind die einzelnen Messpunkte sowie die Mittelwerte \pm Standardabweichung in μg Eisen pro mg Protein der Gruppen ($n = 8$, außer W3 K: $n = 7$) nach unterschiedlicher Dauer des Fütterungsversuchs gemessen mit der Ferrozin Methode (siehe Material und Methoden). K = Kontrollgruppe, FeM = Eisenmangelgruppe. Signifikante Unterschiede zwischen Kontroll- und Eisenmangelgruppe gleicher Fütterungsdauer sind markiert mit *** $p=0,0003$, ** $p=0,0069$ bzw. * $p=0,0102$.

Der Eisengehalt der Leber nach dem Fütterungsversuch der Eisenmangelratten unterschied sich signifikant in jeder Woche von jenem der Ratten, die über den gleichen Zeitraum Kontrollfutter erhielten. Interessanterweise war der Unterschied des Lebereisengehalts schon nach einer Woche mit einem p-Wert von 0,0003 hoch signifikant. Der Unterschied war geringer, aber dennoch signifikant mit $p=0,0102$ nach Woche 2 und wurde wieder hoch signifikant mit $p=0,0069$ nach 3 Wochen Fütterungsversuch.

Da nach Tötung der Ratten keine Perfusion mit PBS oder ähnlichem durchgeführt wurde, musste davon ausgegangen werden, dass die Ergebnisse der Eisenmessung mit der Ferrozin-Methode durch Eisen aus Hämoglobin des zurückgebliebenen Blutes beeinflusst werden könnte. Dies wurde überprüft indem

bei einer Standardhämoglobinlösung, wie zuvor bei den Rattenleberproben, der Eisengehalt bestimmt wurde (Daten nicht gezeigt). Bei diesem Versuch wurde festgestellt, dass durch die Inkubation der Probe mit Kaliumpermanganat Hämoglobin abgebaut und das Eisen freigesetzt wird, wodurch das Eisen bei der Ferrozin-Messung mitgemessen wird. Aus diesem Grund wurde bei allen Rattenleberproben zusätzlich der Hämoglobingehalt mit der DAF-Methode nach Kaiho und Mizuno (1985) bestimmt (siehe Material und Methoden, Kapitel 3.1.4.). Anschließend wurde davon ausgegangen, dass pro Mol Hämoglobin 4 Mol Eisenatome enthalten sind. Auf diese Weise wurde über die Messung der Hb-Konzentration der Hämoglobineisengehalt berechnet und vom Gesamteisengehalt (der mit der Ferrozin-Methode gemessen wurde) abgezogen. Abbildung 9 zeigt den Eisengehalt der Rattenleberproben korrigiert um das aus Hämoglobin stammende Eisen.

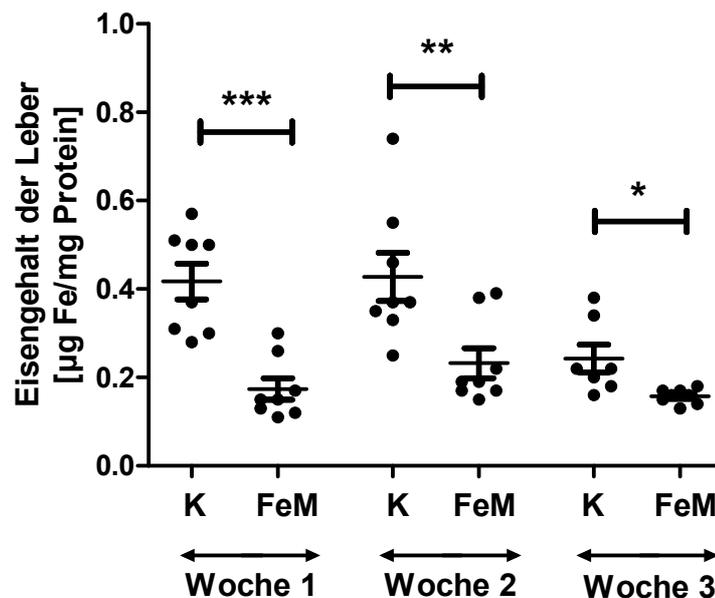


Abbildung 9: Einfluss des Fütterungsversuchs auf den Eisengehalt der Leber ohne Hämoglobin-Eisen – Gezeigt ist der Eisengehalt der einzelnen Rattenlebern sowie die Mittelwerte \pm Standardabweichung in μg Eisen pro mg Protein der Gruppen ($n = 8$, außer W3 K: $n = 7$) nach unterschiedlicher Dauer des Fütterungsversuchs. Eisengehalt gemessen mit der Ferrozin Methode abzüglich Eisengehalt des Hämoglobins gemessen mit 2,7-Diaminofluoreszin (siehe Material und Methoden). K = Kontrollgruppe, FeM = Eisenmangelgruppe. Signifikante Unterschiede zwischen Kontroll- und Eisenmangelgruppe gleicher Fütterungsdauer sind markiert mit *** $p=0,0001$, ** $p=0,009$ bzw. * $p=0,0140$.

Auch nach Abzug des Hämeisens vom Gesamteisen der Lebern blieben die Unterschiede zwischen den Gruppen signifikant.

Es ist bemerkenswert, dass bereits nach einwöchiger Fütterung mit Fe-armem Futter die Ratten sich höchst signifikant ($p=0,0001$) von den Ratten die mit Kontrollfutter gefüttert wurden unterscheiden, da die Ausgangswerte der einzelnen Tiere, wie in Tabelle 6 gezeigt, vergleichbar waren. Der Eisengehalt der eisen-defizienten Rattenleber hielt sich auch nach zwei Wochen auf demselben Niveau und sank nach der dritten Woche leicht, aber signifikant ($p<0,05$) ab.

Die Kontrollgruppe hatte zwar im Vergleich zu den Eisenmangelratten immer einen signifikant höheren Eisengehalt, allerdings nahm der durchschnittliche Fe-Wert der Gruppe von Woche 2 auf 3 des Fütterungsversuchs auch signifikant ($p=0,0147$) ab. Zur besseren optischen Darstellung soll Abbildung 10 dienen.

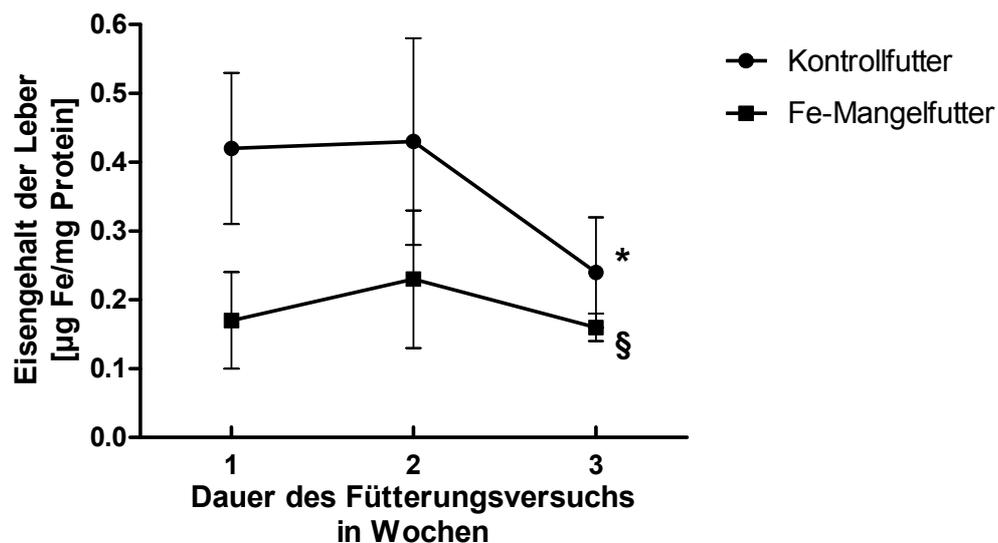


Abbildung 10: Eisengehalt der Leber im zeitlichen Verlauf - Gezeigt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung in μg Eisen pro mg Protein der Gruppen ($n = 8$, außer W3 K: $n = 7$) nach unterschiedlicher Dauer des Fütterungsversuchs. Messwerte der Ferrozin Methode abzüglich Eisengehalt des Hämoglobins gemessen mit 2,7-Diaminofluoreszin (siehe Material und Methoden). Signifikante Abnahmen: * zwischen Woche 2 und 3 der Kontrollgruppe $p=0,0147$; § zwischen Woche 2 und 3 der Eisenmangelgruppe $p=0,0477$; Anstieg W1 auf W2 nicht signifikant.

Ein plausibler Grund für die Abnahme des Eisengehalts der Leber der Kontrollgruppe könnte der Eisengehalt des Kontrollfutters sein. Standard Rattenfutter C1000 der Firma Altromin enthält rund 180 mg/kg Eisen. Dieser Eisengehalt ist

möglicherweise während der starken Wachstumsphase, in der sich die 2-3 Wochen alten Ratten während dem Fütterungsversuch befunden haben, zu gering, um den hohen Eisenbedarf dieser Altersgruppe zu decken.

4.1.2. Oxidativer Status bei Eisenmangelanämie

Ob Eisenmangel oxidativen Stress verursacht, wird kontrovers diskutiert. [DIAZ-CASTRO 2008] Erhöhter oxidativer Stress wurde in Zusammenhang mit Eisen meist nur bei Eisenüberladung untersucht. Knutson et al. (2000) konnten an jungen Sprague-Dawley Ratten zeigen, dass sowohl Eisenmangel, als auch eine Behandlung mit täglichen Eisensupplementen zu erhöhter Lipidperoxidation führt. Die tägliche Eisengabe führte zur krankhaften Eisenakkumulation, wobei beide Effekte durch eine intermittierende Supplementation abgeschwächt werden konnten. [KNUTSON et al. 2000]

Eine Studie von Yoo et al. (2009) an weiblichen Eisenmangelanämiepatientinnen zeigte eine signifikant höhere oxidative Aktivität dieser verglichen mit den Kontrollpersonen, während die Gesamtantioxidantienkapazität sowie die Katalaseaktivität signifikant geringer waren. Nach einer Behandlung mit oralem Eisen über 4 bzw. 6 Monate waren die Parameter für reaktive Sauerstoffverbindungen niedriger als vor der Therapie. [YOO et al. 2009]

Die Leber spielt eine fundamentale Rolle im Stoffwechsel sowie in Bezug auf Toxizität bzw. Elimination endogener und exogener Stoffe. Die hepatischen antioxidativen Enzyme sind sehr wichtig für den Schutz der Gewebe vor freien Radikalen. Deshalb ist es von großem Interesse den Einfluss der Eisenmangelanämie auf die metabolische Kapazität der Leber zu bestimmen. [DIAZ-CASTRO 2008]

Um herauszufinden, ob die Eisenmangelratten im Gegensatz zur Kontrollgruppe erhöhten oxidativen Stress haben, wurde der Peroxidgehalt der Rattenleberproben bestimmt. Hydroperoxide sind reaktive Sauerstoffmoleküle (ROS) die mit oxidativem Stress assoziiert werden. [BANERJEE et al. 2003] Die Messung der Peroxide wurde mit zwei Varianten des FOX Assays durchgeführt. Zum einen mit der klassischen Methode nach Nourooz-Zadeh et al. (1994) bei der Xylenolorange in Methanol gelöst ist und lipidlösliche Peroxide gemessen werden. Diese Methode wird in dieser Arbeit FOX Assay genannt. Zum anderen wurden

wasserlösliche Hydroperoxide bestimmt. In dieser Variante wird Sorbitol zugesetzt, welches durch Peroxide selbst zum Radikal wird und so zur Sensitivitätserhöhung der Methode beiträgt. In weiterer Folge wird diese Methode als Peroxid Assay bezeichnet.

4.1.2.1. Einfluss des Fütterungsversuchs auf den Gehalt an Lipidperoxiden in der Leber (Bestimmung mit FOX Assay)

Der FOX Assay basiert auf der Oxidation von Fe^{2+} , das im Reagenz enthalten ist, zu Fe^{3+} durch Oxidationsmittel in der Probe. Durch Bindung von Fe^{3+} an Xylenolorange entsteht dann ein Farbkomplex, der photometrisch gemessen werden kann. [NOUROOZ-ZADEH et al. 1994]

Methanol wird als Medium benutzt um die lipidlöslichen Peroxide zu messen. Das Reagenz enthält außerdem Butylhydroxytoluol, das als kettenbrechendes Antioxidans fungiert. [SÖDERGREN et al. 1998] Da die Bildung des Fe^{3+} -Xylenolorange-Komplexes pH-abhängig ist, wird dem Reagenz auch H_2SO_4 zugesetzt. [BANJEREE et al. 2003]

Die Methode wurde aufgrund ihrer einfachen, aber sensitiven Möglichkeit gewählt, oxidativen Stress zu bestimmen. Außerdem zeichnet sie sich dadurch aus, dass die Messung geringe Kosten verursacht. [SÖDERGREN et al. 1998]

Die Ergebnisse der Peroxidmessung in den Leberproben mittels FOX Assay sind in Abbildung 11 dargestellt.

Interessanterweise haben die Lebern der Kontrollgruppen einen höheren Gehalt an Lipidperoxiden, wobei nur der Unterschied zwischen der Kontrolle und den eisendefizienten Ratten nach 2 Wochen Fütterungsversuch mit $p=0,0017$ signifikant ist.

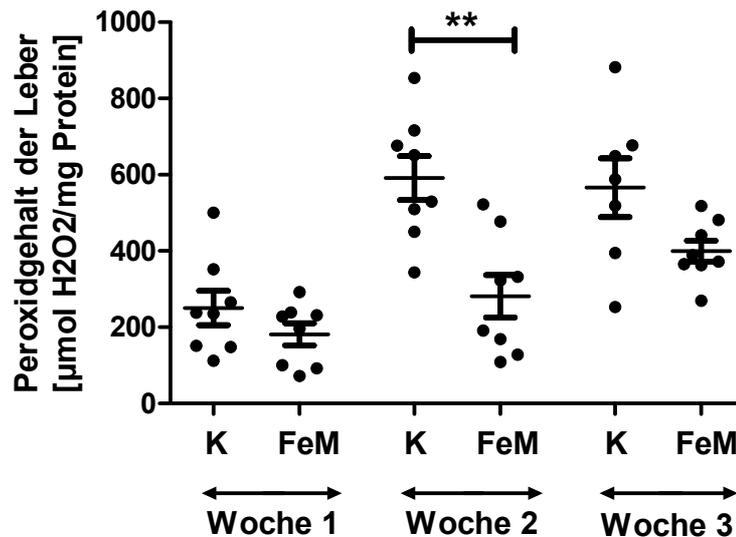


Abbildung 11: Einfluss des Fütterungsversuchs auf den Peroxidgehalt der Leber (Fox Assay) – Gezeigt ist der Peroxidgehalt der einzelnen Leberproben sowie die Mittelwerte \pm Standardabweichung in $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ pro mg Protein der Gruppen ($n = 8$, außer W3 K: $n = 7$) nach unterschiedlicher Dauer des Fütterungsversuchs gemessen mit dem FOX Assay (siehe Material und Methoden). K = Kontrollgruppe, FeM = Eisenmangelgruppe. Signifikante Unterschiede zwischen Kontroll- und Eisenmangelgruppe nach 2 Wochen Fütterungsversuch markiert mit ** $p=0,0017$.

In Abbildung 12 ist der Anstieg der Peroxide in den Leberproben der Kontrollgruppe nach einwöchiger bzw. zweiwöchiger Fütterung noch besser zu erkennen. Diese mittlere Zunahme der Lipidperoxide ist mit $p=0,0004$ hoch signifikant und bleibt auch in Woche 3 auf ungefähr demselben Niveau von $570 \pm 200 \mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{mg Protein}$ (Mittelwert \pm Standardabweichung, $n = 8$). Der Peroxidgehalt der Eisenmangelratten steigt mit längerer Fütterungsdauer des Fe-armen Futters auch kontinuierlich an, wobei dieser Anstieg aber nicht signifikant war.

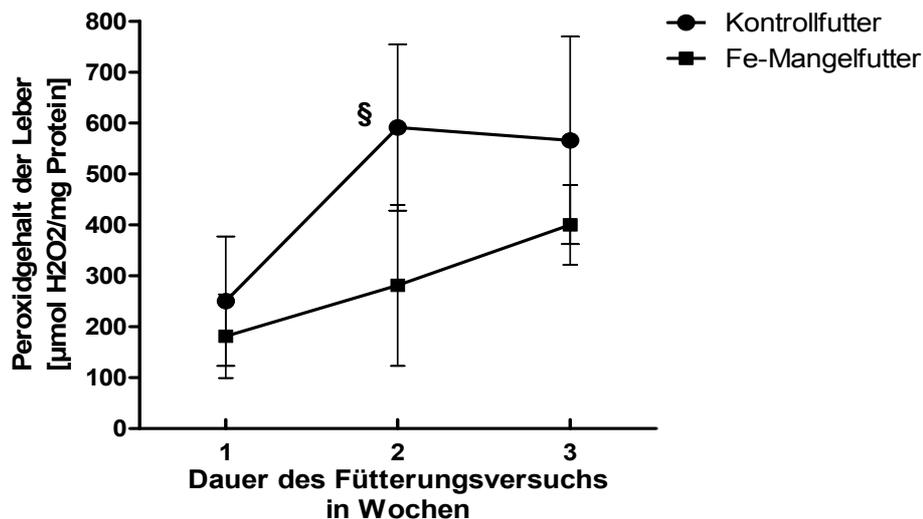


Abbildung 12: Einfluss der Dauer des Fütterungsversuchs auf den Peroxidgehalt (FOX Assay) - Gezeigt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung in $\mu\text{Mol H}_2\text{O}_2$ pro mg Protein der Gruppen ($n = 8$, außer W3 K: $n = 7$) nach unterschiedlicher Dauer des Fütterungsversuchs gemessen mit dem FOX Assay (siehe Material und Methoden). § signifikanter Anstieg zwischen Woche 1 und 2 der Kontrollgruppe $p=0,0004$.

4.1.2.2. Abschätzung des Einflusses von endogenem Eisen auf die Peroxidmessung mittels FOX Assay und TCEP

Bei Plasmaproben, die geringe Peroxidlevel aufweisen, wird empfohlen, dass der FOX Assay mit Hilfe von Triphenylphosphin (TPP) verfeinert wird, da endogenes Eisen die Methode beeinflussen kann. TPP reduziert selektiv Hydroperoxide in ihre entsprechenden Alkohole. Durch Vergleichen der Messung mit und ohne TPP kann pro Probenansatz festgestellt werden, welches Signal von den Hydroperoxiden stammt. [NOUROOZ-ZADEH et al. 1994]

In Kontrollexperimenten wurde eine Lösung von 10 mM TPP in Methanol in unterschiedlichen Konzentrationen mit Rattenleberproben im FOX Assay ausgetestet. Als Kontrolle wurde immer die entsprechende Menge Methanol verwendet. Der Versuch mit TPP lieferte jedoch nicht die erwarteten Ergebnisse. Aus diesem Grund wurde der FOX Assay mit Tris(2-Carboxyethyl)phosphin (TCEP) zum Reduzieren der Peroxide verwendet. Diese Substanz wird im kommerziell erhältlichen Peroxidtest PeroXOquant™ von Pierce verwendet. In den Vorversuchen wurde eine Lösung von 10 mM TCEP in Methanol verwendet, um unterschiedliche Konzentrationen an TCEP in den Versuchsansätzen zu erhalten. Für die Kontrolle wurden äquivalente Mengen reines Methanol verwendet.

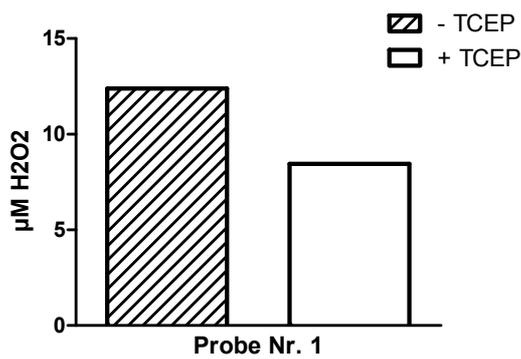


Abbildung 13: Signal des FOX Assay mit bzw. ohne TCEP – am Beispiel der Rattenleberprobe Nr. 1. Der gestreifte Balken repräsentiert die unbehandelte Probe (mit Methanol inkubiert). Der weiße Balken zeigt den Wert der Probe, die mit TCEP inkubiert wurde. Anschließende Messung des H₂O₂ mittels FOX Assay (siehe Material und Methoden).

Mit TCEP ergab sich der erwartete Unterschied zwischen dem Ansatz mit TCEP und dem Kontrollansatz ohne TCEP, wie in Abbildung 13 am Beispiel von Probe Nr. 1 gezeigt. Anhand dieser Ergebnisse wurde für die Abschätzung des Einflusses von endogenem Eisen auf die Peroxidmessung mittels FOX Assay in weiterer Folge TCEP anstatt TPP verwendet.

In Abbildung 14 ist der Peroxidgehalt in µMol H₂O₂/mg Protein dargestellt, der nach Abzug des Messwertes aus der Inkubation mit TCEP vom unbehandelten Probenansatz übrig blieb.

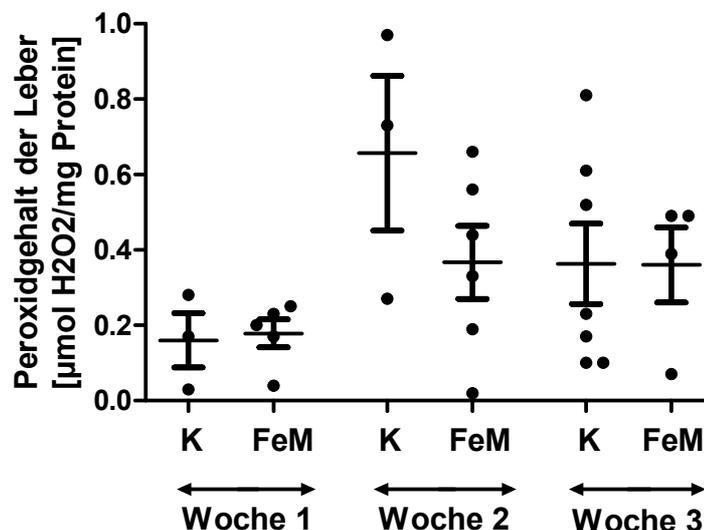


Abbildung 14: Einfluss des Fütterungsversuchs auf den Peroxidgehalt der Leber korrigiert um die Farbkomplexbildung durch endogenes Eisen (FOX Assay +/- TCEP) – Gezeigt ist der Peroxidgehalt der einzelnen Leberproben sowie die Mittelwerte \pm Standardabweichung in µmol H₂O₂ pro mg Protein der Gruppen (Woche 1: $n_K=3$, $n_{FeM}=5$; Woche 2: $n_K=3$, $n_{FeM}=6$; Woche 3: $n_K=7$, $n_{FeM}=4$) nach unterschiedlicher Dauer des Fütterungsversuchs. Proben wurden mit bzw. ohne TCEP inkubiert und der Peroxidgehalt mittels FOX Assay bestimmt (siehe Material und Methoden). K = Kontrollgruppe, FeM = Eisenmangelgruppe. Keine signifikanten Unterschiede zwischen Kontroll- und Eisenmangelgruppe sowie innerhalb der Gruppe zwischen den Wochen.

Bei den korrigierten Lipidperoxidwerten konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt werden. Dies kann aber auch daran liegen, dass aufgrund technischer Probleme nicht alle Proben überprüft werden konnten und es zu großen Abweichungen in der Probenanzahl bei den einzelnen Gruppen gekommen ist.

4.1.2.3. Einfluss des Fütterungsversuchs auf den Gehalt an wasserlöslichen Peroxiden in der Leber (Bestimmung mit Peroxid Assay)

Zusätzlich zur in Kapitel 4.1.2.2. beschriebenen Messung von Lipidperoxiden wurden in weiterer Folge auch die wasserlöslichen Peroxide in den Rattenleberproben aus dem Fütterungsversuch gemessen. Zur Bestimmung der wasserlöslichen Peroxidmenge wurde der Peroxid Assay verwendet (siehe Material und Methoden, Kapitel 3.1.5.3). Dieser basiert wie auch der FOX Assay auf der Bildung des Farbkomplexes aus Xylenolorange und durch Peroxide oxidiertes Eisen. In dieser Variante wird allerdings statt in einer Methanol-hältigen Lösung in einer wässrigen Lösung gearbeitet, wodurch nur die wasserlöslichen Peroxide gemessen werden.

Ein weiterer großer Unterschied ist, dass der Peroxid Assay durch den Zusatz von Sorbitol zum Reagenz charakterisiert ist, welches selbst mit Peroxiden zum Radikal wird und in weiterer Folge das Fe^{2+} im Reagenz zu Fe^{3+} oxidiert. Dadurch wird die Sensitivität dieses Assays erhöht. Im Gegensatz dazu wandeln die Peroxide im FOX Assay Fe^{2+} direkt zu Fe^{3+} um. [PIERCE 2010]

Wenn man die Ergebnisse (siehe Abbildung 15) der wasserlöslichen Peroxide in den Lebern der Eisenmangel- mit jenen der Kontrollgruppe miteinander vergleicht, kann zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

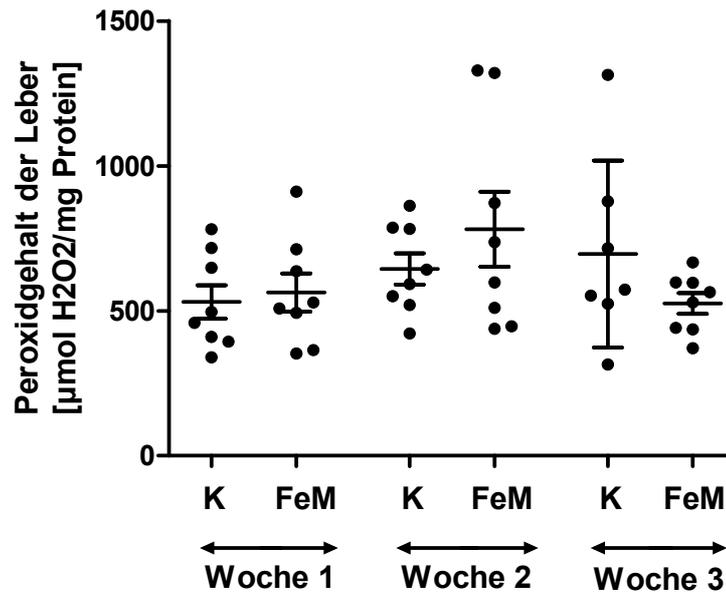


Abbildung 15: Einfluss des Fütterungsversuchs auf den Peroxidgehalt der Leber (Peroxid Assay) – Gezeigt ist der Peroxidgehalt der einzelnen Rattenlebern sowie die Mittelwerte \pm Standardabweichung in $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ pro mg Protein der Gruppen ($n = 8$, außer W3 K: $n = 7$) nach unterschiedlicher Dauer des Fütterungsversuchs gemessen mit dem Peroxid Assay (siehe Material und Methoden). K = Kontrollgruppe, FeM = Eisenmangelgruppe. Keine signifikanten Unterschiede zwischen Kontroll- und Eisenmangelgruppe sowie innerhalb der Gruppe zwischen den Wochen.

Nach einwöchigem Fütterungsversuch hatten die Kontrollratten $530 \pm 160 \mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{mg Protein}$ (Mittelwert \pm Standardabweichung, $n=8$), die Eisenmangelratten $560 \pm 190 \mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{mg Protein}$ (Mittelwert \pm Standardabweichung, $n=8$). Der Peroxidgehalt der Leber stieg zwar nach 14-tägigem Fütterungsversuch um 110 (Kontrollfutter) bzw. 220 $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{mg Protein}$ (Fe-armes Futter), der Unterschied ist allerdings nicht signifikant. Nach 3 Wochen blieb der Mittelwert der wasserlöslichen Peroxide in der Leber der Kontrollgruppe auf nahezu demselben Niveau, der Peroxidgehalt der Eisenmangelgruppe sank allerdings auf $530 \pm 100 \mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{mg Protein}$ (Mittelwert \pm Standardabweichung, $n=8$).

Auffällig ist auch, dass vor allem die Kontrolle in der letzten Woche eine hohe Streuung aufwies.

4.1.2.4. Abschätzung des Einflusses von endogenem Eisen auf die Peroxidmessung mittels Peroxid Assay und Kontrollreagenz

Auch beim Peroxid Assay wurde überprüft, in welchem Ausmaß endogenes Eisen die Peroxidmessung beeinflusst. Da in den Rattenleberproben vermutlich ebenfalls dreiwertiges Eisen vorliegt und dieses, anstatt dem im Reagenz enthaltenen Fe^{2+} und durch Peroxide gebildeten Fe^{3+} , mit Xylenolorange den violetten Farbkomplex bilden kann. Deshalb wurde untersucht, ob und in welchem Ausmaß endogenes Eisen die Peroxidmessung beeinflusst. Jede Probe wurde simultan sowohl mit normalem Reagenz, das neben Xylenolorange und Sorbitol auch Ammoniumeisensulfat (FAS) enthielt, als auch mit einem Kontrollreagenz, das nur Xylenolorange und Sorbitol, jedoch kein FAS enthielt, gemessen (siehe Material und Methoden, Kapitel 3.1.5.4.). Dadurch kann abgeschätzt werden, welcher Anteil des gemessenen Signal durch in der Probe vorhandenes Fe^{3+} ausgelöst wurde. Dieser Anteil wurde vom Ergebnis mit dem normalen Reagenz abgezogen.

Es ergibt sich auch nach Korrektur der wasserlöslichen Peroxidwerte, wie in Abbildung 16 zu sehen, ein ähnliches Bild: nach zweiwöchigem Fütterungsversuch konnte ein Anstieg des Leberperoxidgehalts beider Gruppen und eine anschließende Abnahme der wasserlöslichen Peroxide festgestellt werden, wobei diese Abnahme bei den Fe-arm ernährten Ratten stärker ist. Die unkorrigierten Peroxidwerte lagen gesamt zwischen 315 und 1329 $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{mg Protein}$ und schwankten danach zwischen 130 und 739 $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{mg Protein}$ (Min- bzw. Max-Wert, $n = 47$). Wie schon vor der Überprüfung der Messung des Peroxidgehalts mittels Peroxid Assay, konnten auch bei den korrigierten Ergebnissen der Messung der wasserlöslichen Peroxide keine signifikanten Unterschiede zwischen der Eisenmangel- und der Kontrollgruppe gezeigt werden.

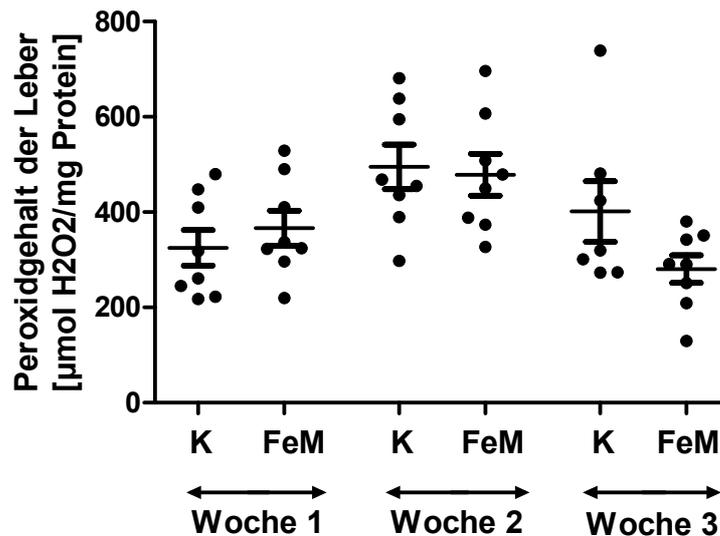


Abbildung 16: Einfluss des Fütterungsversuchs auf den Peroxidgehalt der Leber korrigiert um die Farbkomplexbildung durch endogenes Eisen (Überprüfung des Peroxid Assay) – Gezeigt ist der Peroxidgehalt der einzelnen Rattenlebern sowie die Mittelwerte \pm Standardabweichung in $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ pro mg Protein der Gruppen ($n = 8$, außer W3 K: $n = 7$) nach unterschiedlicher Dauer des Fütterungsversuchs. Die Messung erfolgte durch eine Modifizierung des Peroxid Assays um den endogenen Eisengehalt auszuschließen (siehe Material und Methoden). K = Kontrollgruppe, FeM = Eisenmangelgruppe. Keine signifikanten Unterschiede zwischen Kontroll- und Eisenmangelgruppe.

Im zeitlichen Verlauf der korrigierten wasserlöslichen Peroxide, der in Abbildung 17 zu sehen ist, war der Anstieg des Peroxidgehalts der Lebern der Kontrollgruppe von Woche 1 auf 2 mit $p=0,0130$ signifikant. Bei den Eisenmangelratten ist zwar auch ein Anstieg der wasserlöslichen Peroxide in diesem Zeitraum zu sehen, dieser ist allerdings nicht signifikant. Im Gegensatz dazu war die Abnahme des Leberperoxidgehalts beider Gruppen in der letzten Woche bei den Fe-arm gefütterten Ratten signifikant ($p=0,0021$), die Abnahme der wasserlöslichen Peroxide der Kontrollgruppe ist dagegen nicht signifikant.

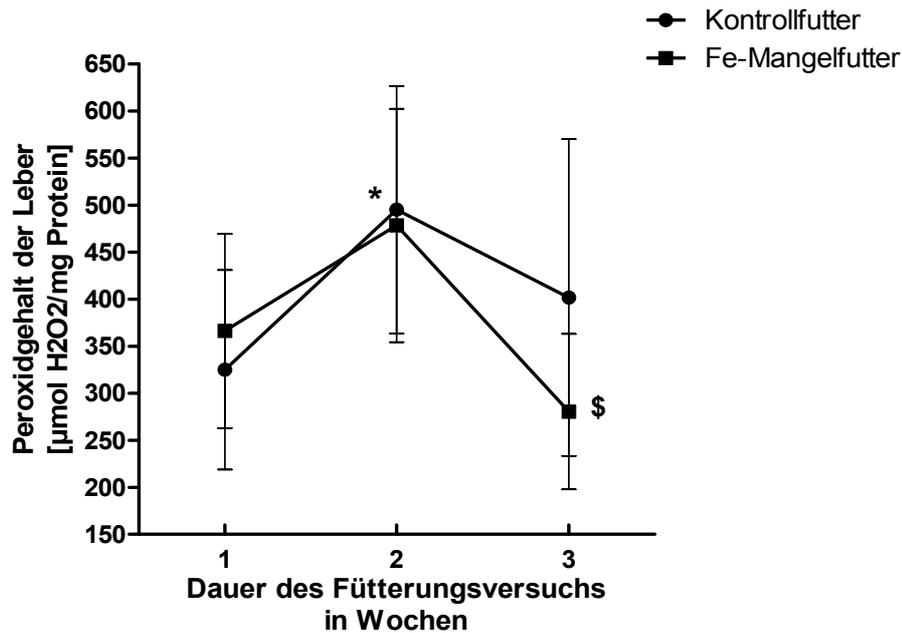


Abbildung 17: Einfluss des Fütterungsversuchs auf den Peroxidgehalt der Leber korrigiert um die Peroxidbildung durch endogenes Eisen im zeitlichen Verlauf (Überprüfung des Peroxid Assay) - Gezeigt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung in $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ pro mg Protein der Gruppen ($n = 8$, außer W3 K: $n = 7$) nach unterschiedlicher Dauer des Fütterungsversuchs gemessen mit dem Peroxid Assay, Reagenz mit vs. ohne Ammoniumeisensulfat (siehe Material und Methoden). * Anstieg zwischen Woche 1 und 2 der Kontrollgruppe, $p=0,0130$; \$ signifikante Abnahme zwischen 2 und 3 der Eisenmangelgruppe, $p=0,0021$.

4.1.2.5. Korrelation des Eisengehalts mit dem Peroxidgehalt der Lebern

Um herauszufinden, ob es einen Zusammenhang zwischen dem Eisengehalt der Rattenlebern mit ihrem entsprechenden Peroxidgehalt gibt, wurde die Korrelation sowohl nach Pearson, als auch nach Spearman statistisch überprüft.

Yoo et al. (2009) fanden in ihrer Studie an Patientinnen mit Eisenmangelanämie eine schwache negative Korrelation der Eisenkonzentration im Serum und der oxidativen Aktivität, was allerdings statistisch nicht signifikant war. [YOO et al. 2009] In einer weiteren Humanstudie mit rund 2500 gesunden Probanden konnte eine signifikante negative Korrelation von 8-Hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) im Harn, als Biomarker für oxidative DNA-Schäden, und der Eisenbindungskapazität festgestellt werden, während die Korrelation von 8-OHdG und Serumeisen nicht signifikant war. [NAKANO et al. 2003]

Die lipidlöslichen Peroxide der Rattenlebern aus unserem Fütterungsversuch korrelieren nach Pearson sowie nach Spearman weder vor, noch nach der Überprüfung mit TCEP mit der Eisenmenge in der Leber (korrigierte Werte abzüglich Fe aus Hämoglobin).

	Gesamt	FeMangelgruppe	Kontrollgruppe
Pearson	r = 0,3234 (p = 0,0266)	r = 0,4401 (p = 0,0314)	r = 0,1952 nicht signifikant
Spearman	r = 0,4503 (p = 0,0015)	r = 0,6645 (p = 0,0004)	r = 0,2016 nicht signifikant

Tabelle 8: Korrelation zwischen Leber-Fe und wasserlöslichem Peroxidgehalt - mg Fe/l (korrigiert um Häm-Eisen) vs. $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{l}$ Protein (Peroxide aus korrigiertem Peroxid Assay); n = Gesamt=47, FeMangelgruppe=24, Kontrollgruppe=23.

Vor der Korrektur der Werte der wasserlöslichen Peroxide um das endogene Eisen der Rattenlebern konnte keine signifikante Korrelation zwischen Peroxiden und Lebereisen festgestellt werden. Interessanterweise ändert sich dies bei Verwendung der korrigierten wasserlöslichen Peroxidwerte. Es ergibt sich eine signifikante positive Korrelation der Eisenwerte aller Tiere (n = 47) mit den entsprechenden wasserlöslichen Peroxidwerten der Lebern sowohl nach Pearson, als auch nach Spearman (siehe Tabelle 8). Testet man nur die Peroxidergebnisse der Eisenmangelgruppe mit den entsprechenden Fe-Werten, findet man eine noch stärkere positive Korrelation. Die Fe-Werte der Kontrollgruppe korrelieren nicht signifikant mit den gemessenen wasserlöslichen Peroxiden der Lebern.

Da die Tiere bis auf den Eisenmangel gesund waren, weist diese Korrelation darauf hin, dass der Gehalt an Peroxiden vom Eisenstatus in der Leber beeinflusst wird.

4.1.3. Fazit Eisenstoffwechsel und oxidativer Stress

Bei diesem Fütterungsversuch konnte sehr gut gezeigt werden, dass Eisenmangel in jungen Ratten durch Verabreichung eines Futters, das wenig Eisen enthält, möglich ist. Es ist überraschend, dass eine einwöchige Fütterung mit Fe-armem Futter ausreichend ist, um den Eisenmangel auszulösen. Sowohl anhand der Veränderung der klinischen Blutparameter, als auch anhand des signifikant reduzierten Lebereisengehalts der Eisenmangelgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe konnte der Eisenmangel gezeigt werden. Diese Ergebnisse wurden mit 2-3 Wochen alten Sprague-Dawley Ratten erhalten, die, wie man an der Abnahme des Lebereisengehalts der Kontrollgruppe sehen kann, wahrscheinlich durch ihr starkes Wachstum bedingt sehr viel Eisen benötigen. Das rasche Auftreten eines Eisenmangels könnte aber auch am hohen Stoffwechsel von Nagetieren liegen. Pinero et al. (2000) haben mit ihrem ca. 30 Tage alten Rattenmodell herausgefunden, dass 2 Wochen Eisenübersättigung ausreicht, um einen zuvor ausgelösten Eisenmangel, gemessen an Parametern im Gehirn, wieder zu korrigieren. [PINERO et al. 2000] Eine hohe Stoffwechselrate zeichnet die Ratte somit als Versuchstier aus. Aufgrund unserer Ergebnisse dieser Studie kann darauf geschlossen werden, dass das in dieser Studie verwendete Rattenmodell herangezogen werden kann, um pathophysiologische Folgen eines Eisenmangels und mögliche therapeutische Interventionen zu untersuchen.

Wie weit der Eisenstatus die Bildung von ROS beeinflusst, wurde im zweiten Teil dieses Fütterungsversuchs untersucht. Wir gingen davon aus, dass die Eisenmangelgruppe, wie in der Humanstudie von Yoo et al. (2009), eine höhere oxidative Aktivität verglichen mit der Kontrollgruppe zeigen wird. Diese Hypothese konnte nicht bestätigt werden, da weder erhöhte wasserlösliche Peroxide, noch erhöhte lipidlösliche Peroxide in der Leber der Fe-arm gefütterten Ratten im Vergleich zu den Kontrollratten gemessen wurden. Mit dem FOX Assay, mit dem die lipidlöslichen Peroxide gemessen wurden, konnten bei den Lebern der Kontrollgruppe immer höhere Peroxidmengen im Vergleich zur Eisenmangelgruppe gemessen werden, was nach zweiwöchigem Fütterungsversuch sogar signifikant war.

In einer ähnlichen Studie von Diaz-Castro et al (2008) an 20 männlichen Wistar Albino Ratten konnte wie in unserer Studie auch kein signifikanter Unterschied an oxidativem Stress in der Leber der Eisenmangelratten gegenüber den Kontrollratten festgestellt werden. Dabei wurde als Marker für oxidativen Stress die Bildung von Thiobarbituric Acid Reactive Substances (TBARS) gemessen.

Außerdem haben Diaz-Castro et al. (2008) die Enzymaktivität des Antioxidans Glutathionperoxidase (GSH-Px) in der Leber der beiden Gruppen verglichen, wobei auch hier kein Unterschied zwischen den Eisenmangel- und den Kontrollratten festgestellt werden konnte. Im Gegensatz zu unseren Versuchstieren war bei Diaz-Castro et al. (2008) der Grad der Eisenmangelanämie nach 40 Tagen schwerwiegend genug, um die Gewichtszunahme der Ratten erheblich zu beeinträchtigen und somit das Endgewicht im Vergleich zur Kontrollgruppe zu reduzieren. Dies war bei unseren Sprague-Dawley Ratten nach 21 Tagen nicht der Fall. Einzig die relative Gewichtszunahme der Eisenmangelgruppe nach zweiwöchigem Fütterungsversuch unterschied sich signifikant von der Kontrollgruppe.

Da die TBARS-Produktion im Lebercytosol der Eisenmangel- und Kontrollgruppe sich nicht unterschieden, schlossen Diaz-Castro et al., dass die hepatische antioxidative Kapazität der Ratten normal war und wahrscheinlich auf adäquate Aktivitäten der antioxidativen Enzyme (GSH-Px, Catalase und Glutathionreduktase) zurückzuführen ist. Dies könnte auch auf die oxidative Balance der Tiere in unserem Fütterungsversuch zutreffen.

Diaz-Castro et al. (2008) gehen sogar so weit, daraus zu schließen, dass der adäquate antioxidative Status zusammen mit einem geringen Gehalt an verfügbarem Eisen zu einem protektiven Effekt in den Tieren führt, wobei verhindert wird, dass Fe-katalysierte Sauerstoffradikale über die Fenton und Haber-Weiss Reaktion entstehen, die in weiterer Folge zur Lipidperoxidation führen würden. [DIAZ-CASTRO et al. 2008] Ein protektiver Effekt, ausgelöst durch den Eisenmangel, würde auch unsere Ergebnisse der Lipidperoxidmessung der Rattenlebern erklären, da der Peroxidgehalt der Lebern der Kontrollgruppe höher war als jener der Eisenmangelratten, was allerdings nur nach zweiwöchigem Fütterungsversuch signifikant war.

Eisenmangel verursacht Veränderungen im zellulären Fe-Homöostasesystem. Nahrungseisen bewirkt einen Anstieg in der Aktivität des „Iron Responsive Element Binding Protein-1“ der Leber, das die Synthese des Transferrin-Rezeptors erhöht und die cytosolische Aconitaseaktivität unterdrückt. [CHEN et al. 1997] Die Verminderung der Aconitaseaktivität verhindert eventuell eine weitere mitochondriale Freisetzung von Oxidantien über eine verringerte Bereitstellung von reduzierenden Äquivalenten für die Elektronentransportkette. Dieser verminderte Elektronenfluss könnte ein Weg sein, über den sich die Zelle bei Eisenmangel vor oxidativem Stress selbst schützt. [DIAZ-CASTRO et al. 2008]

Unsere Ergebnisse zeigen außerdem eine signifikante positive Korrelation des Lebereisens und dem Gehalt an wasserlöslichen Peroxiden der Eisenmangelgruppe. Da die Tiere bis auf den Eisenmangel gesund waren, weist die signifikante Korrelation darauf hin, dass der Gehalt an Peroxiden vom Eisenstatus in der Leber beeinflusst wird.

4.2. Parenterale Eisengaben

Die Notwendigkeit von Eisen in der Synthese von Erythrozyten steht außer Frage. Da die Anämie bei Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz (ESRD) mit rekombinantem humanem Erythropoietin behandelt wird, ist klar, dass, um das Therapieziel zu erreichen, auch eine ausreichende Menge an Eisen zur Verfügung stehen muss, um die Erythrozytenzahl zu erhöhen. Bei ESRD-Patienten setzt man auf eine intravenöse Eisengabe, um dies zu gewährleisten.

Allerdings bleibt parenterales Eisen heiß umstritten, es ist sogar von einem zweischneidigen Schwert die Rede. Die Bedenken gelten potentiellen kurzzeitigen Effekten, wie anaphylaktischen Reaktionen und Reaktionen auf „freies“ Eisen. Langzeit-Bedenken beinhalten die Möglichkeit einer erhöhten Infektionsanfälligkeit, von oxidativem Stress und kardiovaskulären Erkrankungen durch einen höheren Eisenstatus. Das heißt, dass intravenöse Eisengaben einerseits die Therapie mit rhuEPO optimieren, aber andererseits die Patienten einem erhöhten Risiko an anderen Komplikationen aussetzen – ein zweischneidiges Schwert! [CAVILL 2003]

Ein anderes Problem in Verbindung mit dem Gebrauch von kolloidalen Eisenkomplexen ist ihre schwer einschätzbare Bioverfügbarkeit. Nach der parenteralen Verabreichung werden die kolloidalen Eisenkomplexe idealerweise vom Retikuloendothelialsystem aufgenommen und metabolisiert. Im Zuge dieses Prozesses wird der Eisen-Kohlenhydrat-Komplex gespalten und das Eisen in den Blutkreislauf freigesetzt, um von dort aus gebunden an Transferrin zu den Zielgeweben transportiert zu werden. Nur ca. 50 % des Eisens, das durch diese kolloidalen Komplexe verabreicht wird, ist verfügbar und wird für die Hämoglobinbildung verwendet. Wohin die restlichen 50 % des verabreichten Eisens gehen, ist unklar. Möglicherweise ist die andere Hälfte in den Zellen abgelagert und nicht mehr bioverfügbar. Dieses Eisen könnte theoretisch auch oxidativen Stress verursachen. [GUPTA und CRUMBLISS 2000]

Die Tatsache, dass die verschiedenen Eisenpräparate, die für eine parenterale Verabreichung zur Verfügung stehen, sehr unterschiedlich sind, macht einen Vergleich sehr schwierig. Die gängigen Medikamente unterscheiden sich stark

in wichtigen pharmakologischen Parametern wie Halbwertszeit, Molekulargewicht und Verabreichungsmenge. Daher ist es offensichtlich, dass auch die Effekte in vivo unterschiedlich sind, wobei jedes Präparat Vor- und Nachteile hat. [AGARWAL 2004]

Zu welchem Grad Eisen für Transferrin zur Verfügung gestellt wird, hängt stark von der Art der Eisenverbindung ab. Wenn das Eisenpräparat nicht in der Lage ist, das Eisen effizient für Transferrin zur Verfügung zu stellen, besteht die Gefahr, dass das Eisen oder der ganze Komplex unspezifisch an verschiedene Plasmaproteine wie Albumin binden. Bei einem idealen Eisenpräparat sollte daher jede Freisetzung von freiem unkomplexiertem Eisen in den Blutkreislauf gering und klinisch unbedeutend sein. Außerdem sollte der im Eisenpräparat enthaltene Ligand nicht bedeutsam mit anderen Metallionen der Körperflüssigkeiten (wie Calcium, Magnesium, Zink und Kupfer) Komplexe bilden. [GUPTA und CRUMBLISS 2000] Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde die Verfügbarkeit des Eisen für Transferrin im Plasma von verschiedenen Eisenpräparaten untersucht. Für die Untersuchung wurden zwei klinisch verwendete parenterale Eisenpräparate Ferinject (Eisencarboxymaltose, FeCM) und Venofer (Eisensaccharat, FeS) sowie Eisenpyrophosphat (FePP) und Eisenammoniumcitrat (FAC) miteinander verglichen. Weiters wurde die Bildung von oxidativem Stress in HepG2 Zellen durch die Präparate FeCM, FeS und FePP untersucht.

4.2.1. Bindung von Eisen aus parenteralen Eisenpräparaten an Transferrin in humanem Serum

Transferrin kann maximal zwei Eisenatome pro Molekül binden. Es kann daher in drei Formen vorliegen: als Apotransferrin, das kein Eisen gebunden hat, als monoferrisches Transferrin, das ein Eisenatom gebunden hat und bei dem, je nachdem welche der beiden Bindungsstellen besetzt ist, zwei Arten unterschieden werden und schließlich als Holotransferrin, welches zwei Eisenatome gebunden hat. Bei normalem Eisenstatus ist das Transferrin im Plasma zu etwa einem Drittel gesättigt. Im Plasma findet man daher alle drei Formen des Transferrins. [CRICHTON et al. 2008] Die Eisenbindungskapazität in gesunden Erwachsenen liegt im Bereich von 45-80 μM , was gewährleistet, dass selbst große Dosen an Eisen, die in den Blutkreislauf gelangen, ausreichend gebunden werden. [BREUER 2000]

Normalerweise liegt die Plasmaeisenkonzentration weit unter der Transferrinbindungskapazität. Die intestinale Eisenaufnahme wird streng reguliert und somit tritt nicht-Transferrin gebundenes Eisen (NTBI) im Plasma wahrscheinlich nur bei einer Störung der Eisenhomöostase auf. NTBI beinhaltet alle Formen von Eisen im Plasma, die an andere Liganden als Transferrin gebunden sind. Durch die Bindung an Transferrin ist Eisen effektiv abgeschirmt, um Redox-Reaktionen und Bildung von ROS zu verhindern. [BREUER et al. 2000] Weitere negative Effekte des NTBI beinhalten eine mögliche Eisenüberladung der Zellen, da die Aufnahme in die Gewebe im Gegensatz zu Transferrineisen nicht durch das streng geregelte Transferrinrezeptorsystem vermittelt wird sowie ein erhöhtes Risiko für eine Bakterieninfektion [KLAUSNER et al. 1993; THIELEMANS et al. 1989].

Eine mögliche Ursache der unterschiedlichen Toxizität der Eisenpräparate könnte die unterschiedliche Fähigkeit dieser sein, Eisen für Transferrin zur Verfügung zu stellen. Dies wird in vivo von vielen Faktoren beeinflusst, wie zum Beispiel der Halbwertszeit des Präparats, der Verteilung im Körper, der Transferrinkonzentration im Plasma, dem Anteil der Transferrinsättigung und dem pH. [AGARWAL 2004] Ferinject hat mit rund 16 Stunden die längste Plasmahalbwertszeit der verwendeten Präparate. Während Venofer eine Halbwertszeit von 6 Stunden hat, beträgt diese bei Fe-Pyrophosphat wahrscheinlich nur Minuten.

[CRICHTON et al. 2008; GUPTA und CRUMBLISS 2000] Die höchste molekulare Masse hat wiederum Ferinject mit >100 kDa [CRICHTON et al. 2008] gefolgt von Venofer mit bis zu 60 kDa. [AGARWAL 2004] Fe-Pyrophosphat unterscheidet sich mit einem Molekulargewicht von rund 750 Da wieder stark von den anderen beiden Präparaten. [GUPTA et al. 1999] Ebenso sind in der jeweiligen Verabreichungsdosis und -art der Präparate Unterschiede zu verzeichnen.

Durch eine direkte Visualisierung der Transferrinsättigung durch die Auftrennung der unterschiedlich mit Eisen beladenen Formen des Transferrin sollten die Eigenschaften der einzelnen Eisenpräparate veranschaulicht werden, Eisen an Transferrin abzugeben. Die oben erwähnten Unterschiede in Halbwertszeit, Molekulargewicht und Verabreichungsdosis machen einen direkten Vergleich der Präparate schwierig. Wir haben uns dafür entschieden, alle Präparate unter den gleichen Versuchsbedingungen zu testen. Dazu wurde humanes Serum mit den Eisenpräparaten in den in Tabelle 9 ersichtlichen Fe-Konzentrationen 5 Stunden inkubiert. Nach der Methode von Makey und Seal (1976) (siehe Material und Methoden, Kapitel 3.2) wurden anschließend alle Proteine bis auf beta- und gamma-Globuline mit Acridin ausgefällt und das im Überstand enthaltene Transferrin mittels Harnstoffgelelektrophorese aufgetrennt.

	mg Fe/l	mmol Fe/l
K1	330,00	5,89
K2	165,00	2,95
K3	82,50	1,47
K4	41,25	0,74
K5	20,63	0,37
K6	10,30	0,18
K7	5,15	0,09
K0	0,00	0,00

Tabelle 9: Konzentrationen in mg Fe/l und mmol Fe/l der eingesetzten Eisenpräparate für die Harnstoffelektrophorese und Messung von oxidativem Stress mit DCF.

4.2.1.1. Ergebnisse der Harnstoffelektrophorese

Die Abbildungen 18-21 zeigen das unterschiedliche Potential der vier untersuchten Eisenpräparate, Eisen an Transferrin abzugeben. Die gefärbten Gele wurden weiters semiquantitativ mittels Densitometrie ausgewertet (dargestellt in Abbildung 22).

Mit Ferinject ist auch nach einer 5-stündigen Inkubation des Serums mit den Konzentrationen K7-5, nämlich 5,15 – 20,63 mg Fe/l Serum (siehe Tabelle 9), die Bande für Apotransferrin noch deutlich sichtbar. Es steht bei diesen Konzentrationen also noch Transferrin bereit, um freies Eisen in unschädlicher Form zu binden. Allerdings werden pro Infusion bis zu 1000 mg Eisen verabreicht, was bei drei Liter Plasma zu einer Fe-Konzentration von etwa 330 mg/l führt. Die Densitometrie-Auswertung (siehe Abbildung 22) des Elektrophoresegeles ergab, dass bei den höchsten verwendeten Konzentrationen (330 – 82,5 mg Fe/l) nach 5 Stunden Inkubation rund 76 % des gesamten Transferrins als Holotransferrin vorliegt.

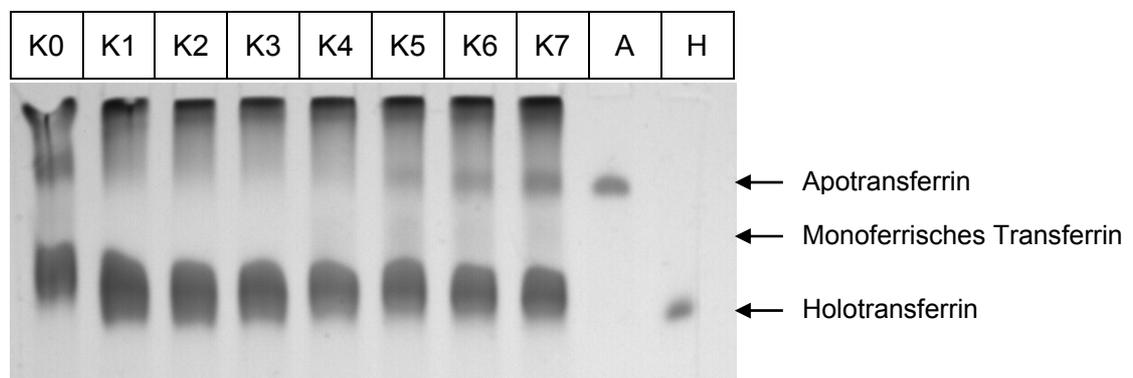


Abbildung 18: Harnstoffelektrophoresegele Ferinject – Humanes Serum wurde 5 h bei 37° C mit den aus Tabelle 9 ersichtlichen Konzentrationen Eisen mit Ferinject inkubiert. Anschließende Fällung mit Acridin und Auftrennung des Gesamttransferrins in seine 3 Beladungsformen (Apo-, Monoferrisches und Holotransferrin) mittels Harnstoffgelelektrophorese (siehe Material und Methoden). In den beiden rechten Bahnen, beschriftet mit A für Apotransferrin und H für Holotransferrin, wurden die entsprechenden Standardlösungen als Referenzsubstanzen aufgetragen.

Auch beim Eisenpräparat Venofer nach Inkubation des Serums für 5 h bei 37° C ist bei den niedrigen Fe-Konzentrationen noch Apotransferrin auf dem Elektrophoresegel sichtbar. Mit Venofer ist Apotransferrin sogar bis zur Fe-Konzentration K4 (41,25 mg Fe/l) noch deutlich erkennbar. Die densitometrische Auswertung (siehe Abbildung 22) des Gels ergab ähnliche Werte wie die Kontrolle bei dieser Fe-Konzentration und zeigt auch, dass erst bei einer Konzentration von 82,5 mg Fe/l ein Anstieg des Holotransferrin zu sehen ist. Bei der höchsten Fe-Konzentration liegt, ähnlich wie bei Ferinject, rund 75 % des Gesamttransferrin als Holotransferrin, rund 10 % als monoferrisches Transferrin und ca. 16 % als Apotransferrin vor.

Um eine Übersättigung des Transferrin zu vermeiden, werden für jedes Präparat maximale Einzeldosen empfohlen. Diese liegt vom Hersteller (Vifor) im Fall von Venofer bei 100 mg Fe pro Verabreichung. Als maximale Einzeldosis wird in der Packungsbeilage 200 mg angegeben. Das heißt die Eisenkonzentration im Plasma kann nach Verabreichung von 100 mg bei etwa 33 mg/l, bzw. bei einer Gabe von 200 mg bei 67 mg/l liegen, was in unserem Versuch in den Bereich zwischen den Fe-Konzentrationen K5 und K4 bzw. K4 und K3 fällt. Der große Unterschied der beiden Präparate Venofer und Ferinject in der klinischen Anwendung liegt allerdings darin, dass die maximale Einzeldosis pro Infusion bei Venofer um das 10fache geringer ist als die Eisendosis pro Ferinject-Infusion.

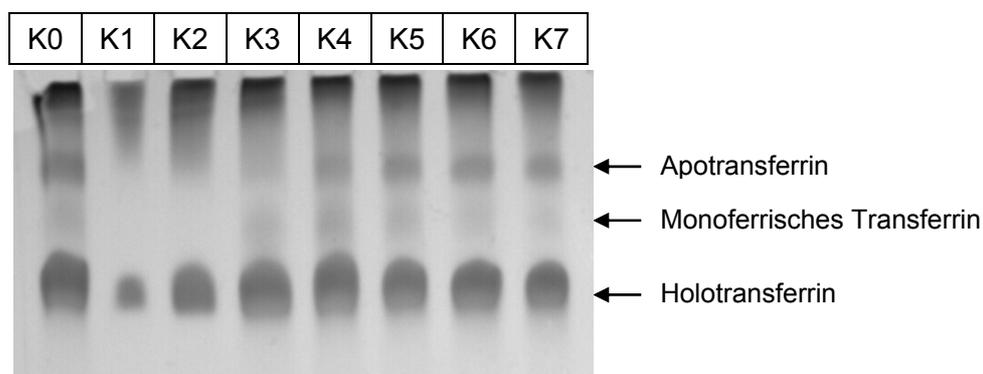


Abbildung 19: Harnstoffelektrophoresegel Venofer – Humanes Serum wurde 5 h bei 37° C mit den aus Tabelle 9 ersichtlichen Konzentrationen Eisen mit Venofer inkubiert. Anschließende Fällung mit Acridin und Auftrennung des Gesamttransferrins in seine 3 Beladungsformen (Apo-, Monoferrisches und Holotransferrin) mittels Harnstoffgelelektrophorese (siehe Material und Methoden).

Nach 5 Stunden Inkubation von humanem Serum mit Fe-Pyrophosphat bei 37° C ist selbst bei der niedrigsten verwendeten Fe-Konzentration keine deutliche Apotransferrin-Bande mehr sichtbar. Das Eisen aus Pyrophosphat ist anscheinend so leicht verfügbar, dass schon bei einer Konzentration von rund 5 mg Fe/l Transferrin vollständig gesättigt ist. Auch die Densitometrie-Auswertung, zu sehen in Abbildung 22, zeigt bei allen verwendeten Konzentrationen einen prozentuellen Holotransferrin-Anteil von rund 80 % des Gesamttransferrins.

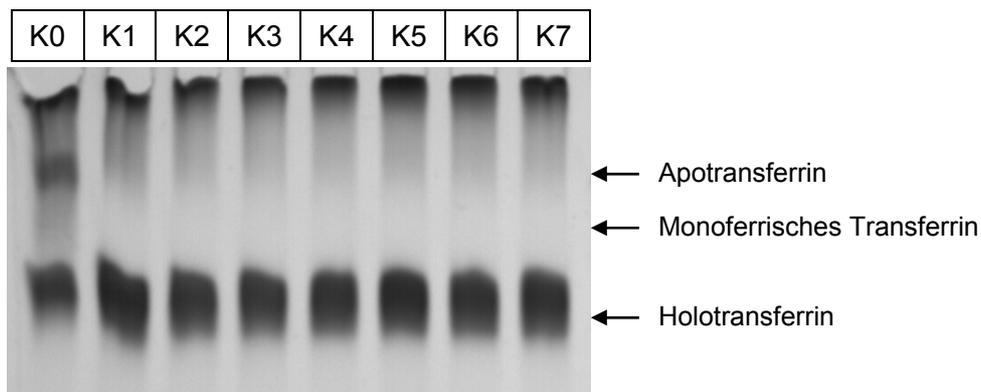


Abbildung 20: Harnstoffelektrophoresegelel Fe-Pyrophosphat – Humanes Serum wurde 5 h bei 37° C mit den aus Tabelle 9 ersichtlichen Konzentrationen Eisen mit Fe-Pyrophosphat inkubiert. Anschließende Fällung mit Acridin und Auftrennung des Gesamttransferrins in seine 3 Beladungsformen (Apo-, Monoferrisches und Holotransferrin) mittels Harnstoffgelelektrophorese (siehe Material und Methoden).

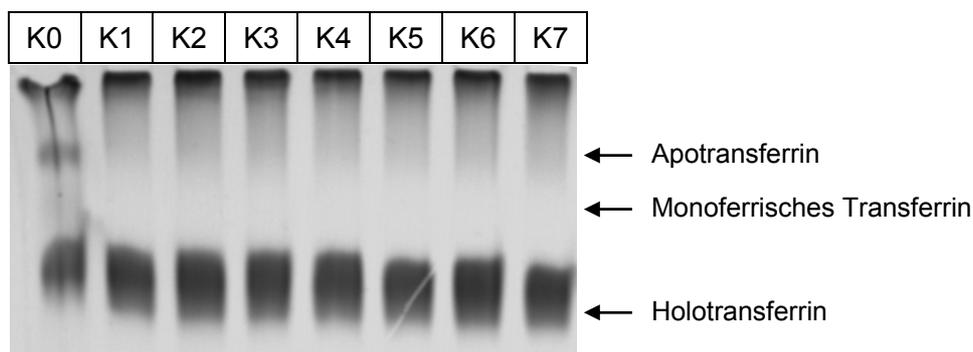


Abbildung 21: Harnstoffelektrophoresegelel Eisen(III)ammoniumcitrat (FAC) – Humanes Serum wurde 5 h bei 37° C mit den aus Tabelle 9 ersichtlichen Konzentrationen Eisen mit FAC inkubiert. Anschließende Fällung mit Acridin und Auftrennung des Gesamttransferrins in seine 3 Beladungsformen (Apo-, Monoferrisches und Holotransferrin) mittels Harnstoffgelelektrophorese (siehe Material und Methoden).

Zum Vergleich wurde das humane Serum auch mit Eisen(III)ammoniumcitrat (FAC) beladen, welches niedermolekulares, gut lösliches Eisen darstellt. Das Gel ist in Abbildung 21 gezeigt. Wie erwartet konnte nach 5 Stunden Inkubation des Serums bei 37° C mit unterschiedlichen Konzentrationen an FAC (siehe Tabelle 9) immer eine vollständige Transferrinsättigung erreicht werden, wie man auch durch die densitometrische Auswertung erkennen kann (siehe Abbildung 22).

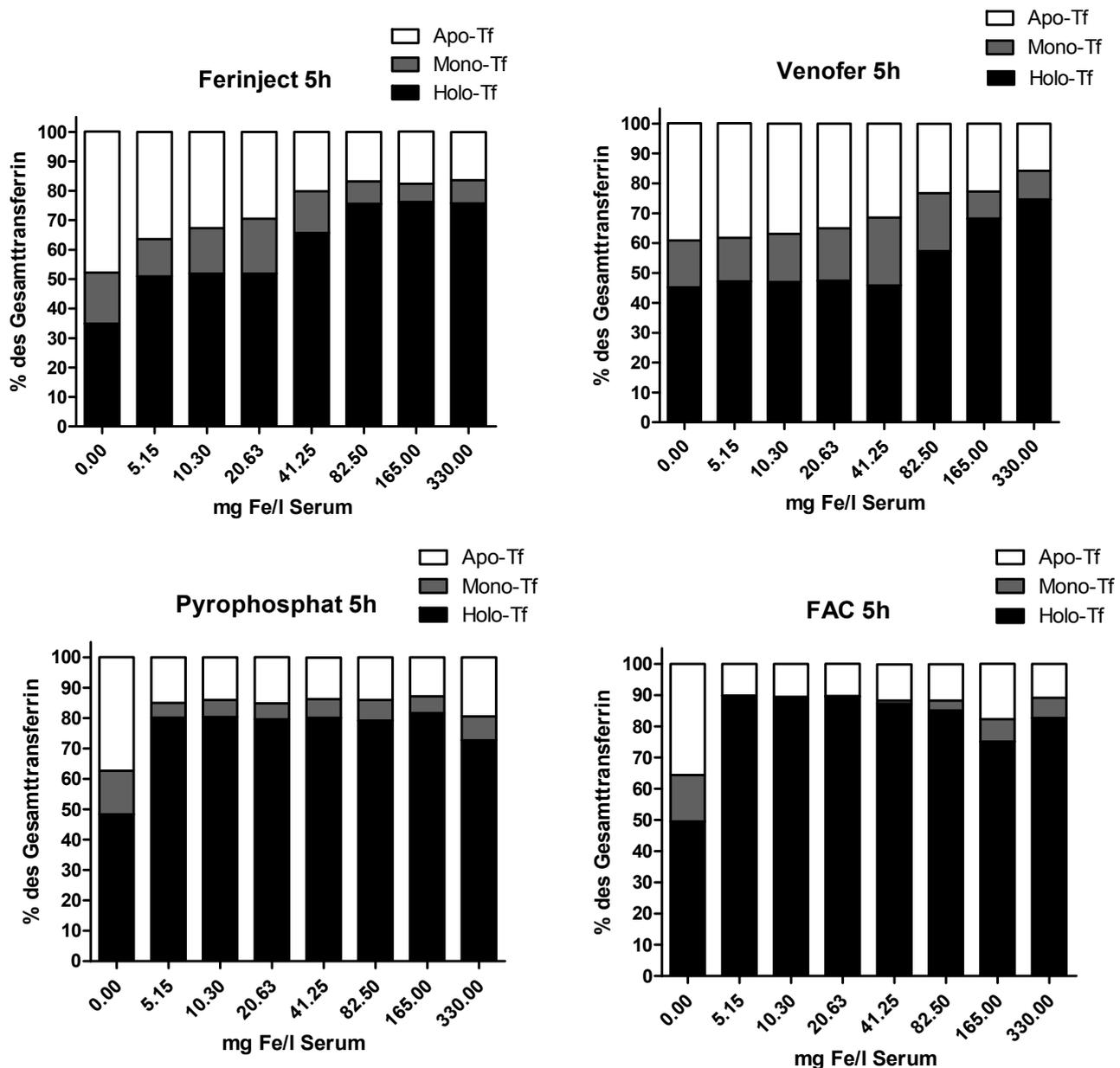


Abbildung 22: Semiquantitative Auswertung der Transferrinsättigung - Vor der Trennung mittels Harnstoffelektrophorese wurde humanes Serum 5 h bei 37° C mit Ferinject, Venofer, Fe-Pyrophosphat oder FAC inkubiert. Gezeigt sind verschiedene Beladungsformen von Transferrin als % des Gesamttransferrins; densitometrische Auswertung des Gels mit AlphaEase FC™ Software.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass alle vier getesteten Eisenpräparate einen direkten Übergang von Eisen auf Serumtransferrin aufweisen. Im Gegensatz dazu konnte Agarwal (2004) mit dem von uns hier nicht untersuchten Fe-Dextran in seiner Studie, die er auf vergleichbare Weise durchgeführt hat, keinen direkten Transfer des Eisens auf Transferrin feststellen. Weiters verglich er Ferrlecit, ein Fe-Gluconat, mit Venofer, wobei er für Ersteres eine größere Tendenz eines direkten Übergangs von Eisen auf Serumtransferrin feststellte.

Die von uns getesteten Eisenverbindungen konnten gemäß der densitometrischen Auswertung, Serumtransferrin in folgender Reihenfolge mit Eisen beladen: FAC > Fe-Pyrophosphat > Ferinject > Venofer.

Venofer zeigte somit den geringsten Übergang von Eisen auf Serumtransferrin, wobei die Verteilung des Transferrins (Tf) bei der höchsten Eisenbeladung bei rund 27 % Apo-Tf, 8 % Mono-Tf und 66 % Holo-Tf wieder ähnlich der Sättigung bei Ferinject mit 28 % Apo-Tf, 10 % Mono-Tf und 62 % Holo-Tf war. Aufgrund dessen und da von Venofer geringere Mengen an Eisen pro Infusion verabreicht werden, ist es schwierig die beiden Präparate zu vergleichen. Aus diesem Grund müssten die klinisch relevanten Konzentrationen verglichen werden. In einer pharmakokinetischen Studie von Danielsson et al. (1996) wurde an gesunden Erwachsenen, welche i.v. Eisenpräparate als Infusion erhalten haben, festgestellt, dass sich die Präparate in einem mittleren Volumen von 3 Litern verteilen. [DANIELSSON et al. 1996] Somit wäre im Falle der Verabreichung des Eisenpräparats Venofer (bei 100 mg Fe/Infusion) die Fe-Konzentration K4 (41,25 mg Fe/l) aus unserem Versuch interessant, sowie die Fe-Konzentration K1 (330 mg Fe/l) bei Ferinject (1000 mg/Infusion), und es müssten diese beiden miteinander verglichen werden. Erstere ist augenscheinlich identisch mit der Kontrolle, was darauf hindeuten würde, dass das Eisen für Transferrin schlecht verfügbar ist. Letztere zeigte in unserem Versuch nach 5 Stunden Inkubation bei 37° C rund 76 % Holo-Tf, 8 % Mono-Tf und 16 % Apo-Tf des Gesamttransferrins was auf eine hohe Transferrinsättigung hindeutet.

Zwei klinische Studien, die die Effizienz der Behandlung einer Eisenmangelanämie mit Eisencarboxymaltose untersuchten, konnten feststellen, dass das Präparat effektiv und rasch zu einer erfolgreichen Wiederauffüllung der Eisen-

speicher führte. Breyman et al. (2008) zeigten auch, dass dafür eine geringe Gesamtdosis an Eisen benötigt wurde und schließen somit auf eine effiziente Verwertung dieses parenteralen Eisenpräparats. [BREYMAN et al. 2008, COVIC und MIRZESCU 2010]

Das Fe^{3+} im Eisenpyrophosphat ist stark komplexiert und weist eine hohe effektive Stabilitätskonstante auf. [GUPTA und CRUMBLISS 2000] Eine kleine klinische Studie an 10 Hämodialysepatienten zeigt, dass der Transfer von löslichem Fe-Pyrophosphat, verabreicht über das Dialysat, in den Blutkreislauf effektiv genug ist, um die Eisenbalance aufrecht zu erhalten. Dafür wurden Konzentrationen bis zu 12 $\mu\text{g}/\text{dl}$ (=0,12 mg/l) Dialysateisen verwendet, die sich als sicher herausstellten. In einem in vitro Versuch stellten sich Konzentrationen bis 70 $\mu\text{g}/\text{dl}$ (=0,7 mg/l) als sicher heraus. [GUPTA et al. 1999] Beides liegt allerdings unter den von uns verwendeten Konzentrationen. Da Fe-Pyrophosphat in den klinischen Studien nicht als i.v. Eisen, sondern als direkter Zusatz zum Dialysat getestet wird, werden dafür niedrige Fe-Konzentrationen verwendet. Anders als die Behandlung der Anämie durch die gängigen Präparate, soll die Abnahme des Eisenstatus der Patienten durch die Dialyse von vornherein verhindert werden. Es wird nur so viel Eisen eingesetzt, wie zur Substitution dieses möglichen Verlustes notwendig ist. Im Gegensatz zu den anderen beiden in unserer Studie getesteten Präparate, werden nur niedrige Dosen eingesetzt da man potentiell schädlichere Bolusgaben vermeiden will. Unsere Ergebnisse bestätigen, dass hohe Konzentrationen an Fe-Pyrophosphat zu einer sehr raschen Transferrinbeladung führen.

4.2.2. Oxidativer Stress durch Eisenpräparate

Um das Potential der einzelnen Eisenpräparate, oxidativen Stress auszulösen aufzuzeigen, wurden humane HepG2 Zellen mit sieben verschiedenen Fe-Konzentration inkubiert (siehe Tabelle 9). Es wurden Ferinject (Eisencarboxymaltose), Venofer (Eisensaccharat) sowie Eisenpyrophosphat getestet. Anschließend wurde mittels 2,7-Dichlorodihydrofluorescein die Bildung von ROS gemessen.

Die Präparate wurden mit fötalem Kälberserum (FCS) und ohne dieses getestet. Sturm et al. (2010) zeigten einen Unterschied in der Bildung des redox-aktiven Eisen in plasma-ähnlichem Medium vs. menschlichem Serum. Fe-Gluconat zeigte den höchsten Anstieg der intrazellulären ROS-Bildung und den höchsten Gehalt an redox-aktivem Eisen in plasma-ähnlichem Medium. Im Gegensatz zu Eisensaccharat (Venofer) und Eisendextran war Eisengluconat katalytisch völlig inaktiv in der Gegenwart von humanem Serum, wobei die Präparate immer in klinisch relevanten Konzentrationen getestet wurden. Normalerweise fungiert das Transferrin im Plasma als wichtigstes Abwehrsystem, um oxidative Schäden durch freies Eisen zu vermeiden. [STURM et al. 2010] Das heißt, dass das Serum redox-aktives Eisen abfangen kann.

Zur Messung des oxidativen Stress der Zellen durch die Fe-Präparate ist anzumerken, dass jedes Präparat in dieser Arbeit nur einmal gemessen werden konnte und diese Messungen somit als Vorversuche für weitere Untersuchungen zu verstehen sind.

4.2.2.1. Messung in Anwesenheit der Fe-Präparate mittels DCF-Methode

Die Methode beruht darauf, dass die Acetatgruppe von 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein-diazetat (DCF-DA) nach der Aufnahme in die in diesem Versuch verwendeten HepG2 Zellen durch intrazelluläre Esterase hydrolysiert wird und dadurch das nicht fluoreszierende Dichlorodihydrofluorescein entsteht. Bei Anwesenheit von ROS in der Zelle wird es zum fluoreszierenden Dichlorofluorescein (DCF) oxidiert (siehe Material und Methoden Kapitel 3.3). [JAKUBOWSKI und BARTOSZ 2000]

Zuerst wurde der oxidative Stress in einer direkten Variante in Anwesenheit der Fe-Präparate gemessen. HepG2 Zellen wurden 30 min. mit DCF inkubiert und anschließend wurden die Zellen mit unterschiedlichen Fe-Konzentrationen des Eisenpräparats inkubiert. Es wurde sofort mit der Fluoreszenzmessung begonnen und 60 min. lang alle 15 min. gemessen. Jeweils 3 Wells pro Fe-Konzentration wurden mit und weitere 3 Wells ohne 10 % FCS angesetzt.

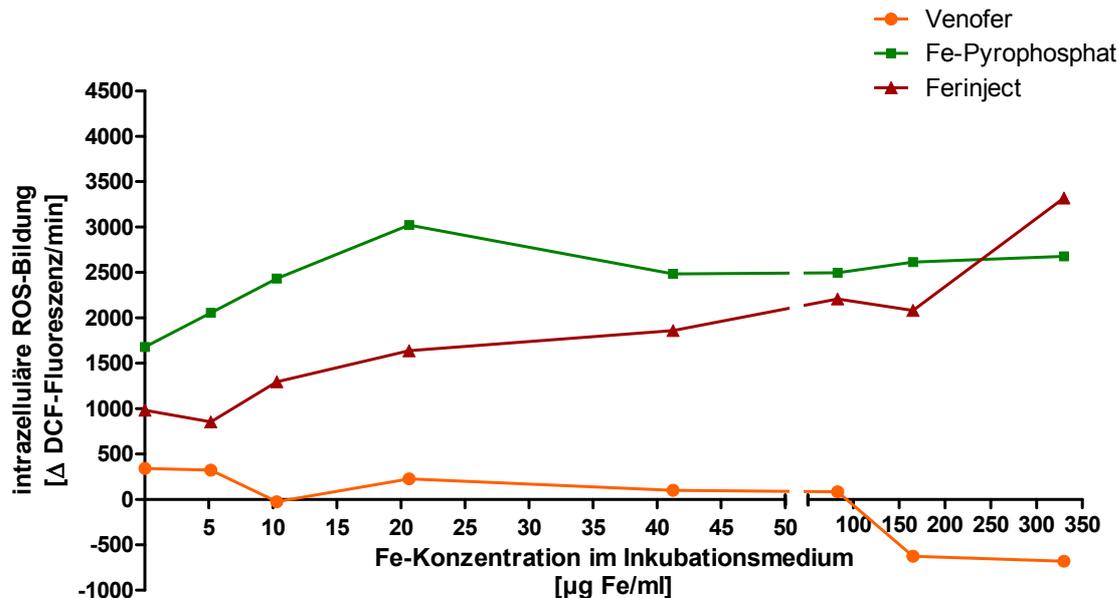


Abbildung 23: Bildung von intrazellulären ROS durch i.v. Eisenpräparate in HepG2 Zellen (Messung während der Inkubation mit dem Präparat, mit 10 % FCS) – HepG2 Zellen wurden mit nicht-fluoreszierendem Dichlorofluorescein-Diacetat beladen und nach einem Waschkvorgang mit einem der drei Fe-Präparate in Konzentrationen von 5,2 bis 330,0 mg Fe/l (siehe Tabelle 9) inkubiert. Es wurde sofort mit der Messung der Fluoreszenz begonnen und 60 min. lang alle 15 min. bei einer Anregungswellenlänge von 485 nm und einer Emissionswellenlänge von 535 nm, bei 37°C, gemessen. Gezeigt ist die Änderung der Fluoreszenzintensität pro Minute (n = 3 Wells).

Wie oben schon erwähnt, sieht man nun auch in den Abbildungen 23 und 24, dass es einen großen Unterschied in der Bildung von ROS ausmacht, ob FCS anwesend ist oder nicht. Mit FCS zeigt Venofer einen vernachlässigbaren Anstieg der Fluoreszenz (siehe Abbildung 23). Ferinject liegt bis zu einer Fe-Konzentration von 165 mg/l mit Werten für Δ DCF-Fluoreszenz/min. von 850 bis 2080 im Mittelfeld der drei Präparate. Fe-Pyrophosphat scheint unter diesen Versuchsbedingungen die höchste ROS-Produktion zu bewirken. Allerdings

übersteigt Ferinject bei der höchsten verwendeten Konzentration, die im Falle der Eisencarboxymaltose noch klinisch relevant ist, Fe-Pyrophosphat bei der ROS-Produktion.

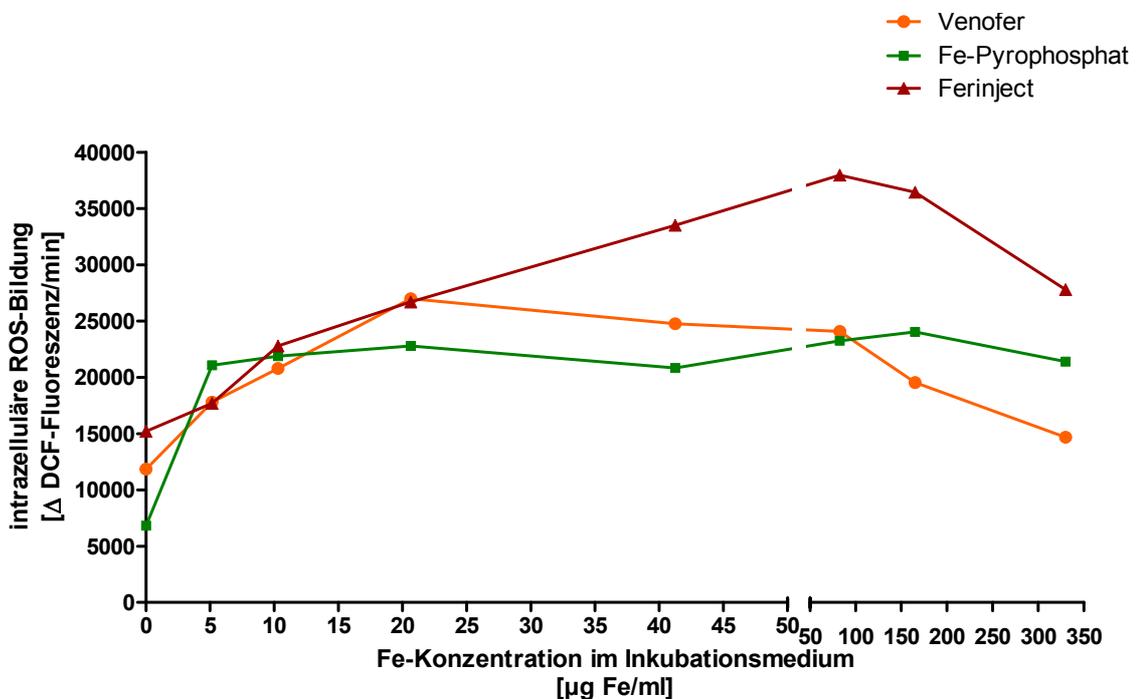


Abbildung 24: Bildung von intrazellulären ROS durch i.v. Eisenpräparate in HepG2 Zellen (Messung mit dem Präparat, ohne FCS) – Die Versuchsdurchführung war analog Abbildung 23.

Deutlich zu erkennen ist, dass der Anstieg des oxidativen Stress der Zellen bei der Messung ohne FCS um mindestens eine Zehnerpotenz höher war (siehe Abbildung 24). Während die ROS-Produktion durch Fe-Pyrophosphat und Venofer nun auf ähnlichem Niveau lagen und offenbar konzentrationsunabhängig sind, stieg die ROS-Produktion bei Ferinject kontinuierlich an, bis sie die bei den anderen Präparaten beobachteten Werte weit überstiegen und bei 82,5 mg Fe/l den höchsten Punkt erreichten. Anschließend nahm der Anstieg der DCF-Fluoreszenz bei den höchsten gemessenen Fe-Konzentrationen (165 bzw 330 mg/l) wieder ab.

Diese scheinbare Abnahme des Fluoreszenzanstiegs bei hohen Fe-Konzentrationen ist auch bei Venofer zu sehen, was wir auf die starke Eigen-

farbe der Präparate zurückführen, die bei den hohen Konzentrationen zum Tragen kommt und möglicherweise die Fluoreszenz quenchen.

4.2.2.2. Vorinkubation mit den Fe-Präparaten (Messung mittels DCF-Methode)

Da Venofer und Ferinject eine starke Eigenfarbe haben, könnte dies die vorher beschriebene Direktmessung der ROS-Produktion mittels der DCF-Methode (siehe Material und Methoden Kapitel 3.3) in Anwesenheit der Fe-Präparate beeinflussen. Außerdem wollten wir untersuchen, ob die Entstehung von oxidativem Stress von der Inkubationszeit abhängig ist. So wurden pro Eisenpräparat drei Mikrotiterplatten angesetzt und 1, 2.5 (bzw. 2 Stunden bei Fe-Pyrophosphat) oder 4.5 Stunden inkubiert und anschließend, nach Entfernung der Inkubationslösung und waschen der Zellen, erst mit DCF 30 min. inkubiert. Für die Messung wurden 100 µl/Well DMEM (Hepes gepuffert) verwendet. Wie auch bei der vorherigen Variante wurden die Eisenlösungen in 3 Wells pro Konzentration und Platte in Medium mit 10 % FCS, die anderen 3 Wells Medium ohne FCS inkubiert.

Beim Vergleich der Abbildungen 25 und 26, die die Ergebnisse der Messung der intrazellulären ROS-Bildung nach Vorinkubation mit einem der drei Fe-Präparate zeigen, fällt auf, dass es keinen Unterschied ergibt, ob mit Medium mit FCS oder mit Medium ohne FCS inkubiert wurde. Das Serum hat offenbar nach einer Stunde seinen schützenden Effekt verloren. Dies führt zu der Annahme, dass dieser nicht von Transferrin bzw. nicht von Transferrin alleine ausgelöst wird, da das Protein im Serum stabil ist. Im Serum sind offenbar auch andere Komponenten enthalten, die mit dem Eisen redox-inaktive Chelate bilden.

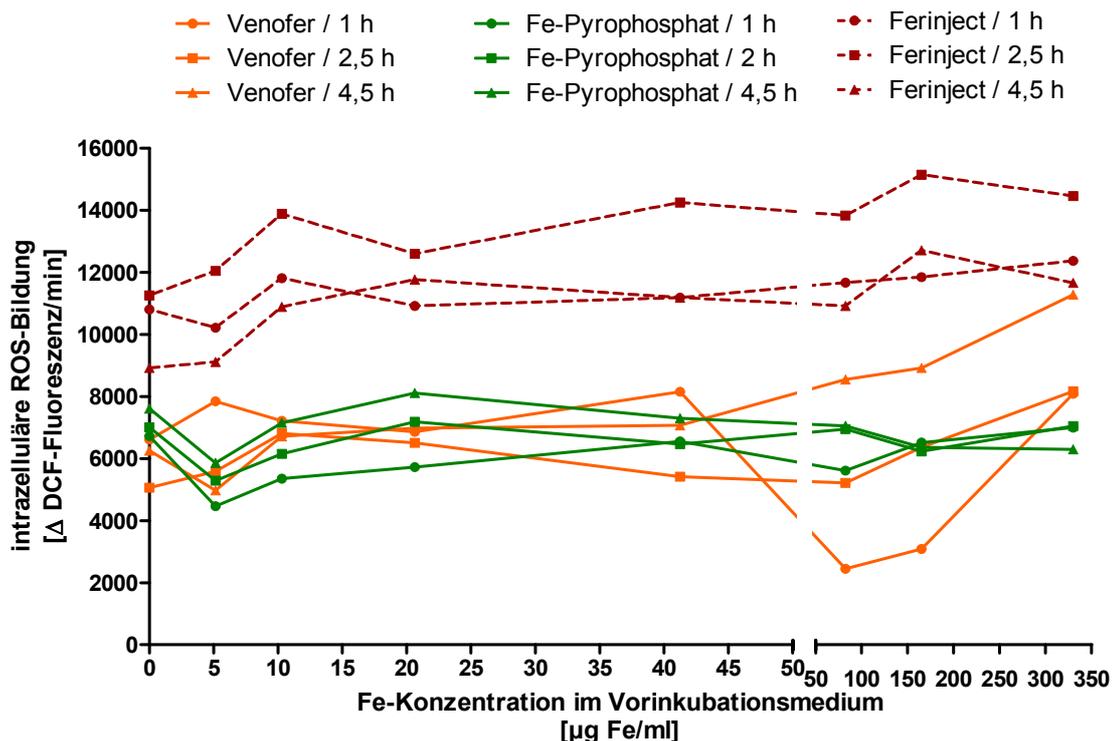


Abbildung 25: Bildung von intrazellulären ROS durch i.v. Eisenpräparate in HepG2 Zellen (Vorinkubation mit dem Präparat; mit 10 % FCS) – HepG2 Zellen wurden mit einem der drei Fe-Präparate in Konzentrationen von 5,2 bis 330,0 mg Fe/l (siehe Tabelle 9) 1, 2,5 (bzw. 2 h bei Fe-Pyrophosphat) oder 4,5 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit nicht-fluoreszierendem Dichlorofluorescein-Diacetat beladen und die Intensität der Fluoreszenz 60 min. lang alle 15 min. bei einer Anregungswellenlänge von 485 nm und einer Emissionswellenlänge von 535 nm, 37°C, gemessen. Gezeigt ist der Anstieg der Fluoreszenzintensität pro Minute (n = 3 Wells).

Eisenpyrophosphat und Venofer zeigten bei der niedrigsten Fe-Konzentration (5,15 mg/l) sowohl mit als auch ohne FCS in der Inkubationslösung einen geringeren Anstieg der Fluoreszenzintensität als die Kontrolle und bleiben im weiteren Verlauf auf ungefähr dem Niveau der Kontrolle. Venofer scheint erst bei einer Konzentration von 82,5 mg Fe/l, vor allem bei 4,5 Stunden Inkubation, eine Konzentrationsabhängigkeit zu zeigen. Da die klinisch relevanten Konzentrationen beim Präparat Venofer allerdings zwischen 33,3 mg/l bei 100 mg-Gaben und 66,7 mg/l bei der doppelten Gabe liegen, ist der Anstieg der ROS-Bildung bei höheren Fe-Konzentrationen vermutlich auch klinisch nicht bedeutend.

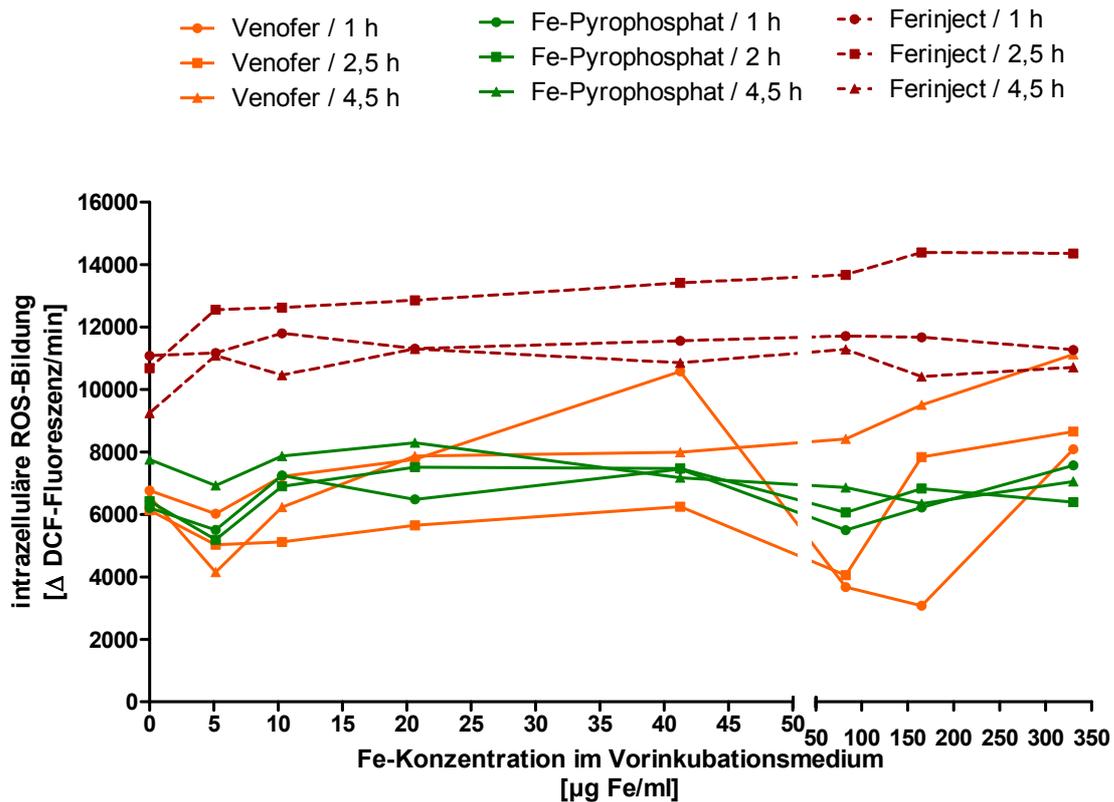


Abbildung 26: Bildung von intrazellulären ROS durch i.v. Eisenpräparate in HepG2 Zellen (Vorinkubation mit dem Präparat; ohne FCS) – Die Versuchsdurchführung war analog Abbildung 25.

Der Anstieg der Fluoreszenzintensität bei Verwendung von Ferinject ist leicht konzentrationsabhängig in Anwesenheit von FCS, scheint aber nahezu gleich zu bleiben, wenn ohne FCS inkubiert wurde. Ob man diesen Effekt direkt auf FCS zurückführen kann, müssten weitere Versuche zeigen. Wie eingangs schon erwähnt, reagiert jedes Präparat anders und so kann es durchaus sein, dass das Serum nur auf Eisencarboxymaltose eine Wirkung hat, jedoch nicht auf Eisensaccharat und Eisenpyrophosphat.

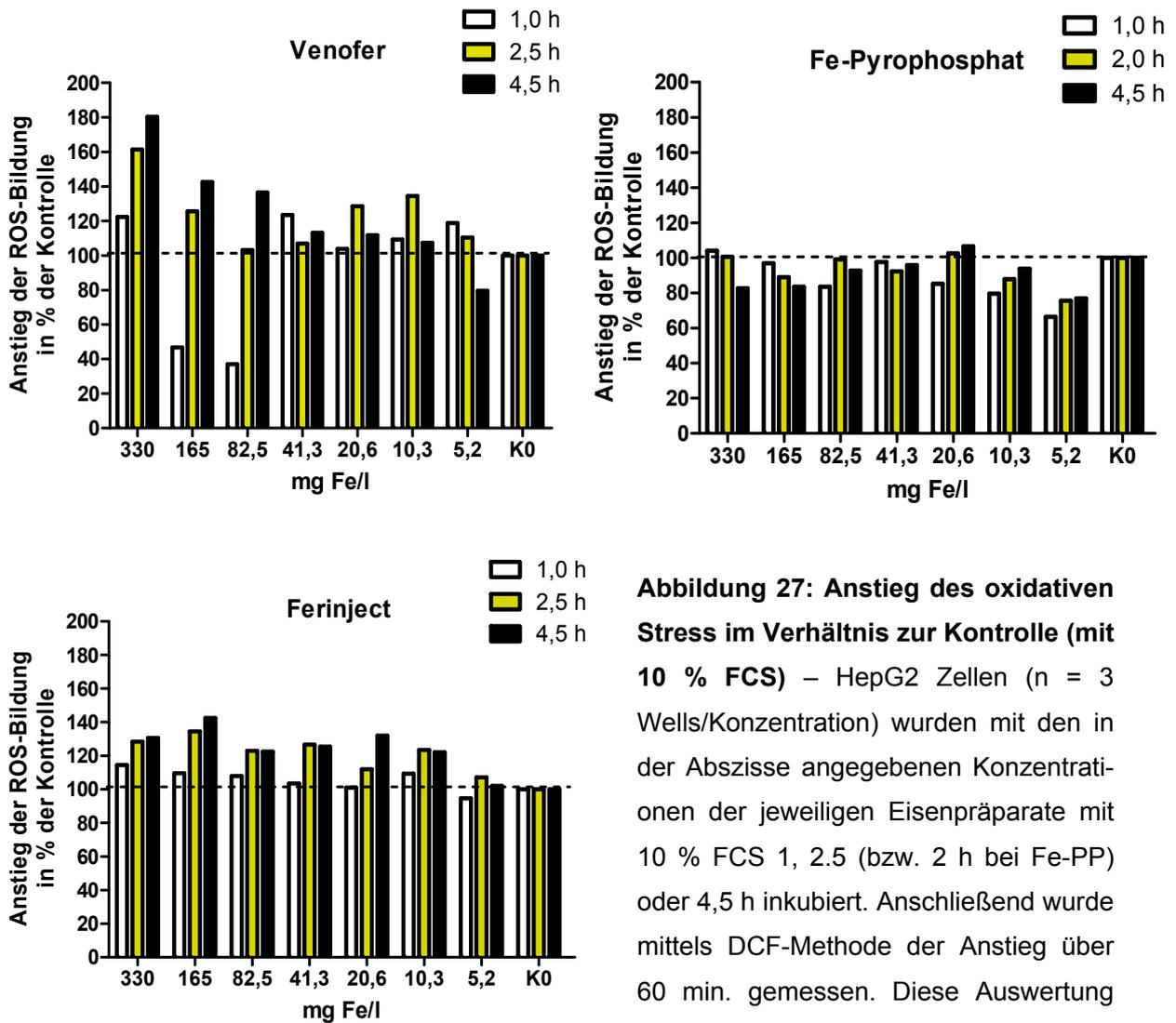


Abbildung 27: Anstieg des oxidativen Stress im Verhältnis zur Kontrolle (mit 10 % FCS) – HepG2 Zellen (n = 3 Wells/Konzentration) wurden mit den in der Abszisse angegebenen Konzentrationen der jeweiligen Eisenpräparate mit 10 % FCS 1, 2,5 (bzw. 2 h bei Fe-PP) oder 4,5 h inkubiert. Anschließend wurde mittels DCF-Methode der Anstieg über 60 min. gemessen. Diese Auswertung zeigt den Anstieg der Fluoreszenzintensität in Prozent der Kontrolle.

Da die unterschiedlichen Eisenpräparate an verschiedenen Tagen gemessen wurden, war der Fluoreszenzanstieg der Kontrollen, wie man in Abbildung 25 und 26 gut erkennen kann, unterschiedlich. Um die Eisenverbindungen besser miteinander vergleichen zu können, habe ich die Ergebnisse als Prozent des Anstiegs bzw. der Abnahme im Verhältnis zur Kontrolle in Abbildung 27 mit FCS und in Abbildung 28 ohne FCS im Inkubationsmedium dargestellt.

Bei der Inkubation mit Venofer mit und ohne FCS im Inkubationsmedium war nur nach 4,5-stündiger Inkubationsdauer mit dem Eisenpräparat eine Konzentrationsabhängigkeit zu erkennen. Die Anstiege der Fluoreszenzintensität bei Inkubationszeiten von einer und 2,5 Stunden schwankten stark.

Interessanterweise blieb die ROS-Bildung im Falle der Verwendung von Fe-Pyrophosphat und Inkubationsmedium mit FCS so gut wie immer unter der Kontrolle und überstieg diese bei einer Inkubation ohne FCS um höchstens 22 % (bei 330 mg Fe/l, 1 h Inkubation). Egal ob FCS zur Inkubationslösung zugesetzt wurde oder nicht, scheinen beide Varianten nicht konzentrations- und zeitabhängig zu sein.

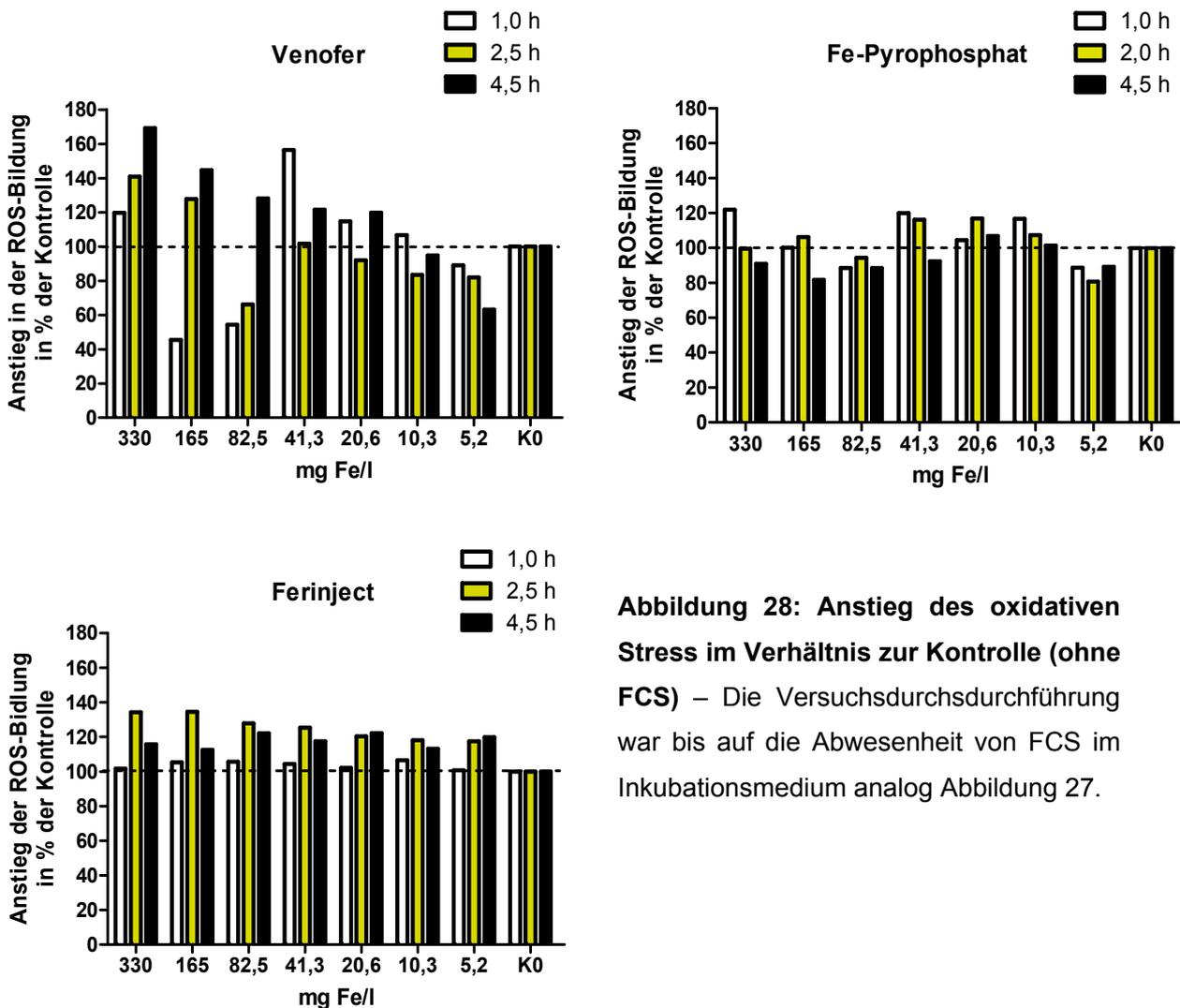


Abbildung 28: Anstieg des oxidativen Stress im Verhältnis zur Kontrolle (ohne FCS) – Die Versuchsdurchführung war bis auf die Abwesenheit von FCS im Inkubationsmedium analog Abbildung 27.

Es zeigt sich nun in dieser Darstellung in % der Kontrolle, dass die ROS-Bildung von Ferinject im Mittelfeld rangiert. Bei Inkubation mit FCS erkennt man wieder eine leichte Konzentrations- und Zeitabhängigkeit, wobei dies in Abwesenheit von FCS offenbar nicht mehr der Fall ist. Bei Fe-Konzentrationen von 165 mg/l bzw. 330 mg/l überstieg die ROS-Bildung durch Ferinject die der Kontrolle um rund 42 bzw. 31 % Prozent bei der längsten Inkubationsdauer mit FCS. Ohne Serum zeigten die Zellen nach 2,5 h den höchsten Anstieg in % der

Kontrolle und überstiegen diese um rund 34,5 % bei Fe-Konzentrationen von 330 – 165 mg/l. Von Ferinject werden Einzeldosen von 1000 mg gegeben, womit eine Konzentration von 330 mg/l klinisch relevant ist.

Zusammenfassend lassen diese ersten Versuche sowohl mit, als auch ohne Serum in der Inkubationslösung darauf schließen, dass Venofer bei hohen Fe-Konzentrationen die höchste ROS-Bildung auslöst. Bei klinisch relevanten Konzentrationen schwankten die Werte stark. Ferinject zeigte mittelmäßige Bildung von oxidativem Stress, während Fe-Pyrophosphat im Verhältnis zur Kontrolle katalytisch inaktiv scheint. Um gesicherte Aussagen machen zu können, müssen diese Vorversuche allerdings wiederholt werden.

4.2.3. Fazit Parenterale Eisengaben

Über die Visualisierung der Aufteilung der molekularen Eisenbeladungsformen des Transferrins konnte gezeigt werden, dass die vier untersuchten Eisenpräparate Venofer, Ferinject, Fe-Pyrophosphat sowie FAC einen direkten Fe-Transfer auf Serumtransferrin aufweisen. Wie erwartet bewirkte FAC die höchste Transferrinbeladung, gefolgt von Fe-Pyrophosphat, Ferinject sowie Venofer mit der niedrigsten Transferrinbeladung nach 5 Stunden Inkubation von humanem Serum mit den Eisenpräparaten.

Die Präparate haben sehr unterschiedliche Plasmahalbwertszeiten und Verabreichungsdosen. Wir haben in unserem Versuch einheitlich 5 Stunden inkubiert und eine Reihe von Fe-Konzentrationen getestet. Unsere Ergebnisse sollen als Grundlage für weitere Versuche, angepasst an die jeweiligen Eigenschaften der Präparate, dienen.

Transferrin fungiert im Plasma als wichtigstes Abwehrsystem, um mögliche Schäden, die durch freies Eisen ausgelöster oxidativer Stress verursachen könnte, zu vermeiden. [STURM et al. 2010] Liegt im Plasma zu viel Eisen vor, so dass etwa die Hälfte der Eisenbindungskapazität des Transferrin überschritten wird, kommt es zu NTBI im Plasma. In dieser Fraktion ist das Eisen nur lose gebunden und besitzt somit redox-aktives Potential. Da die Aufnahme von NTBI in die Zellen nicht geregelt wird, kann es dadurch zu einer Eisenüberladung, auch in empfindlichen Geweben, kommen. Außerdem steigt, zumindest kurzfristig, der intrazelläre LIP, der auch mit oxidativem Stress in Verbindung gebracht wird. [STURM et al. 2003; ESPOSITO et al. 2002; BREUER 2000] Deshalb wurde anschließend die ROS-Bildung in HepG2 Zellen infolge einer Inkubation mit den Fe-Präparaten gemessen.

Es konnte ein entscheidender Unterschied zwischen Inkubation mit bzw. ohne Serum in der Inkubationslösung bei der Messung der ROS-Bildung in HepG2 Zellen in Anwesenheit der Fe-Präparate festgestellt werden. Wurden die Zellen ohne FCS angesetzt, war der Anstieg der Fluoreszenzintensität um mindestens eine Zehnerpotenz höher als mit FCS in der Inkubationslösung. Auch die einzelnen Präparate reagierten unterschiedlich in An- bzw. Abwesenheit von Serum. Mit FCS zeigte Fe-Pyrophosphat den höchsten oxidativen Stress, gefolgt von Ferinject. Venofer löste so gut wie keine ROS-Bildung aus. Ohne FCS war

Ferinject ab einer Konzentration von 20,6 mg Fe/l der stärkste Auslöser der ROS-Bildung.

Wurden die Zellen mit den einzelnen Fe-Präparaten vorinkubiert und erst nach wegwaschen der Inkubationslösung die Messung mit DCF durchgeführt, ergab es nahezu keinen Unterschied, ob FCS während der Vorinkubation anwesend war oder nicht. Weiters löste Venofer bei hohen Fe-Konzentrationen die höchste ROS-Bildung aus. Bei klinisch relevanten Konzentrationen schwankten die gemessenen Werte stark, hielten sich aber im Mittel in Grenzen. Ferinject zeigte mittelmäßige Bildung von oxidativem Stress und Fe-Pyrophosphat scheint im Verhältnis zur Kontrolle katalytisch inaktiv. Um gesicherte Aussagen machen zu können, sind allerdings noch weitere Versuche notwendig.

Bei einer aktuellen Studie von Johnson et al. (2010) hatte Venofer im Vergleich mit Eisengluconat und Ferumoxytol einem ganz neuen Fe-Präparat, das höchste pro-oxidative Potential. Johnson et al. haben allerdings über einen Versuch festgestellt, dass dies nicht immer nur negative Folgen haben muss, da Eisen möglicherweise durch Stimulation der Biosynthese von cytoprotektiven Stressproteine mögliche schädliche Effekte auf die Zellen verhindert. Sie sprechen dabei von einer „erworbenen Resistenz“. [JOHNSON et al. 2010]

Sturm et al. (2010) verglichen Fe-Saccharat, Fe-Gluconat und Fe-Dextran in den jeweils klinisch relevanten Konzentrationen, wobei diese nicht toxisch auf HepG2 Zellen wirkten und der Gehalt an redox-aktivem Eisen bei allen drei Präparaten in Anwesenheit von humanem Serum äußerst gering war. [STURM et al. 2010]

In einer anderen Studie wurden HepG2 Zellen von Sturm et al. (2003) mit 75 μ M Eisen entweder mittels Fe-Pyrophosphat oder Venofer inkubiert und der Anstieg des intrazellulären LIP gemessen. Die Ergebnisse zeigten, dass Fe-Pyrophosphat im Vergleich zu Venofer einen schnelleren Anstieg der Ferritinsynthese auslöste, sowie dadurch wieder eine schnellere Abnahme des LIP bei Fe-Pyrophosphat. [STURM et al. 2003] Weitere Versuche zeigten, dass redox-aktives Eisen zu finden war, wenn Fe-Pyrophosphat in Puffer gelöst wurde, dieses aber in Anwesenheit von transferrinfreiem Serumfiltrat bei Konzentrationen bis zu 25 μ M Fe-Pyrophosphat verschwindet. Das deutet darauf hin, dass auch andere Komponenten im Serum mit dem Eisen redox-inaktive Chelate bilden.

Aufgrund dieses Versuchs gehen Sturm et al. davon aus, dass Serumkonzentrationen von bis zu 25 μM Fe-Pyrophosphat als sicher angesehen werden können. [STURM et al. 2010] Diese Konzentration liegt allerdings unter der von uns verwendeten niedrigsten Konzentration.

Zager et al. (2002) stellten fest, dass parenterales FeSaccharat ein hoch potentes Prooxidans darstellt und fähig ist, tubulären und endothelialen Zelltod auszulösen. Weiters zogen sie das Fazit, dass alle Fe-Präparate ein sehr unterschiedliches toxikologisches Profil besitzen, [ZAGER et al. 2002] was auch wir mit unseren Versuchen festgestellt haben.

5. Schlussbetrachtung

Eisen stellt für unseren Körper ein Paradoxon dar: Einerseits ist es essentiell, da es aufgrund seiner Redox-Eigenschaften für verschiedene Stoffwechselreaktionen gebraucht wird, andererseits können gerade diese Redox-Eigenschaften für eine potentiell toxische und schädliche Wirkung verantwortlich sein. [CRICHTON et al. 2008, EDISON et al. 2008; PONKA 1999]

Der Ausdruck „oxidativer Stress“ beschreibt einen Status, in dem die Prooxidantien/Antioxidantien-Balance zu Gunsten des Ersteren beeinträchtigt ist, was im Anschluss potentiell zu einer Schädigung führt. Diese Definition beinhaltet zwei Bedingungen: 1.) erhöhte oxidative Belastung (und möglicherweise niedrige Antioxidantienlevel); und 2.) Bildung von Indikatoren für oxidative Schäden an Biomolekülen, besonders DNA, Proteine und Lipide. [GIUSTARINI et al. 2009]

Ein Ziel dieser Arbeit war, ein Eisenmangel-Rattenmodell zu etablieren, mit Hilfe dessen die pathophysiologischen Folgen eines Eisenmangels, sowie mögliche therapeutische Interventionen untersucht werden können. Es war erstaunlich festzustellen, dass eine Dauer von einer Woche ausreichte, um den Eisenmangel in 2 bis 3 Wochen alten Ratten über die Verabreichung von Futter, das wenig Eisen enthält, im Vergleich zur Kontrollgruppe auszulösen. Die Eisenmangelanämie konnte sowohl an den klinischen Blutparametern, als auch am signifikant reduzierten Lebereisengehalt gemessen werden. Unser Rattenmodell erscheint aufgrund unserer Ergebnisse geeignet, um pathophysiologische Folgen eines Eisenmangels und mögliche therapeutische Interventionen zu untersuchen.

Außerdem wurde untersucht, ob eine erhöhte Bildung von ROS eine pathophysiologische Folge der Eisenmangelanämie darstellt. Dazu wurden wieder die Leberproben aus dem Fütterungsversuch herangezogen. Weder in Form höherer wasserlöslicher, noch lipidlöslicher Peroxide konnte oxidativer Stress, der durch die Eisenmangelanämie ausgelöst worden sein könnte, festgestellt werden. Mit dem FOX Assay, der die lipidlöslichen Peroxide bestimmt, wurden bei der Kontrollgruppe offenbar zu jedem Zeitpunkt des Fütterungsversuchs höhere

Peroxidmengen als in der Eisenmangelgruppe gemessen, was in Woche 2 sogar signifikant war ($p=0,0017$).

In einer ähnlichen Studie von Diaz-Castro et al. (2008) an 20 männlichen Wistar Albinoratten konnte auch kein signifikanter Unterschied an oxidativem Stress in der Leber der Eisenmangelratten gegenüber den Kontrollratten festgestellt werden. Aufgrund ihrer Ergebnisse schlossen Diaz-Castro et al., dass die hepatische antioxidative Kapazität der Ratten normal war und eventuell auf adäquate Aktivitäten der antioxidativen Enzyme (GSH-Px, Catalase und Gluthationreduktase) zurückzuführen ist. Dies könnte auch auf die oxidative Balance der Tiere in unserem Fütterungsversuch zutreffen. Weiters gingen sie von einem protektiven Effekt aus, indem der Eisenmangel verhindert, dass Fe-katalysierte Sauerstoffradikale über die Fenton und Haber-Weiss Reaktion entstehen, die in weiterer Folge zur Lipidperoxidation führen würden. [DIAZ-CASTRO et al. 2008] Durch die signifikante Korrelation zwischen Lebereisengehalt und wasserlöslichem Peroxidlevel in den entsprechenden Leberproben, konnten wir außerdem den Zusammenhang zwischen Eisenstatus und Peroxiden zeigen.

Der zweite Teil dieser Arbeit beschäftigte sich mit der ROS-Bildung durch intravenöse Eisenpräparate, die für eine Behandlung einer Eisenmangelanämie eingesetzt werden. Dies erfolgte, indem zwei wichtige Eigenschaften parenteral verabreichbarer Eisenpräparate untersucht wurden: Einerseits die Fähigkeit, das Eisen auf Transferrin zu übertragen und die dadurch entstehende Transferrinsättigung in menschlichem Serum, sowie andererseits die Bildung von reaktiven Sauerstoffverbindungen und die somit mögliche Entstehung von oxidativem Stress in vitro in humanen HepG2 Zellen.

Über die Visualisierung der Aufteilung der molekularen Eisenbeladungsformen des Transferrins konnte gezeigt werden, dass die vier untersuchten Eisenpräparate Venofer, Ferinject, Fe-Pyrophosphat sowie Ammoniumeisencitrat (FAC) einen direkten Fe-Transfer auf humanes Serumtransferrin aufweisen. Wie erwartet, bewirkte eine Inkubation des Serums mit FAC die höchste Transferrinbeladung, gefolgt von Fe-Pyrophosphat, Ferinject sowie Venofer mit der niedrigsten Transferrinbeladung nach 5-stündiger Inkubation.

Transferrin fungiert im Plasma als wichtiges Abwehrsystem. Durch die Bindung an Transferrin ist das Eisen effektiv abgeschirmt, um mögliche Schäden, die

durch Fe-induzierten oxidativen Stress entstehen könnten, zu vermeiden. [STURM et al. 2010] Bei der Messung der ROS-Bildung in humanen HepG2 Zellen in Anwesenheit der Fe-Präparate konnte ein entscheidender Unterschied zwischen Inkubation mit bzw. ohne Serum (FCS) festgestellt werden. Wurden die Zellen ohne FCS angesetzt, war der Anstieg der Fluoreszenzintensität um mindestens eine Zehnerpotenz höher als mit FCS in der Inkubationslösung. Auch die einzelnen Präparate reagierten unterschiedlich in An- bzw. Abwesenheit von Serum. Mit FCS zeigte Fe-Pyrophosphat den höchsten oxidativen Stress, gefolgt von Ferinject. Venofer löste so gut wie keine ROS-Bildung aus. Ohne FCS war Ferinject ab einer Konzentration von 20,6 mg Fe/l der stärkste Auslöser der ROS-Bildung.

Die Messung der ROS-Bildung nach Vorinkubation der Zellen mit den Fe-Präparaten ergab nahezu keinen Unterschied der Messergebnisse in An- oder Abwesenheit von FCS im Inkubationsmedium. Weiters löste Venofer bei hohen Fe-Konzentrationen die höchste ROS-Bildung aus. Bei klinisch relevanten Konzentrationen von Venofer schwankten die gemessenen Werte stark. Unter den Versuchsbedingungen der Vorinkubation zeigte Ferinject mittelmäßige Bildung von oxidativem Stress. Fe-Pyrophosphat scheint hingegen katalytisch inaktiv. Die Untersuchungen der ROS-Bildung durch die Eisenpräparate stellten allerdings nur Vorversuche dar. Um die Ergebnisse zu bestätigen, sind weitere Versuche notwendig.

Die gängigen intravenösen Fe-Präparate unterscheiden sich stark in wichtigen pharmakologischen Parametern wie Halbwertszeit, Molekulargewicht und ihren Verabreichungsmengen. Daher ist es offensichtlich, dass auch die Effekte in vivo verschieden sind, wobei jedes Präparat sicherlich seine Vor- und Nachteile hat. [AGARWAL 2004] Die einzelnen Fe-Präparate besitzen ein sehr unterschiedliches toxikologisches Profil. [ZAGER et al. 2002] Diese Erkenntnisse konnten mit unseren Versuchen bestätigt werden.

6. Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war, den Einfluss von Eisen auf die Bildung von oxidativem Stress näher zu untersuchen. Dies erfolgte in zwei Bereichen: Im ersten Teil wurde ein Eisenmangel-Rattenmodell etabliert, um die physiologischen Folgen einer Eisenmangelanämie, sowie mögliche therapeutische Interventionen untersuchen zu können. Erstaunlicherweise reichte schon eine Dauer von einer Woche, in der eisenarmes Futter verabreicht wurde, um eine Eisenmangelanämie in zwei bis drei Wochen alten Ratten auszulösen. In weiterer Folge wurde anhand dieses Rattenmodells untersucht, in wie weit der Eisenmangel die Bildung von reaktiven Sauerstoffverbindungen in der Leber beeinflusst. Der durch ein Ungleichgewicht an Pro- und Antioxidantien ausgelöste oxidative Stress kann zu erheblichen Schäden im Körper führen. Wir nahmen an, dass Eisenmangelanämie eine höhere oxidative Aktivität bzw. eine geringere Gesamtantioxidantienkapazität zur Folge hat. Diese Annahme konnte mit unserem Eisenmangel-Rattenmodell nicht bestätigt werden. Es konnten weder höhere Werte wasserlöslicher noch lipidlöslicher Peroxide, die durch die Eisenmangelanämie ausgelöst worden sein könnten, festgestellt werden. Die Kontrollgruppe hatte sogar höhere Peroxidlevel als die Eisenmangelgruppe. Diaz-Castro et al. (2008) gehen davon aus, dass Eisenmangel einen protektiven Effekt in den Zellen auslöst indem, bedingt durch die Abwesenheit von Eisen, verhindert wird, dass Fe-katalysierte Sauerstoffradikale über die Fenton und Haber-Weiss Reaktion entstehen, die in weiterer Folge zur Lipidperoxidation führen würden. [DIAZ-CASTRO et al. 2008]

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde bestätigt, dass gängige intravenöse Eisenpräparate unterschiedliche Eigenschaften und toxikologische Profile besitzen. Parenterale Eisengaben sind oft zur Behandlung einer Eisenmangelanämie notwendig, die unterschiedlichen Eisenpräparate werden aber in Bezug auf potentiell schädliche Wirkungen kontrovers diskutiert. [CAVILL 2003]

Eisenammoniumcitrat (FAC), welches als Modell für niedermolekulares Eisen diente, hatte das höchste Potential, Serumtransferrin mit Eisen zu beladen, gefolgt von Fe-Pyrophosphat, Ferinject sowie Venofer mit dem niedrigsten Über-

gang von Eisen auf Transferrin nach 5 Stunden Inkubation mit humanem Serum. Bei der Messung der ROS-Bildung in humanen HepG2 Zellen in Anwesenheit der Fe-Präparate konnte ein entscheidender Unterschied der Messergebnisse zwischen Inkubation mit bzw. ohne Serum festgestellt werden. Auch die einzelnen Präparate reagierten unterschiedlich in An- bzw. Abwesenheit von Serum. Wurden die Zellen mit den einzelnen Fe-Präparaten vorinkubiert, war es nahezu unerheblich, ob dabei Serum in der Inkubationslösung anwesend war oder nicht. Durch diesen zweiten Versuch war außerdem zu erkennen, dass Venofer bei hohen Fe-Konzentrationen die höchste ROS-Bildung auslöste. Die gemessenen Werte schwankten bei für Venofer klinisch relevanten Konzentrationen stark. Ferinject zeigte mittelmäßige Bildung von oxidativem Stress. Interessanterweise führten Venofer und Ferinject, die klinisch in Verwendung sind, zu ROS-Bildung während Fe-Pyrophosphat, das noch in der klinischen Entwicklung steckt, im Verhältnis zur Kontrolle katalytisch inaktiv scheint. Gesicherte Aussagen können nur nach weiteren Versuchen getroffen werden.

7. Summary

The aim of this work was to investigate the influence of iron on oxidative stress. This was carried out in two parts: On the one hand a rat model of iron deficiency anemia (IDA) was established to further investigate the pathophysiological consequences of iron deficiency and possible therapeutic interventions. A period of one week on an iron deficient (ID) diet was sufficient to induce IDA in between two and three weeks old rats and significantly reduce liver iron content compared to the control group. Subsequently, it was studied on this rat model whether iron deficiency influences the formation of reactive oxygen species in the liver. An imbalance in pro- and antioxidants could lead to oxidative damage in the body. We hypothesised that ID leads to a higher oxidative activity or rather a diminished total antioxidative capacity. We could not corroborate this hypothesis with the IDA-rat model of this study due to the fact that we could not detect any rise in aqueous-compatible or lipid-compatible peroxides caused by IDA compared to the control group. The latter had even higher levels of peroxides compared to the ID-group. Diaz-Castro et al. (2008) assume that ID leads to a protective effect in the cells caused by a low level of iron. They conclude that iron catalysed oxygen radicals, which are built during the Fenton and Haber-Weiss reaction and further lead to lipidperoxidation, are not formed during an ID status. [DIAZ-CASTRO et al. 2008]

In the second part of this work it has been confirmed, that frequently used intravenous iron formulations have distinct characteristics as well as toxicological profiles. Parenteral iron preparations are often necessary in the treatment of IDA, but the different parenteral iron preparations are controversially discussed regarding potential harmful effects. [CAVILL 2003]

We found that Ferrous Ammonium Citrate (FAC), which represents low molecular weight iron, had the highest potential to load transferrin, followed by ferric pyrophosphate, Ferinject and Venofer with the lowest iron loading potential to transferrin after 5 hours of incubation in human serum. When we measured ROS formation in human HepG2 cells in the presence of the iron formulations, we were able to detect a large difference between incubation with or without

serum. In addition each individual iron preparation responded differently in the presence or absence of serum. On the other hand, when the cells were only preincubated with the iron formulations, there was almost no difference in ROS generation whether or not serum was present during that time. In this second experiment we observed, that Venofer leads to the highest formation of ROS at the highest iron concentrations used in our experiment. However, with clinically relevant concentrations of Venofer the measured values varied. Ferinject showed moderate generation of oxidative stress. Interestingly the clinically used compounds Venofer and Ferinject lead to oxidative stress, whereas ferric pyrophosphate, which is still under clinical investigation, seemed catalytically inactive compared to the control. Further investigations are needed.

8. Literaturverzeichnis

ADAMSON J., ESCHBACH J. Erythropoietin for end-stage renal disease. *N Engl J Med* 1998; 339: 584-590.

AGARWAL R. Transferrin saturation with intravenous irons: An in vitro study. *Kidney Int* 2004; 66: 1139-1144.

AGARWAL R., RIZKALA A., KASKAS M., MINASIAN R., TROUT J. Iron sucrose causes greater proteinuria than ferric gluconate in non-dialysis chronic kidney disease. *Kidney Int* 2007; 72: 638-642.

ANDERSON G., FRAZER D., MCLAREN G. Iron absorption and metabolism. *Curr Opin Gastroenterol* 2009; 25: 129-135.

BANERJEE D., MADHUSOODANAN U., SHARANABASAPPA M., GHOSH S., JACOB J. Measurement of plasma hydroperoxide concentration by FOX-1 assay in conjunction with triphenylphosphine. *Clin Chim Acta* 2003; 337: 147-152.

BRADFORD M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248-254.

BREUER W., HERSHKO C., CABANTCHIK Z. The importance of non-transferrin bound iron in disorders of iron metabolism. *Transfus Sci* 2000; 23(3): 185-192.

CAVILL I. Intravenous iron as adjuvant therapy: a two-edged sword? *Nephrol Dial Transplant* 2003; 18 (Suppl 8): 24-28.

CHEN O., SCHALINSKE K., EISENSTEIN R. Dietary Iron Intake Modulates the Activity of Iron Regulatory Proteins and the Abundance of Ferritin and Mitochondrial Aconitase in Rat Liver. *J Nutr* 1997; 127(2): 238-248.

CHRICHTON R., DANIELSON B., GEISSER P. Iron therapy with special emphasis on intravenous administration. Uni-Med Verlag, Bremen 2008; 4. Edition.

COOK C., YU B. Iron accumulation in aging: modulation by dietary restriction. *Mech Ageing Dev* 1998; 102(1): 1-13.

DANIELSON B., SALMONSON T., DERENDORF H., GEISSER P. Pharmacokinetics of iron(III)-hydroxide sucrose complex after a single intravenous dose in healthy volunteers. *Arzneimittelforschung* 1996; 46:615-621.

DIAZ-CASTRO J., ALFEREZ M., LOPEZ-ALIAGA I., NESTARES T., GRANADOS S., BARRIONUEVO M., CAMPOS M. Influence of nutritional iron deficiency anemia on DNA stability and lipid peroxidation in rats. *Nutrition* 2008; 24: 1167-1173.

ERIKSON K., PINERO D., CONNOR J., BEARD J. Regional Brain Iron, Ferritin and Transferrin Concentrations during Iron Deficiency and Iron Repletion in Developing Rats. *J Nutr* 1997; 127: 2030-2038.

ESPOSITO B., BREUER W., SLOTKI I., CABANTCHIK Z. Labile iron in parenteral iron formulations and its potential for generating plasma nontransferrin-bound iron in dialysis patients. *Eur J Clin Invest* 2002; 32 (Suppl 1): 42-49.

FISH W. Rapid colorimetric micro-method for the quantitation of complexed iron in biological samples. *Methods Enzymol* 1988; 158: 357-364.

FREINBICHLER W., TIPTON K., CORTE L., LINERT W. Mechanistic aspects of the Fenton reaction under conditions approximated to the extracellular fluid. *J Inorg Biochem* 2008; 103: 28-34.

GEISSER P., BAER M., SCHAUB E. Structure/Histotoxicity relationship of parenteral iron preparation. *Arzneimittelforschung* 1992; 42: 754-760.

GEISSER P. Iron therapy with special emphasis on oxidative stress. Monographie 1998; Vifor (International) Inc, Erste Edition.

GIUSTARINI D., DALLE-DONNE I., TSIKAS D., ROSSI R. Oxidative stress and human diseases: Origin, link, measurement, mechanisms, and biomarkers. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2009; 46(5-6): 241-281.

GUPTA A., AMIN N., BESARAB A., VOGEL S., DIVINE G., YEE J., ANANDAN J. Dialysate iron therapy: Infusion of soluble ferric pyrophosphate via the dialysate during hemodialysis. *Kidney Int.* 1999; 55: 1891-1898.

GUPTA A., CRUMBLISS A. Treatment of iron deficiency anemia: Are monomeric iron compounds suitable for parenteral administration? *J Lab Clin Med* 2000; 136(5): 371-378.

JACOBS P., WOOD L., BIRD A. Erythrocytes: Better tolerance of iron polymaltose complex compared with ferrous sulphate in the treatment of anaemia. *Hematology* 2000; 5:77-83.

JAKUBOWSKI W., BARTOSZ G. 2,7-dichlorofluorescein oxidation and reactive oxygen species: what does it measure? *Cell Biol Int* 2000; 24(10):757-760.

JOHNSON A., BECKER K., ZAGER R. Parenteral iron formulations differentially affect MCP-1, HO-1, and NGAL gene expression and renal responses to injury. *Am J Physiol Renal Physiol* 2010; 299(2): F426-435.

KAIHO S., MIZUNO K. Sensitive assay systems for detection of haemoglobin with 2,7-diaminofluorene: histochemistry and colorimetry for erythrodifferentiation. *Anal Biochem* 1985; 149: 117-120.

KAWATABA H., YANG R., HIRAMA T., VOUNG P., KAWANO S., GOMBART A., KOEFFLER H. Molecular cloning of transferrin receptor 2. *J Biol Chem* 1999; 274: 20826-20832.

KLAUSNER R., ROUAULT T., HARFORD J. Regulating the fate of mRNA. the control of cellular iron metabolism. *Cell* 1993; 72: 19-28.

KNUTSON M., WALTER P., AMES B., VITERI F. Both Iron Deficiency and Daily Iron Supplements Increase Lipid Peroxidation in Rats. *J Nutr* 2000; 130: 621-628.

MAKEY D., SEAL U. The detection of four molecular forms of human transferrin during the iron binding process. *Biochim Biophys Acta* 1976; 453(1): 250-256.

MUNOZ M., VILLAR I., GARCIA-ERCE J. An update on iron physiology. *World J Gastroenterol* 2009; 15(37): 4617-4626.

MURTHY S., VAKA S. Irontophoresis™: Transdermal Delivery of Iron by Iontophoresis. *J Pharm Sci* 2008; 98: 2670-2676.

NAKANO M., KAWANISHI Y., KAMOHARA S., UCHIDA Y., SHIOTA M., INATOMI Y., KOMORI T., MIYAZAWA K., GONDO K., YAMASAWA I. Oxidative DNA damage (8-Hydroxydeoxyguanosine) and body iron status: A study on 2507 healthy people. *Free Radic Biol Med* 2003; 35(7): 826-832.

NOUROOZ-ZADEH J., TAJADDINI-SARMADI J., WOLFF S. Measurement of plasma hydroperoxide concentrations by the ferrous oxidation-xylenol orange assay in conjunction with triphenylphosphine. *Anal Biochem* 1994; 220(2): 403-409.

PONKA P. Cellular iron metabolism. *Kidney Int Suppl* 1999; 69: 2-11.

PINERO D., LI N., CONNOR J., BEARD J. Variations in Dietary Iron Alter Brain Iron Metabolism in Developing Rats. *J Nutr* 2000; 130: 254-263.

PSCHYREMBEL *Klinisches Wörterbuch*, 259. Auflage. Verlag Gruyter, Berlin, 2002; 65-66, 420, 488-489.

SALONEN J., NYSSONEN K., KORPELA H., TUOMILEHTO J., SEPPANEN R., SALONEN R. High stored iron levels are associated with excess risk of myocardial infarction in eastern Finish men. *Circulation* 1992; 86: 803-811.

SHAYEGHI M., LATUNDE-DADA G., OAKHILL J., LAFTAH A, TAKEUCHI K., HALLIDAY N., KHAN Y., WARLEY A., MCCANN F., HIDER R., FRAZER D., ANDERSON G., VULPE C., SIMPSON R., MCKIE A. Identification of an Intestinal Heme Transporter. *Cell* 2005; 122(5):789-801.

STURM B., TERNES N., STEINKELLNER H., GOLDENBERG H., SCHEIBER-MOJDEHKAR B. Ferric Pyrophosphate: Biochemical characterisation and metabolic fate in HepG2 cells. *Arzneimittelforschung* 2010; 60 (7): 459-465.

STURM B., GOLDENBERG H., SCHEIBER-MOJDEHKAR B. Transient increase of the labile iron pool in HepG2 cells by intravenous iron preparations. *Eur J Biochem* 2003; 270: 3731-3738.

THERMO FISHER SIENTIFIC INC. Instructions – PeroXOquant™ Quantitative Peroxide Assay Kits. Pierce Biotechnology 2010.

THIELEMANS C., LENCLUD C., WENS R., COLLART F., DRATWA M. Critical role of iron overload in the increases susceptibility of haemodialysis patients to

bacterial infections: beneficial effects of desferrioxamine. *Nephrol Dial Transplant* 1989; 4: 883-887.

The National Kidney Foundation Disease Outcomes Quality Initiative (NKF KDOQI)[™]. Clinical Practice Guidelines for Chronic Kidney Disease: Evaluation, Classification, and Stratification. National Kidney Foundation, Inc. 2002; Internet: http://www.kidney.org/professionals/kdoqi/guidelines_ckd/toc.htm (Stand: Mai 2010)

UEHARA M., CHIBA H., MOGI H., SUZUKI K., GOTO S. Induction of increased phosphatidylcholine hydroperoxide by an iron-deficient diet in rats. *J Nutr Biochem* 1997; 8: 385-391.

VAN-DIJK P., JAGER K., DE-CHARRO F., COLLART F., CORNET R., DEKKER F. GRÖNHAGEN-RISKA C., KRAMAR R., LEIVESTAD T., SIMPSON K., BRIGGS J. Renal replacement therapy in Europe: the results of a collaborative effort by the ERA-EDTA registry and six national or regional registries. *Nephrol Dial Transplant* 2001; 16(6): 1120-1129.

YAMAZAKI I., PIETTE L. ESR Spin-trapping Studies on the Reaction of Fe²⁺ Ions with H₂O₂-reactive Species in Oxygen Toxicity in Biology. *J Biol Chem* 1990; 265(23): 13589-13594.

YOO J., MAENG H., SUN Y., KIM Y., PARK D., PARK T., LEE S., CHOI J. Oxidative Status in Iron-Deficiency Anemia. *J Clin Lab Anal* 2009; 23: 319-323.

ZAGER R. Parenteral Iron Compounds: Potent Oxidants but Mainstays of Anemia Management in Chronic Renal Disease. *Clin J Am Soc Nephrol* 2006; 1: 24-31.

ZAGER R., JOHNSON A., HANSON S., WASSE H. Parenteral iron formulations : a comparative toxicologic analysis and mechanisms of cell injury. *Am J Kidney Dis* 2002, 40(1): 90-103.

LEBENS LAUF

PERSÖNLICHE DATEN

Name	Kathrin Haider
Geburtsdatum	29. Dezember 1984
Geburtsort	Eisenstadt
Staatsbürgerschaft	Österreich

AUSBILDUNG

Ab Okt. 2004	Studium der Ernährungswissenschaften
1999-2004	Handelsakademie Frauenkirchen
1995-1999	Hauptschule Pamhagen
1991-1995	Volksschule Wallern

STUDIENBEGLEITENDE TÄTIGKEITEN

Seit Juli 2009	Novo Nordisk Pharma GmbH, Assistentin der Managerin für Qualität & Pharmakovigilanz
Juni 2010	Tutorin bei den Biochemischen Übungen für Ernährungswissenschaftler
Januar bis Juni 2009	Auslandssemester am Karolinska Institut, Stockholm Fach: Public Health Nutrition
Dezember 2008	Arbeitsgemeinschaft Klinische Ernährung, Praktikantin
Okt. 2006 bis Okt. 2008	Novo Nordisk Pharma GmbH, Studentische Aushilfskraft in der Abteilung „Klinische Forschung“
Aug. 2007 & Aug. 2008	Mars Austria OG, Firmensitz Bruck/Leitha Praktikantin im Bereich „Quality and Food Safety“
Juli bis Mitte Aug. 2006	Kagera Regional Hospital Bukoba, Tansania Volontär in der Pädiatrie und im Labor der Klinik