

**Aus der Klinik und Poliklinik für Chirurgie
der Universität Würzburg
Chirurgische Klinik I
Direktor: Dr. med. A. Thiede**

**Wirkung der Enantiomere der
 α - Liponsäure
auf die Widerstandsfähigkeit von
Erythrozytenkonzentraten
auf oxidativen Stress bei Kryokonservierung**

**Inaugural- Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Bayerischen Julius- Maximilians- Universität zu Würzburg
vorgelegt von
Sabine Kollmann
aus Augsburg**

Würzburg , April 2004

Referent: Prof. Dr. med. M. Böck

Korreferent: Priv.-Doz. Dr. med. M. Eigenthaler

Dekan: Prof. Dr. med. S. Silbernagl

Tag der mündlichen Prüfung: 22.10.2004

Die Promovendin ist Ärztin.

F. W.

in Dankbarkeit für alles,
was sie mich gelehrt hat

**Nicht das, was du nicht weißt
bringt Dich in Schwierigkeiten.
Das, was Du von Grund auf kennst
ist nicht so , wie Du denkst.**

M.Twain

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
2	MATERIAL UND METHODIK	4
2.1	Materialien	
2.1.1	Ausgangsmaterial	4
2.1.2	Chemikalien	4
2.1.3	Biochemische Testkits	5
2.2	Methodik	
2.2.1	Probenvorbereitung	6
2.2.2	Einfriervorgang	7
2.2.3	Lagerung	7
2.2.4	Auftauvorgang und Testvorbereitung	7
2.2.5	Prinzipien der biochemischen Tests	8
2.2.5.1	ATP	8
2.2.5.2	Lactat	9
2.2.5.3	Pyruvat	10
2.2.5.4	2,3-Diphosphoglycerat	11
2.2.5.5	Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase	13
2.2.5.6	Malondialdehyd	14
2.2.5.7	freies Hämoglobin	15
2.2.6	Statistische Auswertung	15
2.2.7	Technische Geräte	15
3	ERGEBNISSE	17
4	DISKUSSION	30
5	ZUSAMMENFASSUNG	41

6	ANHANG	43
6.1	Abkürzungen	43
7	LITERATURVERZEICHNIS	44

1 EINLEITUNG

In der Transfusionsmedizin sucht man ständig nach neuen Mitteln und Möglichkeiten, die Konservierung von Blut und Blutprodukten zu verbessern. Dazu gehört neben dem Versuch, die Lagerungsfähigkeit zu verlängern, um Erythrozytenkonzentrate nicht nach 42 Tagen verworfen zu müssen und verstärkt die Alternative „Eigenblutspende“ auszubauen, auch die Minimierung der Gefahr einer durch Transfusion bedingten Übertragung der verschiedensten Infektionen.

In der transfusionsmedizinischen Wissenschaft wird in den letzten Jahren immer intensiver nach Möglichkeiten gesucht, die Lagerungsdauer von Erythrozytenkonzentraten zu verlängern. Die Ursachen hierfür sind nicht nur im ökonomischen Bereich, sondern auch in der zunehmend propagierten Eigenbluttransfusion zu suchen. Als Gründe für dieses immer häufiger gewünschte Verfahren werden meist eine Reduktion der Infektionsgefährdung, sowie die immunologischen Nebenwirkungen der Fremdbluttransfusion, wie z.B. Bildung von erythrozytären oder thrombozytären Alloantikörpern (VAN DE WATERING et al. 2003, PENNER et al. 1994), oder die Entwicklung einer transfusionsassoziierten Lungeninsuffizienz angeführt. Aber auch die Vermeidung von immunsupprimierenden Effekten der Fremdbluttransfusion wie eine erhöhte postoperative Infektionsgefahr (ELSERAG 2002, MURPHY et al. 1991, TRIULZI et al. 1992, FERNANDEZ et al. 1992, MEZROW et al. 1992) oder eine gesteigerte Rezidivrate bei bestimmten Malignomen werden als Argumente für die Eigenbluttransfusion diskutiert. Eine Verlängerung der Lagerbarkeit von Eigenblutkonserven würde die Logistik der autologen Transfusion deutlich erleichtern.

Auch im Bereich der Notfallmedizin stößt man immer wieder an die Grenzen der Verfügbarkeit von ausreichenden Konserven. Aus diesem Grund sucht man nach Wegen, den Verbrauch an Blutkonserven zu reduzieren. Intraoperativ durch Drainage rückgewonnenes und retransfundiertes Blut zeigt immer noch weniger Qualitätsverlust als präoperativ gespendetes und unter den üblichen Bedingungen gelagertes Eigenblut (4 Wochen bei 4°C), gemessen am Gehalt an ATP und 2,3-DPG (GOMEZ et al. 1999).

In den letzten Jahren wurden zwar immer weitere Fortschritte bei der Lagerung von Flüssigblutkonserven gemacht. Durch die Zugabe von nutritiven Substanzen wie Purinen und Glucose (CHANUTIN et al. 1967, AKERBLOM et al. 1967, HARADIN et al. 1969) und die Wahl geeigneter Konservierungs- und auch Waschlösungen (AKERBLOM et al. 1968, WEATHERBEE et al. 1975, WALKER et al. 1990, MERYMAN et al. 1994), kann die von HEATON 1992 formulierte Forderung nach einer posttransfusionellen 24h-Überlebensrate

der Erythrozyten erreicht werden. Trotzdem ist die Dauer der Lagerungsfähigkeit von Erythrozytenkonzentraten limitiert.

Einsparung von homologen Konserven, Bereithaltung von Konzentraten seltener Blutgruppen und Vermeidung von allergischen Reaktionen sind nur kurz angesprochene weitere Aspekte, die einen möglichst sicheren und effizienten Umgang mit Blutkonserven für die Medizin unumgänglich machen.

Die Kryobiologie ist eine Wissenschaft, die vor über 50 Jahren entstanden ist und seither einen festen Platz in der Transfusionsmedizin einnimmt. Die Methode des Einfrierens von Blutkonserven wurde stetig weiterentwickelt und zeigt auf dem heutigen Stand der Forschung „vielversprechende Resultate“ (ROWE 2002). Die umfangreichen Forschungen auf diesem Gebiet weisen – grob gefasst – in zwei Richtungen: zum einen existieren zahlreiche Studien, die sich mit der Untersuchung von Gefrierschutzadditiven in Form von Konservierungslösungen befassen (SMITH 1950, KNORPP 1971, SCHEIWE et al. 1979, SPUTTEK et al. 1992.) und im Laufe der Entwicklung gute Ergebnisse in Bezug auf die 24-Überlebensrate posttransfusionem erbracht haben (HENRICH et al. 1991).

Der zweite Ansatz beschäftigt sich seit einigen Jahren mit den Erkenntnissen aus der Radikalforschung und der Wirkung von Antioxidantien auf die Unterstützung der erythrozyteneigenen antioxidativen Schutzmechanismen. Erfolgversprechende Ergebnisse zeigten Studien zu Qualitätsverbesserung bei der Lagerung von Blutflüssigkonserven unter Beigabe von bestimmten Antioxidantien wie z. B. Mangan, Zink oder Mannitol (KNIGHT et al. 1994), Vitamin C und Vitamin E sowie auch α -Liponsäure (GEISE et al. 1998). Da α -Liponsäure bereits als Therapeutikum u. a. bei der diabetischen Polyneuropathie erfolgreich eingesetzt wird (KAEHLER 1993, HAAK 1999, STROKOV 1999) und die Verträglichkeit für den menschlichen Organismus in zahlreichen klinischen Tests bestätigt wurde, bietet sie sich als Antioxidationsmittel für die vorliegende Fragestellung an. Auf den hemmenden Einfluss von DHLA – der reduzierten Form der α -Liponsäure – auf die Bildung von mitochondrialen Superoxidradikalen wurde 1995 von SCHONHEIT et al. hingewiesen. Zudem wurde in vorangegangenen Untersuchungen bereits auf die Wirksamkeit der α -Liponsäure und deren Enantiomere in der Anwendung bei Blutflüssigkonserven aufmerksam gemacht (BRAUN 1997, KERN 1997).

Idealerweise soll bei der Gewinnung, dem Einfrieren und Auftauen, sowie bei der Retransfusion von Erythrozytenkonzentraten ein möglichst geringer Verlust durch funktionelle

Schäden und Hämolyse, die sowohl durch die Lagerung, den Frier/ Tau-Prozess als auch durch posttransfusionelle intravasale Elektrolytverschiebung verursacht wird, auftreten.

Aus diesem Grund stellt sich in der vorliegenden Studie die Frage, ob eine Kombination aus Kryokonservierung und Zusatz von antioxidativ wirkenden Substanzen eine wesentliche Verbesserung in der Ausbeute funktionstüchtiger Erythrozyten mit sich bringt.

Zugrunde gelegt wurde eine bewährte Methode zur Kryokonservierung, welche von SPUTTEK und RAU 1992 beschrieben wurde. Die Zugabe der α -Liponsäure erfolgte in Form des R-Enantiomers und des Razemates. Beiden wird eine intrazelluläre Wirksamkeit zugesprochen (WOLFE 1989). KAGAN et al. (1992) bezeichneten die α -Liponsäure als „universales Antioxidant“ und PACKER et al. (1995) formulierten eine Liste von Merkmalen, die eine solche Substanz besitzen sollte:

- Spezifität bei der Reaktion mit freien Radikalen
- Fähigkeit, als Metallchelator zu wirken
- Fähigkeit, mit anderen Antioxidantien zu interagieren
- Fähigkeit auf die Expression von Genen Einfluß zu nehmen

Darüber hinaus werden noch Eigenschaften gefordert, die wichtig werden, wenn eine Substanz zur therapeutischen Anwendung kommen soll. Diese beinhalten sowohl Aufnahmemöglichkeit als auch Bioverfügbarkeit, Ansammlung in Zellen, Gewebe und Extrazellularräumen. Auch die Frage, ob eine Substanz membrangängig ist, membranständig, intra- oder extrazellulär wirken kann, bestimmt deren Einsatzmöglichkeiten in der Therapie. Diese Anforderungen werden von der α -Liponsäure in hohem Maße erfüllt (PACKER et. al. 1995).

Die Kombination der beiden beschriebenen Verfahren soll zeigen, ob eine verlängerte Haltbarkeit mit einer größeren Ausbeute an hochwertigen Erythrozyten erreicht werden kann. Geprüft wird dies anhand der Menge an überlebensfähiger Erythrozyten nach dem Frier/Tau-Prozess - also quantitativer Maßstäbe -, als auch qualitativer Kriterien, wie Veränderungen der intraerythrozytären Stoffwechselforgänge. Die Versuchsanordnung beinhaltet die Zugabe der α -Liponsäure in Form der Razemates und des R-Enantiomers vor der Kryokonservierung und die Verstärkung des oxidativen Stresses durch Zusatz eines Radikalbildners.

2 MATERIAL UND METHODIK

2.1 Materialien

Die folgenden Verbrauchsmaterialien und Chemikalien wurden in der Arbeit verwendet:

2.1.1 Ausgangsmaterial

Als Ausgangsmaterial dienten humane Erythrozytenkonzentrate, welche aus Blutkonserven von 12 gesunden, anonymen, freiwilligen Spendern stammten und im Helmholtz Institut für biochemische Technik an der RWTH Aachen folgendermaßen aufbereitet wurden: unter Zusatz von HAES 23,3% (HAES 200 000/0.62) Leopold Pharma, Graz, Österreich), kryokonservierte man die Konzentrate in Portionen zu 108 ml bei einer Temperatur von unter -130°C (Sputtek und Rau 1992) und lagerte sie so bis zur weiteren Verwendung. Das vorher abzentrifugierte Plasma wurde bis zur Wiederaufgabe in Form von FFP bei -70°C gelagert.

2.1.2 Chemikalien

α -Liponsäure, Razemat und R-Enantiomer (Asta Medica AG, Frankfurt a.M.)

Adenosin-5'-Triphosphat Nr. A5394 100mg

Aqua. dest.

2,6-di-tert. Butyl-4-methylphenol (ALDRICH D., 4-740-4)

Ethanol p. a. 100 %

Fluorid/EDTA (Boehringer Mannheim)

HCl (1,0 mol/l)

Kaliumcarbonatlösung 2,5 mol/l

NaCl-Lösung 0,9%, phosphatgepuffert (Sigma Diagnostics, Deisenhofen)

PBS (Sigma Diagnostics, Deisenhofen)

Perchlorsäure 0,6 mol/l (Boehringer Mannheim)

Phenacimethosulfat (0,04 mM) (Sigma Diagnostics, Deisenhofen)

TBA (0,375 %) (ALDRICH D., 11, 350-6)

TCA (20 %)

Tris- Puffer (85 mg in 5 ml Aqua dest.)

2.1.3 Biochemische Testkits

Mercko-Test Hämoglobin (Merck, Darmstadt)

Testkit MPR 1 Pyruvat (Fa. Boehringer Mannheim) 1993

Testkit MPR 3 Lactat (Fa. Boehringer Mannheim)

Test- Combination Glucose-6-phosphate-Dehydrogenase EC 1.1.1.49

(Boehringer Mannheim Diagnostica) 1984

UV- Test zur Bestimmung von 2,3-DPG in Blut

(Boehringer Mannheim Biochemica)

Testkit ATP Nr. A5394 (Sigma Diagnostics, St. Louis) 1989

2.2 Methodik

2.2.1 Probenvorbereitung

Das zu untersuchende Probenmaterial stammte von 12 humanen, männlichen, erwachsenen anonymen Spendern und wurde nach einem im Helmholtz Institut für Biomedizinische Technik der RWTH Aachen von SPUTTEK u. RAU 1992 entwickelten Verfahren folgendermaßen präpariert:

Das entnommene Blut wurde sofort durch Zentrifugieren vom Plasma abgetrennt und dieses bis zur Testdurchführung bei -70°C gelagert. Daran schloss sich der Waschvorgang an, welcher insgesamt viermal wiederholt wurde. Als Waschlösung diente eine aus 200g PBS-Lösung (Serva, Heidelberg), 40g Sorbit (Merck), 0,33g KCl und 760g aqua ad inject., (Delta Pharma, Pfullingen) hergestellte Elektrolytlösung mit pH-Wert 7,2. Bei einem resultierenden Hämatokrit zwischen 78% und 82% versetzte man die Erythrozytenkonzentrate mit HAES-Lösung (245g HAES 200 0,62 und 755g aqua ad inject.) gleichen Volumens als Gefrierschutzadditiv, wodurch ein Hämatokrit von ca. 40% eingestellt wurde (SPUTTEK u. RAU, 1992).

Vor dem Verschließen wurde jedes Konzentrat auf drei Portionen verteilt, wovon eine die Kontrollgruppe darstellte, eine Portion mit dem Razemat der α -Liponsäure (ASTA Medica AG, Frankfurt a. M.), und die dritte mit dem R-Enantiomer beimpft wurde. Die α -Liponsäure wurde in 8 von 12 Versuchen in einer Konzentration von $100\ \mu\text{M}$ und in 4 von 12 Versuchen in einer Konzentration von $500\ \mu\text{M}$ beigegeben und dazu in jeweils 10ml PBS (SIGMA DIAGNOSTICS, Deisenhofen) gelöst. Den Kontrollportionen wurde nur PBS 10ml zugefügt. Im Anschluss daran wurde das Konzentrat in Spezialbeutel (Hemofreeze bags DF 1000, Fa. Gambro, München-Martinsried) zu 108 ml abgefüllt, gut entlüftet und mit einem Spezialschweißgerät (SCD 312, DuPont, Newton USA) verschlossen. Es erfolgte eine Inkubationsphase von 2h bei 25°C (= Raumtemperatur).

2.2.2 Einfriervorgang

Die Beutel wurden in einen Frierkontainer aus großflächig gelochtem Metall (einer Einrichtung der Abteilung für Experimentelle Chirurgie, Universität Würzburg) gelegt, welcher für eine Gefriergutschichtdicke von 3mm bei gleichmäßiger Temperatur-Verteilung sorgte und in flüssigem N₂ eingefroren.

2.2.3 Lagerung

Die Lagerung erfolgte in der Gasphase über flüssigem N₂ bei ca. 140°C, da bei diesen Temperaturen die Lagerungsdauer eine zu vernachlässigende Rolle spielt.

2.2.4 Auftauvorgang und Testvorbereitung

Zur Testdurchführung wurden die Beutel in einen Aluminium- Container im Schüttelwasserbad (GFL, Hannover- Vinnhorst, Typ 1083) für 45 sec. bei einer Temperatur von 48°C gleichmäßig aufgetaut (SPUTTEK u. RAU 1992). Die mittlere Erwärmungsrate betrug somit ca. 220°C/min. Danach wurden die Beutel sofort dem Wasserbad entnommen. Die Bestimmung des freien Hämoglobins erfolgte auf dieser Stufe der Probenvorbereitung. Die Proben wurden zu gleichen Teilen auf 6 Cups zu jeweils ca. 30ml verteilt, mit PBS des pH-Wertes 7,4 auf 50ml aufgefüllt, aufgeschwemmt und anschließend bei 1300G für 20min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde insgesamt dreimal wiederholt, um die HAES-Rückstände möglichst vollständig zu entfernen, und der Überstand jedes Mal abpipettiert. In der Folge wurden die gewaschenen Proben mit dem zuvor abgetrennten autologen Plasma auf einen Hkt von 45% eingestellt. Dieser wurde nach 10min Zentrifugation (Biofuge A, Heraeus Sepatech, Hanau) bei 12 000 rpm abgelesen. Daraufhin wurde noch einmal gedrittelt, mit jeweils 0,04µmol des Radikalbildners Phenazinmethosulfat versetzt, und jede Probe 5min, z. T. 30min und 60min bei 37°C inkubiert

Je nach Versuchsanordnung wurden die so präparierten Cups auf Eiswasser gestellt und daraus folgende biochemische Parameter bestimmt:

1. Adenosin-tri-Phosphat
2. Lactat
3. Pyruvat
4. 2,3-Diphosphoglycerat (2,3- DPG)
5. Glucose- 6- Phosphat Dehydrogenase (G6P-DH)
6. Malondialdehyd (MDA)
7. freies Hämoglobin

2.2.5 Prinzipien der biochemischen Tests

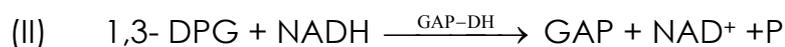
Aufgrund des Fehlens von Mitochondrien steht den Erythrozyten zur Energiegewinnung nur die anaerobe Glycolyse offen. Über den Pentosephosphatweg wird das Redoxäquivalent NADPH produziert. Daher wurden als Parameter für die Glycolyse die Konzentrationen an Pyruvat, Lactat, 2,3-Diphosphoglycerat, Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase und ATP gewählt.

Malondialdehyd repräsentiert den Grad an Unversehrtheit der Zellmembranen, da es als Maß für eine gesteigerte Lipidperoxidation gilt (KNIGHT et al 1992).

2.2.5.1 ATP

Für die Messung des ATP-Gehaltes wurde ein Test von SIGMA DIAGNOSTICS verwendet, der auf der enzymatischen Spaltung von ATP und 3-Phosphoglycerat zu ADP und 1,3-Bisphosphoglycerat beruht (ADAM 1963).

Prinzip:



Das beteiligte Enzym ist die Phosphoglyceratkinase. In einer gekoppelten Reaktion wird NADH zu NAD^+ oxidiert und das in (I) entstehende 1,3- Diphosphoglycerat zu Glyceraldehyd-3-Phosphat reduziert. Die Extinktionsabnahme entspricht dabei der

abfallenden Menge an NADH und diese ist der ATP-Konzentration direkt proportional. Die Normwerte werden mit 38-62 $\mu\text{mol/dl}$ Blut und 3,65-4,45 $\mu\text{mol/g}$ Hämoglobin beziffert.

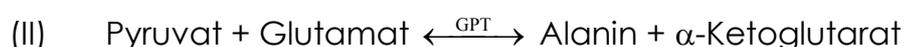
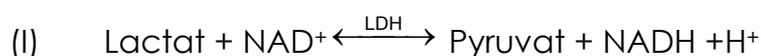
In einem Reagenzglas werden 1,0ml des wie unter 2.2.4 beschrieben vorbereiteten Erythrozytenkonzentrat mit 1,0ml TCA vermischt und 5min in ein Eis- Wasserbad gestellt. Danach wird 10min bei 3000 U/min bei 0°C zentrifugiert. Der Überstand wird in der Messung eingesetzt. Dafür werden in ein NADH- Gefäß 1,0ml PGA- gepufferte Lösung aus 3-PG (18 mmol/l), Magnesiumsalzen und EDTA (enthalten im Testkit mit der Nummer 366-1) und 1,5ml Aqua dest. pipettiert. Diesem Ansatz werden 0,5ml des Probenüberstandes beigegeben und in einer Küvette (Schichtdicke 1cm) die Extinktion E_1 bei 334 nm Wellenlänge gegen Aqua dest. gemessen. Parallel wird ein Standard gemessen, wobei dem Testansatz hierfür statt des Überstandes 0,5ml einer Standardlösung zugefügt wird, welche Adenosin-5'-triphosphat in einer definierten Konzentration enthält (SIGMA DIAGNOSTICS). Nach der Messung von E_1 werden Probe und Standard mit jeweils 13,4 μl der Enzymmischung GAPD/PGK zugefügt und gut gemischt. Gemäß o.a. Reaktion wird der Extinktionsabfall kontinuierlich bis zum Erreichen seines Minimums verfolgt und dieser Wert als E_2 zur Berechnung herangezogen.

2.2.5.2 Lactat

Es wurde ein Testkit von Boehringer Mannheim verwendet, der die Lactat-Konzentration modifiziert nach der von F. NOLL (1974) beschriebenen Methode misst.

Sie basiert auf der enzymatischen Umsetzung von Lactat zu Pyruvat durch die Lactat-Dehydrogenase, gekoppelt an eine zweite Reaktion in der das im ersten Schritt entstandene Pyruvat durch Umwandlung mit einer Glutamat-Pyruvat-Transaminase in L-Alanin entfernt wird, so dass eine quantitative Bestimmung des Lactats möglich wird.

Prinzip:



Das durch die Dehydrierung (I) entstandene NADH, dessen Extinktion bei 365 nm gemessen wird, ist direkt proportional zur Lactat- Konzentration. Normwert im Plasma: 5,7-22 mg/dl, bzw. 0,63-2,44 mmol/l (KÜHNLE et al., 1977).

Das resuspendierte Erythrozytenkonzentrat wird bei 3000U/ min für 5min zentrifugiert und das Plasma dann abdekantiert. Dieses muss vor der Weiterverwendung mit Perchlorsäure (0,6 mol/l) im Verhältnis 1:2 enteiweißt werden. In ein Reagenzglas werden 0,2ml Plasma und 10ml einer Reagenzlösung, bestehend aus 1 Teil NAD-Lyophilisat (4,6 mmol/l) und 4 Teilen L- Glutamat (63 mmol/l, dient zugleich als Puffer), pipettiert und gut gemischt. Dieses Gemisch wird in zwei Portionen geteilt, von denen eine als Probe weiterverwendet wird, die andere als Probenleerwert. Zu 5 ml Probe werden 0,05ml einer LDH-Suspension (> 102 U/ml) gegeben und gut vermischt, dem Probenleerwert wird 0,05ml Ammoniumsulfat (3,2 mol/l) beigemischt. Die Extinktionen von E_{PL} und E_P werden nach 10min Reaktionszeit bei 25°C unmittelbar nacheinander in derselben Küvette (Schichtdicke 1cm) gemessen.

Bei einer Messwellenlänge von 365 nm errechnet sich die Lactat- Konzentration in mmol/l folgendermaßen:

$$C_{\text{lactat}} = \Delta E \times 15,3$$

$$\Delta E = E_P - E_{PL}$$

2.2.5.3 Pyruvat

Die Testmethode basiert auf der enzymatischen Überführung von Pyruvat in Lactat, wobei NADH in stöchiometrischen Mengen oxidiert wird (CZOK et al. 1974)



Pyruvat wird durch die Lactatdehydrogenase zu Lactat unter Oxidation von NADH umgewandelt. Gemessen wird die Extinktion des NADH, welche direkt proportional zur enthaltenen Konzentration an Pyruvat ist. Verringert sich also die Extinktion des NADH, so bedeutet dies eine sinkende Pyruvatkonzentration in der Probe.

Der Normwert für Pyruvat im venösen Nativblut liegt zwischen 0,36-0,59mg/100ml oder 41-67µmol/l.

Nach der unter 2.2.4 beschriebenen Vorbereitung wurde die Probe sofort enteweißt. Dazu wurden je 3ml Blut und 3ml eiskalte Perchlorsäure (0,7 mol/l) gut vermischt und anschließend bei 3000 U/min für 10min bei 0°C zentrifugiert. Von dem Überstand wurden 2ml abgenommen, mit 1ml Phosphatlösung gemischt und für 15min im Eiswasserbad belassen, danach filtriert. So vorbereitet, hielt sich das Filtrat ca. 24h.

Zur Messung wurde das Filtrat zunächst auf 25°C erwärmt, 1ml davon in einer Küvette (1cm Schichtdicke) mit 0,1ml einer 2,2 molaren NADH-Lösung versetzt und mit einem Plastikspatel gut verrührt. Anschließend folgte die erste Messung der Extinktions-abnahme bei 365 nm gegen Luft.

Danach wurden 0,01ml LDH (≥ 900 U/ml) in die Küvette pipettiert, gut gemischt und 5min abgewartet, um den Stillstand der Reaktion abzuwarten und nun der zweite Extinktionswert ebenfalls bei 365 nm gemessen.

Die Pyruvatkonzentration errechnet sich wie folgt:

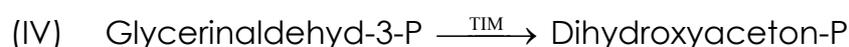
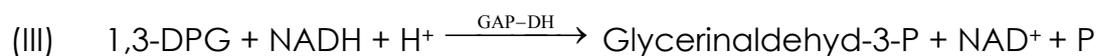
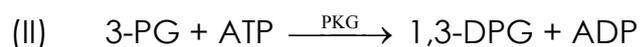
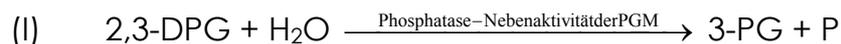
$$C_{\text{pyruvat}} = \frac{\Delta E \times 905}{\Delta E = (E_1 - E_2)}$$

Hieraus ergibt sich die Konzentration an Pyruvat in $\mu\text{mol/l}$ Blut.

2.2.5.4 2,3-Diphosphoglycerat

Der Test von Boehringer Mannheim beruht auf der stöchiometrischen Umsetzung von 2,3-DPG zu Phosphoglycerat durch eine Nebenreaktion der Phosphoglycerat- Mutase (PGM) (MICHAL 1974).

Prinzip:



Die in (I) beteiligte PGM wird durch Glycolat-2-Phosphat zu der Nebenaktivität aktiviert. Diese Reaktion kann sowohl die Bildung von 2-PG als auch 3-PG katalysieren. In der oben dargestellten Reaktionskaskade wird Phosphoglycerat in Glycerin-3-Phosphat umgewandelt. Dabei werden pro mol 2,3-DPG 2 mol NADH oxidiert (MICHAL 1974). Die Reaktionen (II) - (V) werden durchgeführt, um störende Substrate zu eliminieren. Reaktion (I) startet erst nach Ablauf der Reaktionen (II) - (V), da die Konzentration an PGM zu niedrig ist, um 2,3-DPG durch die o.e. Nebenaktivität umzuwandeln (MICHAL 1974). Die Menge an entstehendem NADH wird photometrisch bei einer Wellenlänge von 365 nm gemessen.

Das wie unter 2.2.4 beschrieben vorbereitete Erythrozytenkonzentrat muss sofort enteiweißt werden. 2,5ml eiskühlte Perchlorsäure (0,6 mol/l) werden mit 0,5ml Erythrozytenkonzentrat gemischt und bei 0°C für 10min bei 3000 U/min zentrifugiert. Vom Überstand werden 2,0ml mit 0,25ml Kaliumcarbonat neutralisiert, mindestens 30 min ins Eis-Wasserbad gestellt und danach erneut bei 0°C zentrifugiert. In eine Küvette (Schichtdicke 1cm) werden 0,1ml des Überstandes, sowie 2,0ml Triathanolamin-Puffer (48 mmol/l, pH 7,6 mit EDTA (5,2 mmol/l) und MgCl₂ (5,3 mmol/l)), 0,5ml einer ATP-NADH-Lösung (ATP 40 mmol/l, NADH 9,6 mmol/l) und 0,05ml eines Enzym-Lyophilisates (PGM 14 × 10³ U/l, GAP-DH 14 × 10³ U/l, PGK 94 × 10⁴ U/l, TIM 50 × 10⁴ U/l, GDH 13 × 10⁴ U/l) pipettiert, gut gemischt und die Reaktion bei 25°C abgewartet. Entsprechend wird ein Leerwert angesetzt, bei dem statt des Überstandes 0,1ml Aqua dest. eingesetzt wird. Nach 5min wird die erste Extinktionsmessung vorgenommen, und anschließend 0,02 ml PGM (88 × 10⁴ U/l), sowie 0,02ml Glycolat-2-Phosphat (48 mmol/l) sowohl zur Probe als auch zum Leerwert beigegeben, gemischt und nach 25min der zweite Extinktionswert gemessen. Es gilt folgende Formel für die Konzentration an 2,3-DPG :

$$C_{2,3\text{-DPG}} [\text{g/l Blut}] = \frac{V \times \text{MG} \times F}{\epsilon \times d \times v \times 1000 \times 2} \times \Delta E$$

wobei:

V = Testvolumen [ml]

v = Probevolumen [ml]

d = Schichtdicke [cm]

ϵ = Extinktionskoeffizient von NADH bei Hg 365 nm = 3,4 [l × mmol⁻¹ × cm⁻¹]

MG = Molekulargewicht von 2,3- DPG

F = Verdünnungsfaktor für Blut = 6,582

$\Delta E = (E_1 - E_2)_{\text{Probe}} - (E_1 - E_2)_{\text{Leerwert}}$

Für die 2,3-DPG-Konzentration bezogen auf das Erythrozytenvolumen in [mmol/l] gilt:

$$C_{2,3\text{-DPG}} [\text{mmol/l}] = 21,68 \times \Delta E_{365 \text{ nm}} \times 100/\text{Hkt}$$

$$C_{\text{ATP}} [\mu\text{mol/g}] = \Delta E = E_1 - E_2$$

$$C_{\text{ATP}} [\mu\text{mol/dl}] = \Delta E \times 196,76$$

2.2.5.5 Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase

Der Gehalt an G6P-DH wurde ebenfalls mit einem Testkit der Firma Boehringer Mannheim bestimmt. Nach Kornberg A. (LÖHR et al. 1974) wird hierbei Glucose-6-Phosphat zu 6-Phosphogluconat dehydriert und die dabei entstehende Menge NADPH photometrisch aus der Extinktionszunahme bei 356 nm gemessen.

Prinzip:



Im Serum findet sich praktisch keine Aktivität an G6P-DH, so daß der Normwert für die Aktivität pro Erythrozytenzahl angegeben wird: $131 \pm 13 \text{ mU}/10^9$ Erythrozyten. Da der Test jedoch die Aktivität der G6P-DH pro ml Blut bestimmt, muß man die bestimmten Werte durch die Erythrozytenzahl pro ml (RBC) dividieren und mit 10^9 multiplizieren, um die Aktivität pro Erythrozyt zu erhalten (LÖHR et al. 1970).

0.2ml des vorbereiteten Erythrozytenkonzentrates werden dreimal mit 2ml 0,9%iger NaCl-Lösung aufgeschwemmt und jeweils 10min bei 3000 U/min zentrifugiert, der Überstand jedes Mal abpipettiert, um ein hämolysefreies Konzentrat zu erhalten. Dann werden die gewaschenen Erythrozyten in 0,5ml Digitonin 0,02% suspendiert und 15min ins Eis-

Wasserbad gestellt. Danach erfolgt eine weitere Zentrifugation bei 0°C. 3,0ml EDTA-Puffer (5 mmol/l; pH 7,6), 0,1ml NADP-Lösung (10 mmol/l) und 0,05ml des Überstandes werden in ein Reagenzglas pipettiert, und bei 25°C 5min in einem Wasserbad inkubiert. Nach Zugabe von 0,05ml G6P-Natrium (31 mmol/l) als Substrat und Umfüllen in eine Küvette (Schichtdicke 1cm) erfolgt die Extinktionsmessung bei 365 nm im Abstand von 1min, 2min und 4min.

Berechnung:

$$A_{G6P-DH} [\text{mU/ ml}] = \Delta E / \text{min} \times 54857$$

$$\Delta E / \text{min} = [(E_1 - E_0) + (E_2 + E_1) + (E_3 - E_2)] : 3$$

$$A_{G6P-DH} [\text{mU/ } 10^9 \text{ Erys}] = A_{G6P-DH} (\text{mU/ ml}) : \text{RBC} \times 10^9$$

2.2.5.6 Malondialdehyd

Die Konzentration an Malondialdehyd wird nach der Methode von BUEGE und AUST (1978) bestimmt. Dieser Test weist Substanzen nach, die mit Thiobarbitur-Säure reagieren, zu welchen auch das MDA gehört. Dazu wurden 500µl Plasma von dem unter 2.2.4 beschrieben vorbereiteten Erythrozytenkonzentrat abgenommen und mit 10µl butyliertem Alkohol in einem Eppendorf-Cup gemischt. Zur Messung wurden 1000µl eines äquipartiellen Gemisches aus TBA (0,375 %), HCl (1,0 mol/l) und TCA (20 %) zugefügt, verschüttelt, und exakt 25min bei 95°C gekocht. Danach wurden die Cups in Eiswasser abgekühlt, bei 14 000 rpm 5min zentrifugiert und die Extinktion des Überstandes in einer Küvette (Schichtdicke 1cm) bei einer Wellenlänge von 536 nm gemessen. Als Leerwert diente das TBA/HCl/TBA-Gemisch. Der Normwert von MDA wird mit 0,176-0,563 µmol/l angegeben.

Berechnung:

$$C_{MDA} [\mu\text{mol/l}] = 3 \times \frac{E}{0,156}$$

2.2.5.7 freies Hb

Vor dem Waschen und der Inkubation mit PMS wurde aus jedem Probenbeutel das freie Hämoglobins bestimmt. Modifiziert nach RICHTERICH (1971) wird der Test (Merck) zur quantitativen Messung des freien Hämoglobin durchgeführt. Dabei wird Hämoglobin und alle Derivate zu Hämoglobin-Cyanid umgewandelt und dann die Extinktion bei 546 nm und 680 nm abgelesen.

Dazu werden 0,5ml durch 10-minütiges Zentrifugieren bei 3000 U/min Überstand und 0,5ml Cyanidlösung in eine Küvette (Schichtdicke 1cm) pipettiert und verrührt. Nach 5min Reaktionszeit werden die Extinktionen gemessen.

Die Berechnung erfolgt nach folgender Formel:

$$C_{\text{freies Hb}} [\text{mg/dl}] = (E_{546 \text{ nm}} - E_{680 \text{ nm}}) \times 284$$

$$C_{\text{freies Hb}} [\%] = \frac{(100 - Hk) \times \text{freies Hb} [\text{g}]}{\text{Gesamt-Hb} [\text{g}]}$$

2.2.6 Statistische Auswertung

Die Messdaten wurden mit dem Vorzeichentest nach Wilcoxon (und dem U-Test nach Mann-Whitney) statistisch ausgewertet. Das Signifikanzniveau wurde bei $p < 0,05$ festgelegt. Die Hoch/Tiefwerte der Graphen repräsentieren die Standardabweichung ausgehend von einer Grundgesamtheit.

2.2.7 Technische Geräte

Aluminiumkäfig, großflächig gelocht (Spezialanfertigung)

Biofuge A-Zentrifuge (Fa. Heraeus Sepatech, Hanau)

Cell Counter, Modell 8701 (mölab, Hilden)

Flammenphotometer FCM 6341 (Eppendorf, Hamburg)

Mikrohämatokritröhrchen, NH₄-heparinisiert (Brand, Wertheim)

Mikroliter Zentrifuge (Hettich, Tuttlingen)

Plastikcup aus Polypropylen, 50 ml (Greiner, Frickenhausen)

Rotixa/ KS-Zentrifuge (Hettich, Tuttlingen)

Rotixa/ RP-Zentrifuge (Hettich, Tuttlingen)

Schüttelwasserbad (GFL-Gesellschaft für Labortechnik, Hannover/Vinhorst)

Spectralphotometer Ultrospec III (Pharmacia LKB, Freiburg)

3 Ergebnisse

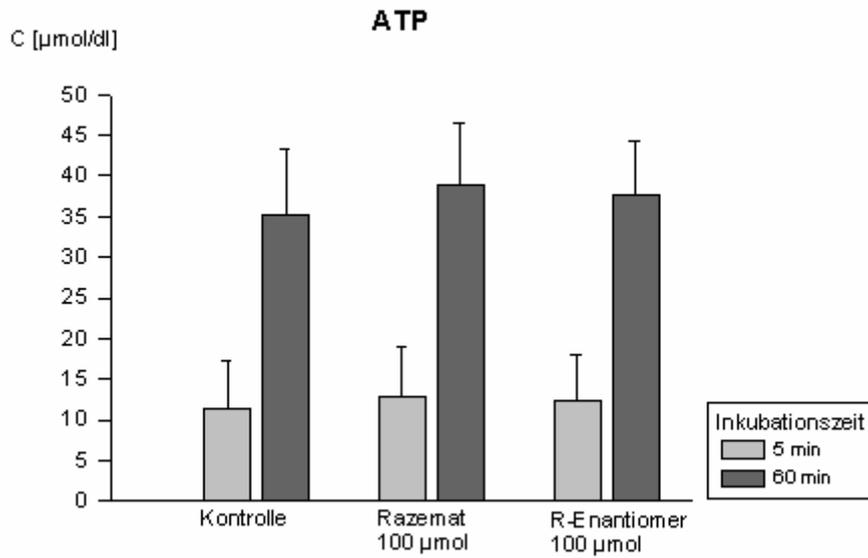
3.1 Effekte auf den Metabolismus

3.1.1 ATP

Bei den mit 100 μ mol α -Liponsäure versetzten Konserven findet sich eine erhöhte Konzentration an ATP sowohl in der Razemat-Gruppe, als auch in der R-Enantiomer-Gruppe gegenüber der Kontrollgruppe, unabhängig von der Inkubationszeit mit PMS. Die Differenz war signifikant ($p < 0,05$) in der 5min-Gruppe beim Vergleich Razemat gegen Kontrolle, nicht jedoch bei R-Enantiomer vs. Kontrolle und Razemat vs. R-Enantiomer. Signifikant ($p < 0,001$) war auch der Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und der Razemat-Gruppe bei 60-minütiger Inkubationszeit mit Phenazinmethosulfat.

Zu dem selben Ergebnis führte die Beigabe von 500 μ mol α -Liponsäure. Auch hier zeigte sich eine erhöhte ATP-Konzentration in den mit dem Razemat beimpften Proben gegenüber der Kontrolle und in geringerem Maß gegenüber der R-Enantiomer-Gruppe. Nach 5-minütiger Inkubation waren die ATP-Werte bei Behandlung mit α -Liponsäure nur wenig höher als ohne Zusatz. Nach 60-minütiger Inkubation waren die ATP-Werte in allen drei Gruppen angestiegen, signifikant erhöht war nur die Konzentration bei der mit dem Razemat beimpften Probe im Vergleich zur Kontrollgruppe

a)



b)

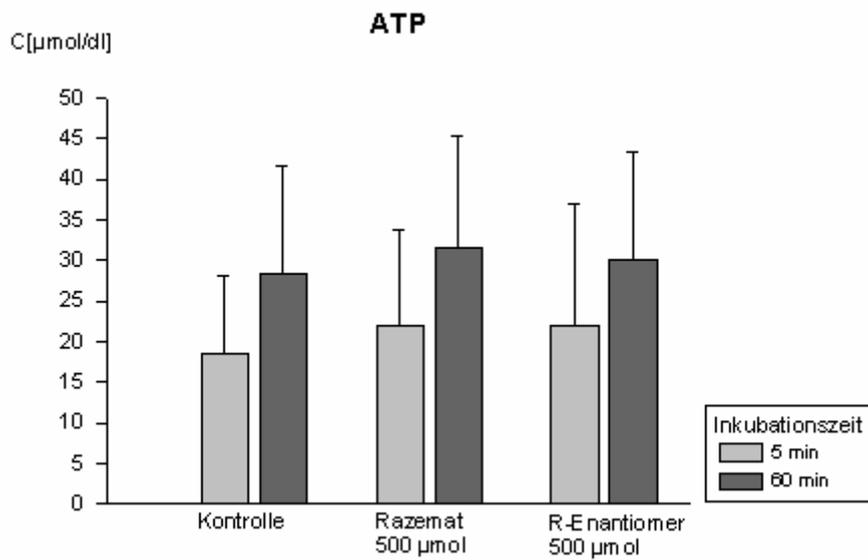


Abb. 1 : Vergleich der ATP-Konzentration bei Zusatz von a) 100μmol und b) 500μmol Razemat und R-Enantiomer der α -Liponsäure in Abhängigkeit von der Inkubationszeit mit dem Radikalbildner PMS. n = 11.

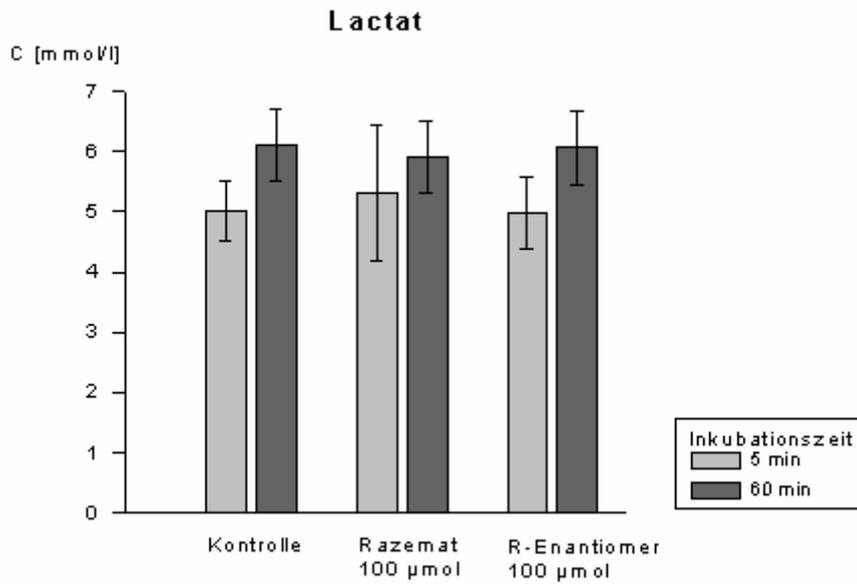
3.1.2 Lactat

Unabhängig von der Inkubationsdauer und der Menge an zugegebener α -Liponsäure stieg die Lactatkonzentration bei allen Messungen an.

Die Ausgangswerte nach 5 Minuten Inkubation mit PMS waren in den mit 100 μ mol beimpften Proben von vorneherein um 25% bei der Kontrollgruppe, 33% beim Razemat und 29% beim R-Enantiomer höher, als in den mit 500 μ mol behandelten Proben, wobei ein Vergleich bei den nur sehr wenigen auswertbaren Proben ($n =$) fraglich bleibt. Die Lactatwerte stiegen in den 60 Minuten inkubierten Konserven um ca. 10% in der Razemat-Gruppe und jeweils um 18% in Kontroll- und R-Enantiomergruppe im Vergleich zu den 5 Minuten inkubierten Proben, wobei die Unterschiede signifikant waren.

In den mit 500 μ mol präparierten Proben unterschieden sich die Lactatkonzentrationen bei 5-minütiger Inkubation nicht wesentlich und auch nach 60 Minuten war der Anstieg bei allen Gruppen nicht signifikant voneinander zu unterscheiden. Insgesamt war in diesen Proben ein tendenziell geringerer Anstieg der Lactatkonzentration zu verzeichnen.

a)



b)

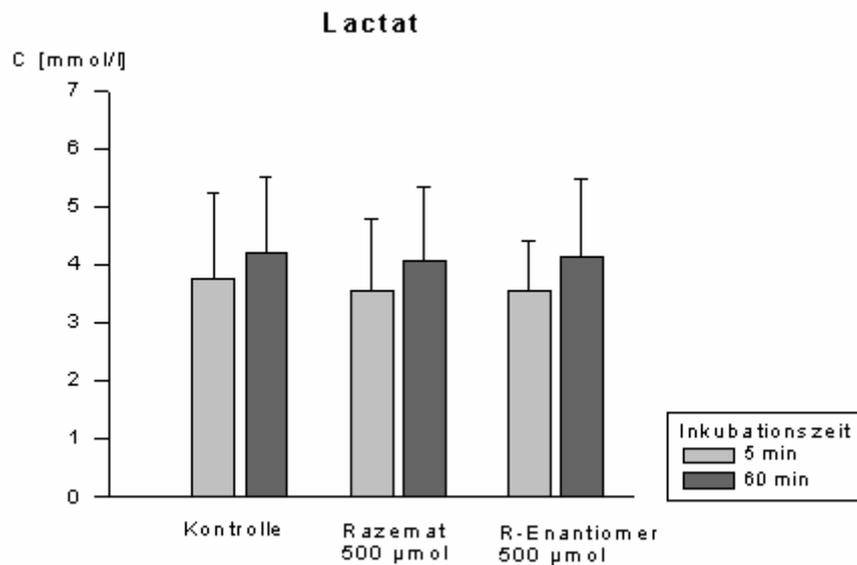


Abb. 2 a) und b): Vergleich der Lactat-Konzentration bei Zusatz von a) 100µmol und b) 500µmol Razemat und R-Enantiomer der α -Liponsäure in Abhängigkeit von der Inkubationszeit mit dem Radikalbildner PMS. n = 12

Die größte Differenz findet sich bei der Kontrolle der 100µmol-Konserven, die geringste in den mit 100µmol Razemat präparierten Proben.

Insgesamt niedrigere Ausgangswerte zeigen die mit 500 µmol α -Liponsäure behandelten Konserven, wobei die kleinste Differenz ebenfalls in der Razemat-Probe zu finden ist.

3.1.3 Pyruvat

Die Ausgangsmittelwerte unterschieden sich bei der Kontroll- und der R-Enantiomer-Gruppe nur geringfügig, während bei der Razemat-Gruppe ein um 23% niedrigerer Wert als in der unbehandelten Kontrollgruppe erhalten wurde.

Übte man auf die Kontrollprobe oxidativen Stress aus, so fiel der Pyruvatwert nach 60 Minuten Inkubationszeit mit PMS auf 76% des 5-Minuten-Wertes. Dies geschah auch bei der mit 100 μmol behandelten R-Enantiomer-Gruppe, wobei sich hier die Konzentration um 35% verringerte.

Anders verhielt es sich bei der mit dem Razemat beimpften Probe, bei der nach 60 Minuten Inkubation mit PMS ein geringfügiger Anstieg um 8% der Pyruvatkonzentration zu verzeichnen war. Angesichts einer weiten Fehlerstreuung lassen sich hier lediglich Tendenzen zeigen.

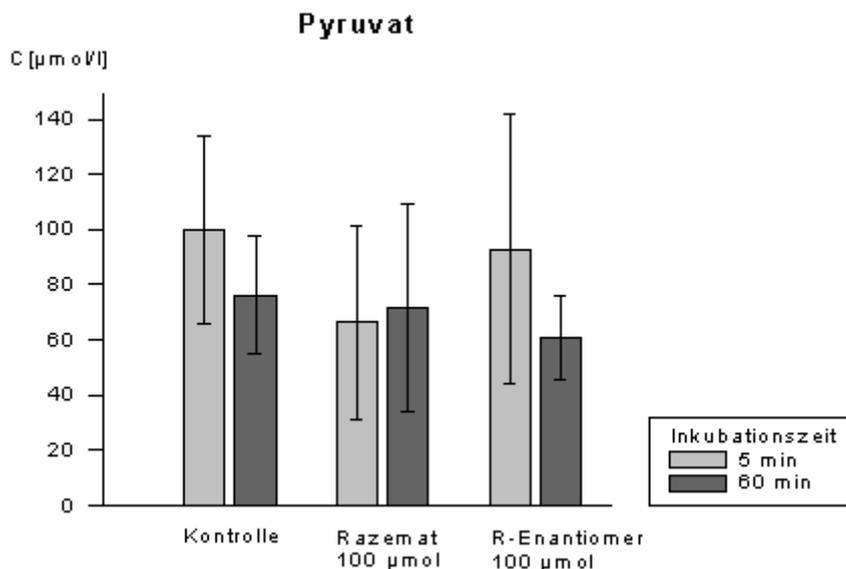


Abb. 3 : Vergleich der Pyruvat-Konzentration bei Zusatz von 100 μmol Razemat und R-Enantiomer der α -Liponsäure in Abhängigkeit von der Inkubationszeit mit dem Radikalbildner PMS. n = 5.

Die höchsten Werte liegen in der 5 Minuten Kontrollgruppe, diese sinken aber nach 60 Minuten deutlich ab. Bei 5 Minuten Inkubation liegen die Werte der Razemat-Gruppe am niedrigsten, steigen aber nach 60 min an. Bei den mit dem R-Enantiomer behandelten Konserven liegen die 5-Minutenwerte ebenfalls höher, als die 60-Minutenwerte.

3.1.4 2,3-Diphosphoglycerat

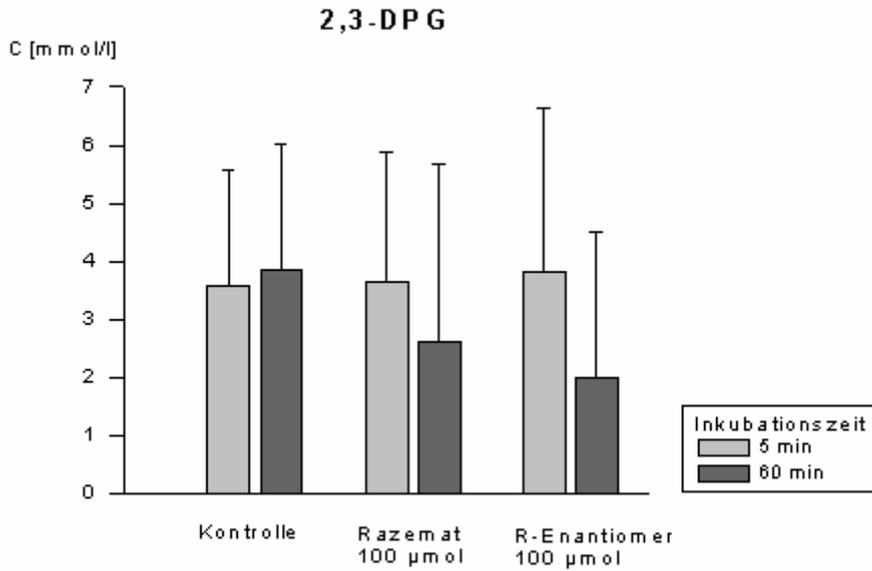
Den größten Gehalt an 2,3-DPG zeigten bei 5 Minuten Inkubation mit PMS die mit 100 μ mol R-Enantiomer behandelten Proben und die 5 Minuten-Kontrollgruppe.

Nach 60 Minuten Inkubation mit PMS fielen in den mit 100 μ mol behandelten Proben der 2,3-DPG-Spiegel sowohl der Razemat-Gruppe, als auch der R-Enantiomer-Gruppe, bei letzterer jedoch noch stärker. In keinem Fall waren die Unterschiede signifikant.

In den mit 500 μ mol versetzten Konserven zeigte es sich, daß bei 5-minütiger Inkubation mit dem Radikalbildner der Kontrollwert am höchsten ausfiel, wohingegen der Razematwert um 49% und der R-Enantiomerwert um 57% niedriger lag.

Anders stellen sich die Ergebnisse bei 60 Minuten Inkubation dar: hier bestand fast kein Unterschied der 2,3-DPG-Konzentration in den drei Ansätzen. Gemeinsam ist sowohl den mit 100 μ mol, als auch den 500 μ mol vorbehandelten Proben, daß während der 60-minütigen Inkubationszeit der 2,3-DPG-Gehalt abgesunken war, jedoch war der Unterschied in der Razemat-Gruppe bei 5 Minuten Inkubation signifikant im Vergleich zur 60-minütigen Inkubation, ungeachtet der Konzentration an beigegebener α -Liponsäure.

a)



b)

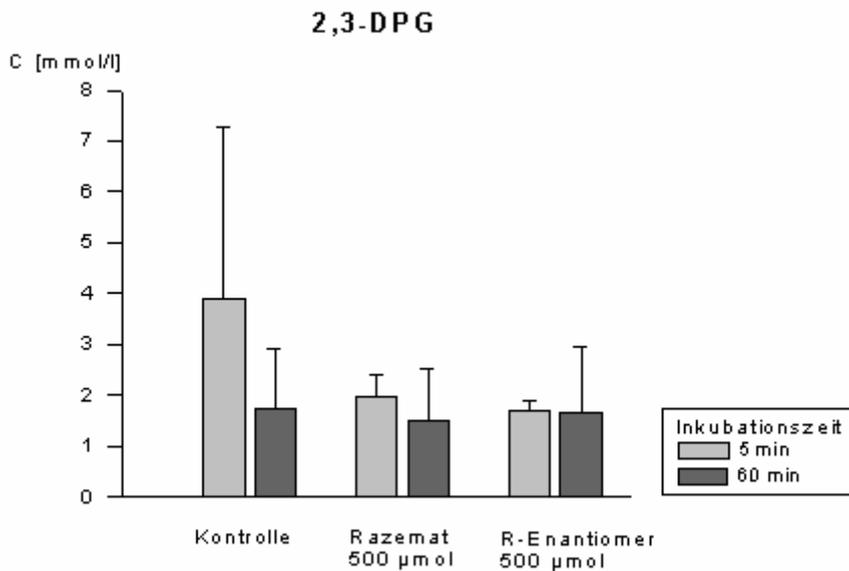


Abb. 4: Vergleich der 2,3-DPG-Konzentration bei Zusatz von a) 100µmol / n = 4 und b) 500µmol / n = 3 Razemat und R-Enantiomer der α -Liponsäure in Abhängigkeit von der Inkubationszeit mit dem Radikalbildner PMS.

Die Ausgangswerte der 2,3-DPG sind in den mit 100µmol behandelten Proben insgesamt höher, sinken aber auch nach 60 Minuten stärker ab, mit Ausnahme des Kontrollwertes.

In den mit 500µmol α -Liponsäure versetzten Beutel sind in allen Proben die Ausgangswerte niedriger und sinken in der Razemat-Gruppe und der R-Enantiomer-Gruppe kaum ab. Der Kontrollwert zeigt hier eine andere Tendenz als in der Kontrollgruppe der 100µmol-Reihe.

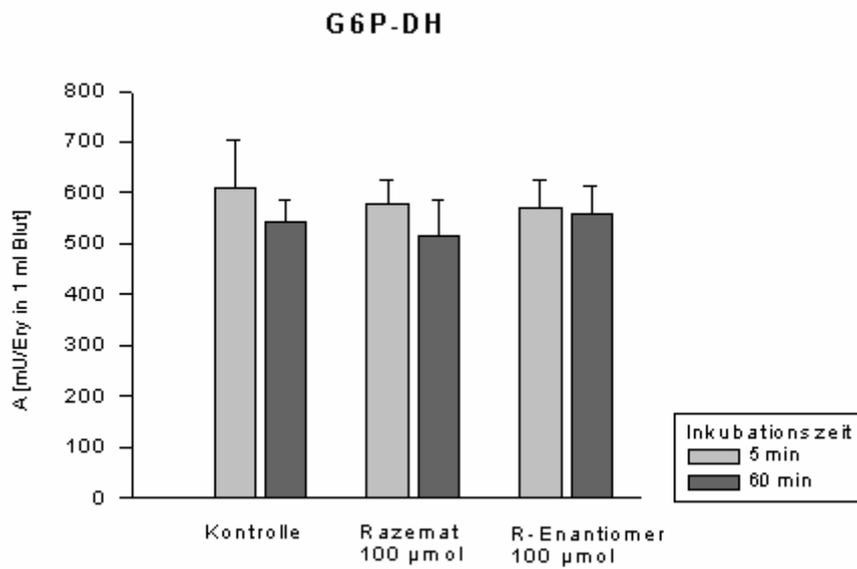
3.1.5 Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase

Bei allen Proben fiel die Aktivität der G6P-DH im Verlauf der 60-minütigen Inkubationsdauer leicht ab.

In den mit 100 μ mol präparierten Konserven war die Abnahme am stärksten in der unbehandelten Kontroll- und der Razemat-Gruppe mit ca. 11%, in der mit dem R-Enantiomer versetzten Probe am geringsten mit 2%. Die Aktivität nach 60 Minuten war in der Razemat-Gruppe am durchschnittlich niedrigsten.

Bei den mit 500 μ mol beimpften Proben war die Aktivität der G6P-DH ebenfalls zurückgegangen. Hier war die Differenz am deutlichsten in der R-Enantiomer-Gruppe mit einer Abnahme um ca 10%. Der Aktivitätsverlust in der Kontrollgruppe war hier am geringsten ausgeprägt. Den niedrigsten absoluten Mittelwert lieferten wieder die Messungen der Razematgruppe. Insgesamt waren die Unterschiede weder im Hinblick auf die Inkubationszeit mit PMS signifikant, noch auf die Dosierung der α -Liponsäure, noch darauf, ob es sich um das Razemat oder das R-Enantiomer handelte.

a)



b)

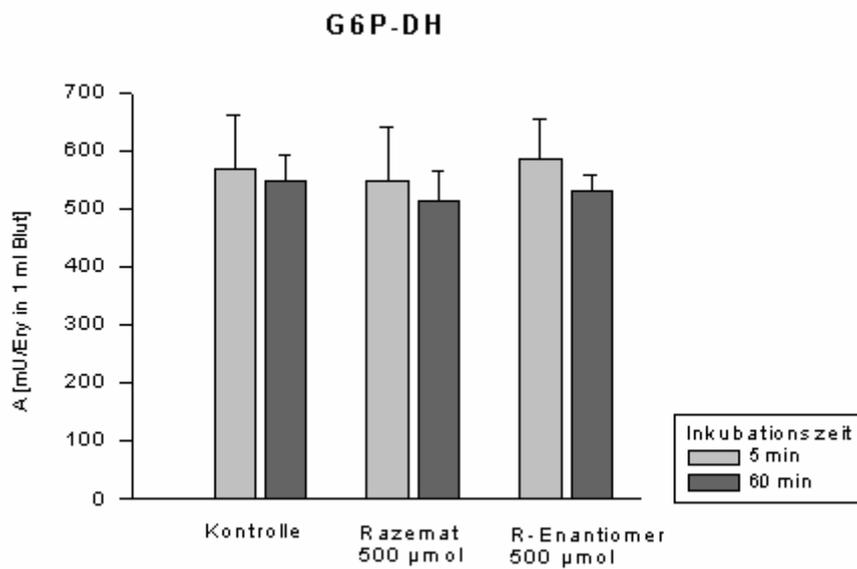


Abb. 5 a) und b): Vergleich der G6P-DH-Konzentration bei Zusatz von a) 100µmol und b) 500µmol Razemat und R-Enantiomer der α -Liponsäure in Abhängigkeit von der Inkubationszeit mit dem Radikalbildner PMS. n = 11.

Sowohl in a), als auch in b) zeigt sich eine generelle Abnahme der G6P-DH-Konzentration, wobei keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf die Dosierung der α -Liponsäure und auch der Inkubationszeit mit PMS bestehen.

3.1.6 Malondialdehyd

Bei allen Konserven zeigte sich im Verlauf der Inkubation mit PMS ein progredienter Anstieg der MDA-Konzentration.

In den mit 100 μ mol α -Liponsäure präparierten Konserven enthielt die Razematgruppe den kleinsten Ausgangswert, gefolgt von der R-Enantiomergruppe. Die Differenzen waren nicht signifikant.

Nach 30 Minuten unter Einwirkung von PMS erhöhten sich die Werte aller drei Proben signifikant ($p < 0,001$): um 21% bei der Kontrolle, 38% bei der Razematgruppe und 34% bei der R-Enantiomergruppe.

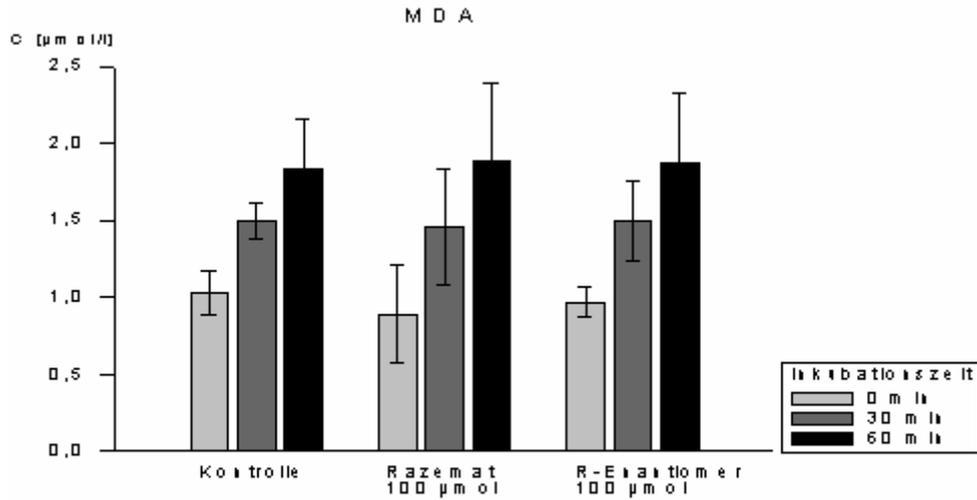
Insgesamt 60 Minuten Inkubationszeit bewirkten einen weiteren signifikanten Anstieg bei den mit α -Liponsäure behandelten Konserven mit Ausnahme der Kontrollproben. Gegenüber dem Ausgangswert nahm die Konzentration in der Razematgruppe um 53% zu, in der R-Enantiomergruppe um 48%.

Die Differenzen der MDA-Konzentrationen zum Zeitpunkt der letzten Messung unterschieden sich nicht signifikant.

In den mit 500 μ mol behandelten Konserven war ein ähnliches Muster zu beobachten, allerdings lagen die MDA-Konzentrationen zu Beginn der Messungen insgesamt niedriger (Ausnahme: Razemat_{100 μ mol} > Razemat_{500 μ mol}), wobei sich der Unterschied nur tendenziell zeigte.

Die Konzentrationen nach 60 Minuten lagen bei der Kontrolle_{500 μ mol} nur um 6% niedriger, als bei der 100 μ mol-Kontrolle. Bei den Razematproben lagen sie bei 500 μ mol 21% unter den mit 100 μ mol beimpften Beuteln und bei den R-Enantiomeren bei 500 μ mol um 12% niedriger als bei den 100 μ mol-Konzentraten.

a)



b)

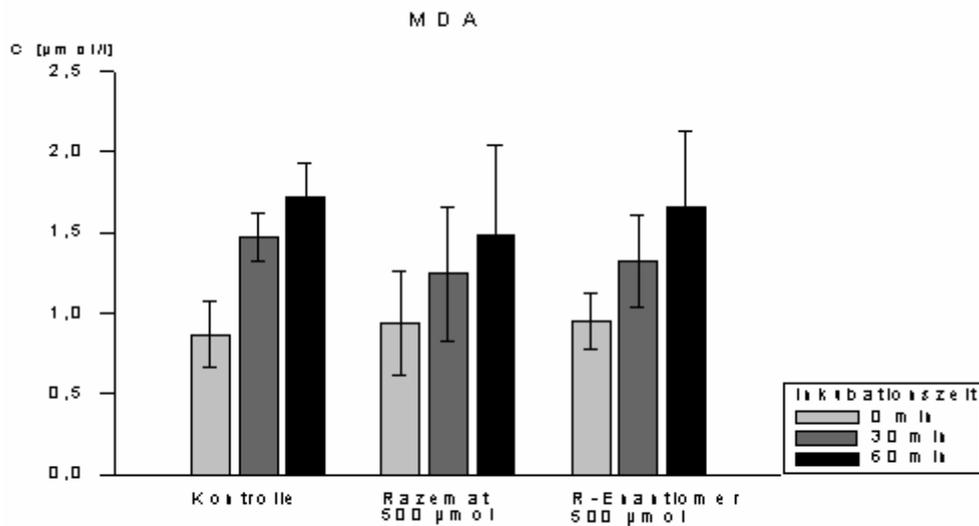


Abb. 6 a) und b): Vergleich der MDA-Konzentration bei Zusatz von a) 100µmol und b) 500µmol Razemat und R-Enantiomer der α -Liponsäure in Abhängigkeit von der Inkubationszeit mit dem Radikalbildner PMS. n = 11.

Prinzipiell steigt bei allen Proben unabhängig von der Art und Menge der Zusatzes die MDA-Konzentration an. Am geringsten ist die Zunahme in der mit 500µmol Razemat präparierten Konserve. Bei einer Dosis von 100µmol α -Liponsäure gibt es praktisch keinen Unterschied in der MDA-Konzentration der verschiedenen behandelten Gruppen nach 60 Minuten unter Einfluß von PMS.

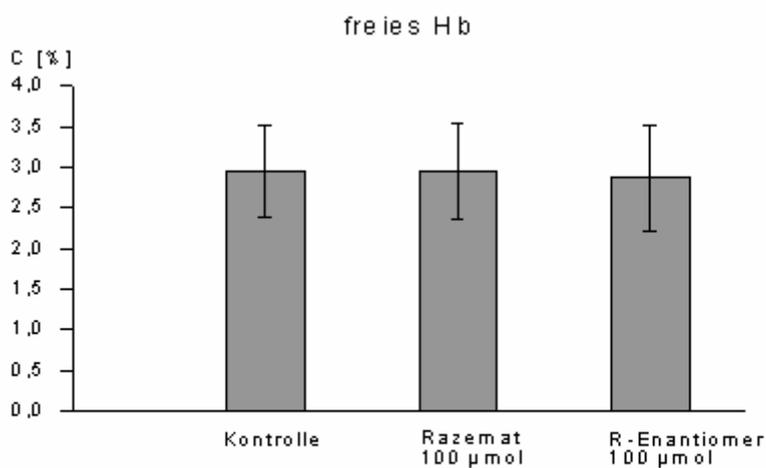
3.1.7 freies Hämoglobin

Die Konzentration von freiem Hb wurde direkt nach dem Auftauen aus den einzelnen Beuteln bestimmt, um die Hämolyserate zu messen.

In den mit 100 μ mol versetzten Konserven lag die Hb-Konzentration bei Kontrolle und Razemat nahezu gleich bei 2,95%. In den R-Enantiomer-Konserven betrug der Anteil freies Hb 2,87%, also nicht wesentlich weniger.

Bei den mit 500 μ mol behandelten Proben war die Hb-Konzentration insgesamt höher: bei der Kontrollportion 3,61%, 3,49% bei der Razematgruppe. Die Konzentration von 3,27% bei den R-Enantiomer-Konserven lag jedoch deutlich niedriger als in der Kontrollgruppe.

a)



b)

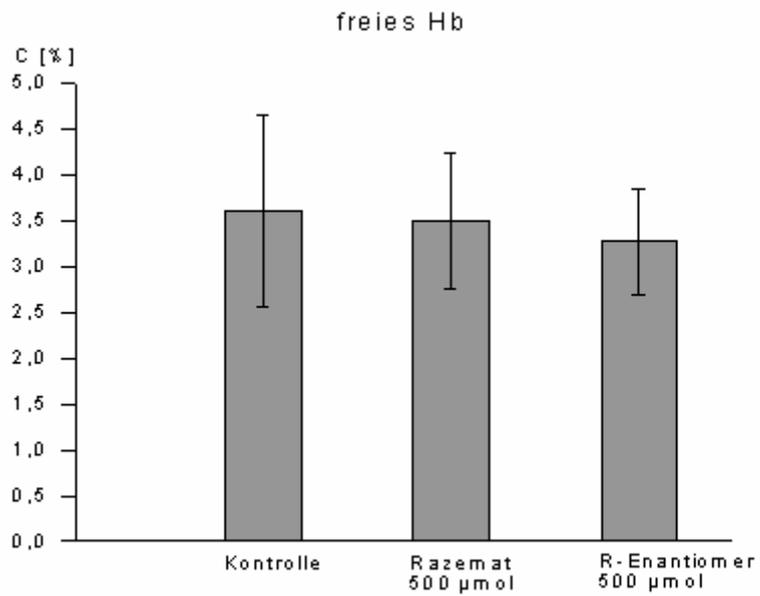


Abb. 7 a) und b): Vergleich der Hb-Konzentration bei Zusatz von a) 100µmol und b) 500µmol Razemat und R-Enantiomer der α -Liponsäure direkt nach dem Auftauen. n = 12

In a) unterscheidet sich der Gehalt an freiem Hb kaum, liegt jedoch insgesamt niedriger als in b). Hier findet sich eine geringfügige Abnahme der fHb-Konzentration von der Kontrolle über die Razemat-Gruppe zur R-Enantiomerguppe, die aber nicht signifikant ist.

4 DISKUSSION

Einerseits aufgrund der Ergebnisse vorangegangener Untersuchungen, die sich mit der Qualitätsverbesserung von flüssiggelagerten und kryokonservierten Blutkonserven befasst haben und durch fortschreitende Erkenntnisse auf dem Gebiet der Radikalforschung und der Wirkweise von Antioxidantien andererseits, stellte sich in der vorliegenden Arbeit die Frage, ob kryokonservierte Erythrozytenkonzentrate durch Zusatz von α -Liponsäure vor Einfrieren einen ausreichenden antioxidativen Schutz erfahren, um Schäden, die durch den Frier/Tau-Prozess entstehen qualitativ und quantitativ besser zu überleben.

Diese Schäden beruhen im wesentlichen auf zwei Prinzipien: einmal auf der intrazellulären Eiskristallbildung und zum anderen auf Elektrolytverschiebungen zwischen Extra- und Intrazellulärraum (LOVELOCK 1963; MAZUR 1965). CHMIEL et al. (1980) beschreiben die Mechanismen wie folgt:

"Mit der Wärmeabfuhr aus dem Material kommt es wegen der zunächst im extrazellulären Raum beginnenden Eisbildung zum Ausstrom von Wasser aus den Zellen und zu starken Veränderungen der Elektrolytkonzentrationen. Dadurch werden die Zellen nicht nur der Wirkung dieser hohen Konzentration ausgesetzt, sondern wegen der mit dem Wasseraustritt verbundenen Zellschrumpfung erleiden sie auch starke mechanische Beanspruchungen. Letztere werden noch durch die rein mechanische Wirkung der Eiskristalle verstärkt."

In der Folge wurde viel Interesse auf die Entwicklung geeigneter "Frostschutzadditive" verwendet. VAN OSS et al.(1991) zeigten in Experimenten, in denen u. a. Glycerol in wässriger Lösung als Zusatz verwendet wurde, daß Erythrozyten nach dem Frier/Tau-Prozess keinerlei osmotischem Stress ausgesetzt waren und die Prozedur unbeschädigt überstanden. Diesen Ergebnissen muss allerdings entgegengesetzt werden, daß Glycerol toxisch wirkt und deshalb vor Retransfusion der Konzentrate erst aufwändig und kostenintensiv ausgewaschen werden muss (SPUTTEK et al. 1991). Seit 1967 weiß man um die kryoprotektive Wirkung von HAES, welches nicht zuletzt aufgrund seiner guten Verträglichkeit heutzutage standardmäßig für die Infusionstherapie verwendet wird (SPUTTEK et al. 1992).

Der Ansatz, Antioxidantien in der Kryokonservierung von Erythrozytenkonzentraten zu verwenden, basiert auf Erkenntnissen, die man beim Zusatz von Antioxidantien bei der Lagerung von Blutflüssigkonserven gewonnen hat (KERN 1997) und den Bemühungen, die Wirkkraft kryokonservierter Erythrozytenkonzentrate zu erhöhen. Diese Wirkkraft richtet sich

nach der Anzahl der den Frier/Tau-Prozess in ausreichend physiologisch stabilem Zustand überlebenden Erythrozyten. HEROLD (1996) konnte zeigen, daß für die nach dem Auftauen festzustellende Hämolyserate bei Erythrozytenkonzentraten ohne Antioxidanzienzusatz eine erhöhte Anfälligkeit für oxidative Schädigungen während des Wiederauftauens verantwortlich ist. Diese Disposition wird auf eine Hemmung der energieabhängigen Ionenpumpen zurückgeführt, die einerseits das Ionengleichgewicht und damit die osmotische Stabilität der Zelle und andererseits die Funktion und Morphologie der Zellmembran entscheidend beeinflussen bzw. aufrechterhalten. Zum anderen wird eine durch abnehmende Temperaturen verursachte direkte Schädigung der Erythrozytenzellmembran durch Peroxidation von Membranlipiden bedingt (HEROLD 1996). Es kann zu einem Verlust an mehrfach-ungesättigten Fettsäuren kommen, in der Folge verändert sich die Membranpermeabilität und es kommt zur Alteration von membranständigen Enzymen und Ionentransportkanälen. Des Weiteren verändern sich subzelluläre Kompartimentierung und letztendlich entstehen zytotoxische Metaboliten von Lipidhydroperoxiden (RICE-EVANS et al. 1994).

Ein hier wirksames Antioxidans soll unterschiedlichen Kriterien genügen, die für die α -Liponsäure von PACKER et al. (1995) bereits nachgewiesen wurden. Hiernach soll die α -Liponsäure spezifisch für bestimmte Radikale und in der Lage sein, mit Metallen Chelate zu bilden, sie soll synergistisch mit anderen Antioxidantien "arbeiten" und Einfluss nehmen können auf Regulator-Proteine und Gene, die den Metabolismus eines Organismus steuern (PACKER et al. 1995). Insbesondere aber richten sich hier die Anforderungen nach der speziellen Fragestellung um den Schutz erythrozyteneigener Redoxsysteme und Membranstabilisatoren, sowie um Verträglichkeit, Praktikabilität und Verfügbarkeit des Agens. Dazu darf das Antioxidans nicht für den menschlichen Organismus toxisch sein, es muss hingegen von den Zellen aufgenommen werden - und zwar in ausreichenden Konzentrationen - und metabolisiert werden können. Um eine Schutzwirkung für Zellmembran und intrazelluläre Enzymsysteme entfalten zu können, stellt sich die Forderung nach Lipidlöslichkeit. α -Liponsäure ist lipidlöslich und daher in der Lage, intrazelluläre Enzymkomplexe vor Oxidation zu schützen, bzw. in ihrer Eigenschaft als Redoxpaar LA/DHLA als Regenerator anderer intraerythrozytärer Antioxidantien wie z.B. Gluthation aufzutreten (NICKANDER et al. 1996, HALLIWELL et al. 1999)

α -Liponsäure kommt in allen pro- und eukaryotischen Zellen vor. Sie dient als Co-Faktor bei energiegewinnenden Prozessen, indem sie an einen Multienzymkomplex gebunden als Katalysator für die oxidative Decarboxylierung von α -Ketosäuren und α -Ketoglutarat dient

und dabei von der α -Liponsäure zur Dihydroliponsäure reduziert wird. Diese reoxydiert durch eine Lipoamid-Dehydrogenase unter Bildung von NADH sofort wieder zur α -Liponsäure (BIEWENGA et al. 1997).

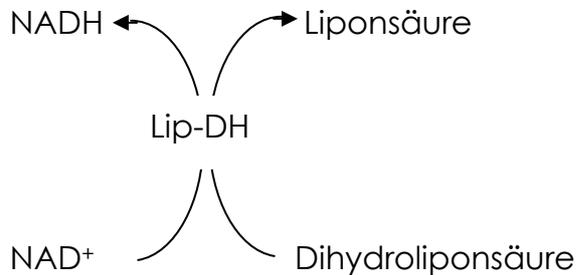


Abb. 8: Mod. nach Biewenga et al 1997

CONSTANTINESCU et al. (1995) konnten zeigen, daß gesunde Humanerythrozyten Liponsäure nur in DHLA umwandeln, wenn diesen ausreichend Glucose zur Verfügung steht und daß diese Reduktion über die Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase NADPH-abhängig ist. Dazu muss exogen aufgenommene oder wie im vorliegenden Ansatz zugesetzte LA erst einmal die Zellmembran durchdringen, was durch ein spezielles Carrier-System gewährleistet wird (CONSTANTINESCU et al. 1995).

Durch die Lipoamid-Dehydrogenase-abhängige Reduktion von LA zu DHLA kann die Zelle zusätzlich zu ihrem NADPH-Vorrat ihren NADH-Pool anzapfen (BIEWENGA et al. 1997), um zusätzlich Reduktionsäquivalente zum Schutz vor Oxidation zur Verfügung zu haben. ELSTNER (1990) stellt einige Redoxpaare dar, die auf Kosten von NADH oder NADPH ihren antioxidativen Schutz entfalten und auch für den Erythrozyten von Bedeutung sind:

- Hämoglobin/Methämoglobin:

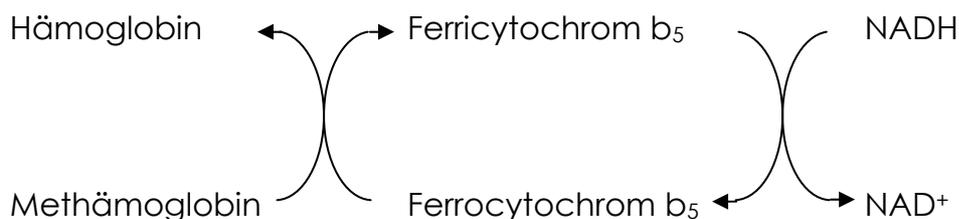


Abb 9.: Cytochrom-b5-Katalyse der Methämoglobin-Reduktion nach ELSTNER 990

- Gluthation:

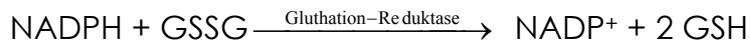


Abb. 10: Regeneration von Gluthation unter Verbrauch von NADPH nach BIEWENGA et al. (1997).

Die reduzierte Form der α -Liponsäure, die Dihydroliponsäure (DHLA), zeigt sich als höherpotenter Radikalfänger und wird auch für die Regeneration der endogenen Antioxidantien α -Tocopherol, Ascorbinsäure und Gluthation verantwortlich gemacht (BIEWENGA et al. 1997).

Die Metall-Chelat bildende Eigenschaft ist bei beiden Partnern zu finden: LA bildet mit Fe^{2+} und Cu^{2+} Komplexe, während DHLA Cd^{2+} bindet (BIEWENGA et al. 1997). Diese Fähigkeit spielt eine Rolle, wenn z.B. Fe^{2+} in seiner Eigenschaft als reduziertes Metallion als Elektronendonatoren fungieren und so eine Reihe von Oxidationsvorgängen starten kann (BIEWENGA et al. 1997). Ein Beispiel hierfür ist die sog. "Fenton-Reaktion", in der sowohl Hämoglobin als auch Methämoglobin als Katalysatoren dienen können (ELSTNER 1991):

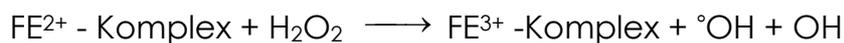


Abb. 11

Hierbei wird ein hochreaktives Hydroxylradikal freigesetzt, das für die schädigende oder toxische Wirkung des aktivierten Sauerstoffes angeschuldigt wird, u.a. für die Inangangsetzung einer sog. Kettenreaktion der Lipidperoxidation (ELSTNER 1991), welche letztendlich zu einer Schädigung der Zellmembranen führt.

Hier soll der membranprotektive Effekt von DHLA greifen, der mit der Dithiol-Gruppe des DHLA zusammenhängt - LA in seiner Eigenschaft als Disulfid schützt Membranen nicht vor Lipidperoxidation (SCHOLICH et al. 1989). Die Wirkung von DHLA beruht auf der Reduktion von oxidiertem Gluthation, welches wiederum z.B. die Regeneration des in der Zellmembran vorhandenen und dort die für die oxidative "Entgiftung" zuständigen α -Tocopherols bewirkt (PACKER et al. 1997).

Eine weitere Eigenschaft der α -Liponsäure betrifft direkt den Glucosestoffwechsel der Erythrozyten: HAUGAARD et al. konnten schon 1970 zeigen, daß α -Liponsäure die Glucoseverwertung in einem zu Insulin additiven Effekt in der Muskulatur von Ratten bewirkt, ohne den Insulinstoffwechsel zu stören. Damit kann der Erythrozyt mehr Glucose in ATP umwandeln und ist so einer zusätzlichen Energiequelle zugänglich. α -Liponsäure scheint also in der Lage zu sein, die Erythrozyten gegen oxidativen Stress zu schützen.

Die Bestimmung des ATP-Gehaltes wurde durchgeführt, um Aufschluss über die Energiegewinnung der Erythrozyten zu erhalten. Darüber hinaus besteht eine Korrelation zwischen der ATP-Konzentration und einerseits dem Funktionieren der antioxidativen Abwehr des Erythrozyten (LACHANT et al. 1984) sowie andererseits der Morphologie und Überlebensfähigkeit nach Retransfusion (NAKAO M. et al. 1960).

ATP ist essentiell zur Aufrechterhaltung der Ionengradienten an der Zellmembran durch die Na^+/K^+ -ATPase sowie auch zu Biosynthese von Gluthation, welches seinerseits als körpereigenes Antioxidans reaktive Peroxide enzymatisch entschärft.

Die Konzentration an ATP war jeweils nach 60minütiger Inkubation mit PMS am relativ höchsten. Diese Tendenz war dosisunabhängig sowohl bei den Kontrollen, als auch in den Versuchsansätzen nachzuweisen. Eine mögliche Erklärung wäre, daß der Erythrozyt während 60 min bei 37°C unabhängig von Funktionszustand oder PMS-Wirkung längere Zeit in der Lage ist, ATP zu bilden - also allmählich sein Potential zur ATP-Produktion nach dem Auftauen wiederzuerlangen - als während 5 min. Die Proben wurden unmittelbar nach der Inkubation auf Eiswasser gelagert und die Tests unter Kühlung vorgenommen, um weiter ablaufende Stoffwechselprozesse so weit als möglich zu unterbinden.

Die mit dem Razemat behandelten Proben haben insgesamt einen deutlicheren Schutz der glykolytischen Enzyme erfahren haben (Abb. 1), wobei der Zusatz des Razemates in der niedrigeren Dosierung von 100 μmol am effektivsten bezüglich des Gesamt-ATP-Gehaltes zu sein scheint.

Die Lactatkonzentration wurde als Maß für die im Erythrozyten abgelaufenen Stoffwechselprozesse untersucht, da es das Endprodukt der anaeroben Glycolyse ist. Lactat kumuliert in einem geschlossenen System - hier die Lagerung als Blutkonserve – und limitiert so die Energiegewinnung des Erythrozyten im Konzentrat, aufgrund seines die Glycolyse

hemmenden Effektes (TILTON et al. 1991). Die Studie zeigt, daß ein Ansteigen von NADH zuungunsten von NAD^+ die Glycolyse schon auf Höhe der Umwandlung von Glycerol-P (= 3-PGAD) bremst.

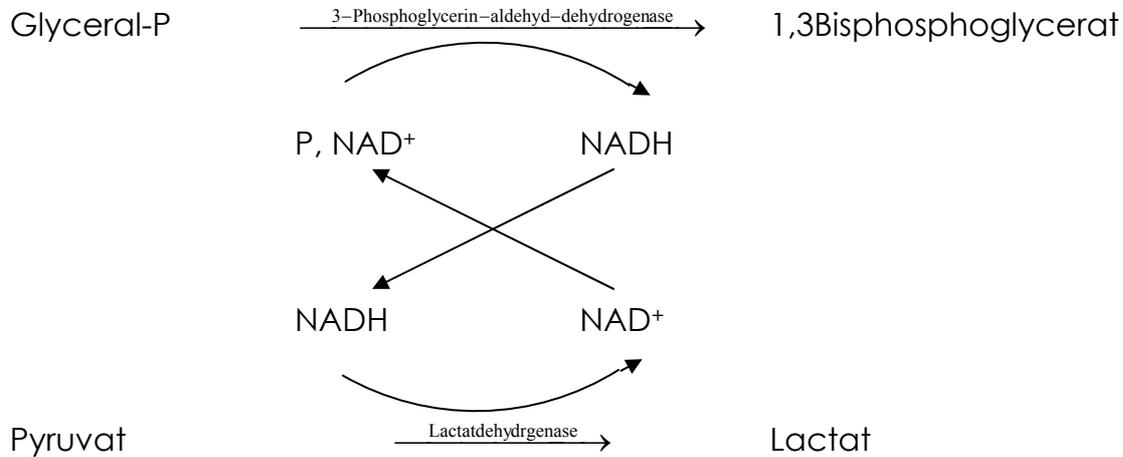


Abb. 12: Anaerobe Glycolyse im Erythrozyt. Bei der Bildung von Pyruvat aus Lactat wird NAD^+ regeneriert.

Dass die Lactatkonzentration nach 5-minütiger Inkubation in den mit 500 μmol Razemat und R-Enantiomer gering erniedrigt war gegenüber der Kontrollgruppe, lässt sich als verzögert anlaufende Glycolyse interpretieren. In der Folge ließ sich in allen Proben ein Anstieg des Substrates verzeichnen, jedoch war der Anstieg in den Proben mit Razemat am geringsten, so daß hier relativ am meisten NADH produziert wird.. Nach PACKER et al. (1995) soll dieses NADH bei der Reduktion der α -Liponsäure eine Rolle spielen, da aber bei dieser Reaktion das im Erythrozyten nur in Spuren vorhandene Enzym Lip-DH (Lipoamid-Dehydrogenase) beteiligt sei (BIEWENGA et al.1997), kann eine Regeneration der α -Liponsäure auf diesem Weg nicht angenommen werden.

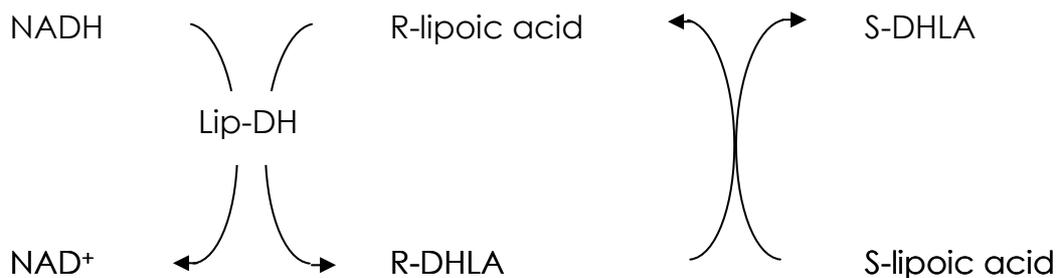


Abb. 13: mod. nach BIEWENGA et al.1997, vgl. Abb. 2 weiter oben.

Die Bestimmung des Pyruvatgehaltes wurde durchgeführt, da Pyruvat als Zwischenprodukt der Glycolyse anfällt. Die Testergebnisse waren insgesamt wenig aussagekräftig, da die wenigsten Proben zu aussagekräftigen Werten führten und die zu geringen Zahlen eine Korrelation nicht zuließen. Der Grund dafür dürfte in der Aufwendigkeit des Testes selbst zu finden sein, was bei der Organisation der durchzuführenden Untersuchungen zu unerwünschten Wartepausen und somit zu einer Vielzahl an Fehlerquellen führte. Tendenziell stiegen die Werte nach Inkubation mit PMS in allen Untersuchungen jedoch erwartungsgemäß an.

Die Konzentration von 2,3-DPG im Erythrozyten ist einer der Faktoren, der die Sauerstoffabgabe im Gewebe mitbestimmt. 2,3-DPG ist der Signalmetabolit, durch dessen abnehmende Konzentration die O₂-Affinität des Hämoglobins steigt. Umgekehrt erleichtert ein Ansteigen des 2,3-DPG die O₂-Abgabe an das abhängige Gewebe. Bei transfundiertem Blut würde ein zu niedriger 2,3-DPG-Spiegel zu einer ungenügenden Sauerstoffversorgung des Empfängergewebes führen. Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchungen zeigten in allen Kryokonserven nach dem Auftauen hohe 2,3-DPG- Werte, die auch durch den Zusatz von Liponsäure kaum zu verbessern waren. Nach 60 Minuten Inkubation sanken die Werte in dem Maße, in dem die Produktion von ATP anstieg. Dies zeigt einen Shift in der Glycolyse von 2,3-BPG hin zu der Bildung von ATP. Es zeigte sich der Trend, daß dieser Prozess bei den mit Razemat 100µmol und 500µmol am deutlichsten ausfiel. Da 2,3-DPG in vivo eine gute Regenerationsfähigkeit zeigt (BEUTLER et al. 1969), kann davon ausgegangen werden, daß der nahezu konstant bleibende Wert auch nach 60 Minuten bei höherer Dosierung des R-Enantiomers trotz eines Ausgangsgesamtwertes unter der Norm von ca. 3mmol/l (GEIGY) eine positive Aussage über die protektive Wirkung zulässt.

Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase (G-6-P DH) katalysiert im Pentosephosphatweg die erste Reaktion:

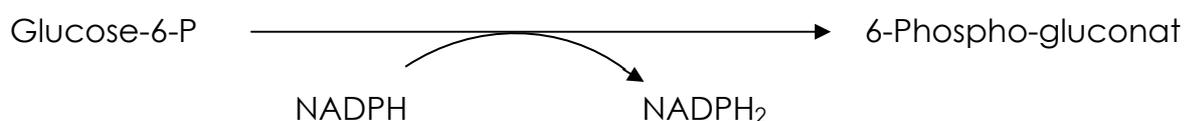


Abb. 14

Dieser Schritt dient unter anderem der Bereitstellung des Reduktionsäquivalentes NADPH, welches z. B. benötigt wird um das intraerythrozytäre Gluthation zu regenerieren. Gluthation wird ATP-abhängig gebildet und nimmt in der antioxidativen Abwehrstrategie des Erythrozyten eine wichtige Rolle ein. Da der Erythrozyt im Laufe seiner Reifung auch die Mitochondrien verliert, ist seine Radikalenabwehr-Strategie auf cytosolisch lokalisierte Prozesse angewiesen. Dazu gehört u. a. die „Entsorgung“ von Sauerstoffradikalen durch Gluthation:

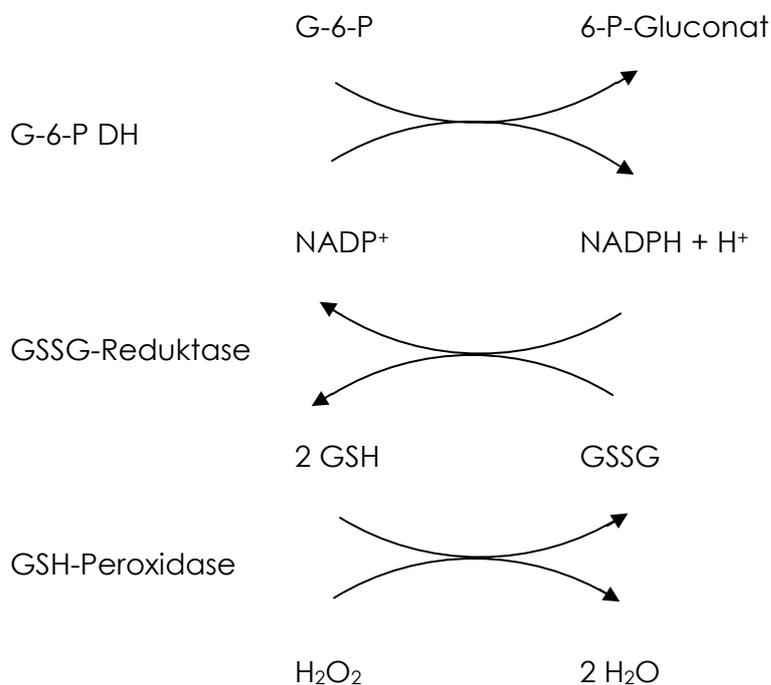


Abb. 15: Zusammenhang von Regeneration des NADH und Abbau von reaktivem Sauerstoff durch Gluthation, mod. nach LÖFFLER

Die Aktivität der G-6-P DH sank zwar in allen untersuchten Proben ab, jedoch war dieser Vorgang in den mit 100 µmol R-Enantiomer behandelten Proben mit nur 2% Rückgang während der Inkubationszeit von 60 min am geringsten ausgeprägt. Obwohl vorausgegangene Untersuchungen einen größeren Effekt bei dem im Rahmen dieser Arbeit nicht untersuchten S-Enantiomer aufzeigten (KERN 1997), sprechen die vorliegenden Ergebnisse eher für die den o.g. Regelkreis unterstützende Funktion der α -Liponsäure, hier hauptsächlich durch die Eigenschaften des R-Enantiomers bedingt. Durch eine höhere Dosis scheint der Effekt jedoch wieder aufgehoben zu sein, hier zeigen die Werte keine überzeugende Korrelation, im

Gegenteil ist hier der Aktivitätsrückgang der G-6-P DH in der Kontrollgruppe am niedrigsten ausgeprägt. Möglicherweise zeigt sich auch hier wieder der schon erwähnte pro-oxidative Effekt der α -Liponsäure. Damit ist ein sehr enger therapeutisch nutzbarer Dosisbereich definiert.

MDA ist bekannt als Abbauprodukt, welches bei der Peroxidation von Lipiden entsteht (RICE-EVANS et al. 1994), es entsteht insbesondere bei der Peroxidation von Fettsäuren mit mindestens drei Doppelbindungen (KUKLINSKI et al.1991). Eine gesteigerte Lipidperoxidation ist gekennzeichnet durch eine ansteigende Konzentration von MDA, welches nach BUEGE und AUST (1978) einen semiquantitativen Indikator für die Lipidperoxidation darstellt.

HEROLD konnte 1996 zeigen, daß nicht ein erhöhter pO_2 in den Konserven für das Ansteigen des MDA verantwortlich sei, sondern vielmehr ein Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein von freiem Hb-Eisen in seiner Eigenschaft als Reduktionsmittel und Generator von O_2 -Radikalen einerseits und der durch die Kryokonservierung abgeschwächten antioxidative Protektion der Erythrozytenmembran andererseits.

Die Testreihen belegen, daß unmittelbar nach dem Auftauen das Razemat in einer Dosierung von 100 μmol die deutlichste antioxidative Wirkung zeigt, wohingegen eine Dosissteigerung keine wesentliche Verbesserung bringt. Nach längerer Einwirkung des Radikalengenerators steigen sämtliche Werte nahezu linear an, jedoch bleibt auch hier die mit Razemat behandelte Gruppe im unteren Bereich, nun aber in der höheren Dosierung.

Bekannt ist, daß freies Hb als Katalysator für die Lipidperoxidation dient, sobald noch andere oxidative Substanzen mitwirken (KUHN et al.1983). Hämoglobin ist in seiner Eigenschaft als O_2 -Träger sowieso ständig der Gefahr der Oxidation ausgesetzt und wird regulär in einem geringen Prozentsatz zu Met-Hb oxidiert. ELSTNER (1991) spricht von einem

„Hämoglobin-Methämoglobin-Zyklus, [der mit] zelleigenen antioxidativen Systemen [...] interagiert. Diese Redoxprozesse werden von einer Oxidation des endogenen Gluthations überlagert, welche, wenn dessen Konzentration absinkt, von einer Lipidperoxidation begleitet [wird].“

Die Konzentrationen an freiem Hb wurden durch Zusatz von 100 μmol α -Liponsäure nicht nennenswert beeinflusst und auch die höhere Konzentration zeigte keine signifikanten Unterschiede bei insgesamt gering höheren Ausgangswerten. Da die Proben nicht mit dem PMS inkubiert wurden, ist die Reihe als Indikator für das Ausmaß der Hämolyse durch den Frier/Tau-Prozess und die Waschgänge zu verstehen. Dadurch erklärt sich auch die geringe Varianz der Werte, die belegt, daß alle Proben den gleichen Behandlungsbedingungen ausgesetzt waren.

Vorausgegangene Untersuchungen zeigten schon die Wirksamkeit von α -Liponsäure als antioxidativen Zusatz bei der Flüssiglagerung von Erythrozytenkonzentraten in bezug auf eine Verlängerung der Lagerungsdauer (KERN 1997). Für die Kryokonservierung, die ja die Möglichkeit einer nahezu unbegrenzten Konservierung in Aussicht stellt, wurde in der vorliegenden Arbeit ebenfalls eine antioxidative Protektion festgestellt. Dies jedoch in sehr viel geringerem Ausmaß, so daß sich die Frage stellt, ob der hier verfolgte Ansatz, nämlich der extrakorporale Zusatz der α -Liponsäure nach der Blutentnahme und vor der Kryokonservierung einen weniger erfolgversprechenden Weg nimmt, als beispielsweise die präventive oder prophylaktische orale Gabe. Da α -Liponsäure schon länger ein zugelassenes Medikament in der Behandlung von z.B. der diabetischen Polyneuropathie ist, und verschiedene Studien zu diesem Themenkreis positive Ergebnisse postulieren (z.B. KÄHLER et al. 1993), wäre es basierend auf den vorliegenden Untersuchungen zu erwägen, ob nicht ein für eine gewisse Zeit vor einer geplanten Eigenblutspende verabreichter „Antioxidantien-Cocktail“ eine weitere Verbesserung der Lagerungsfähigkeit und insbesondere Rekonditionierungsfähigkeit der Erythrozytenkonzentrate bewirken könnte.

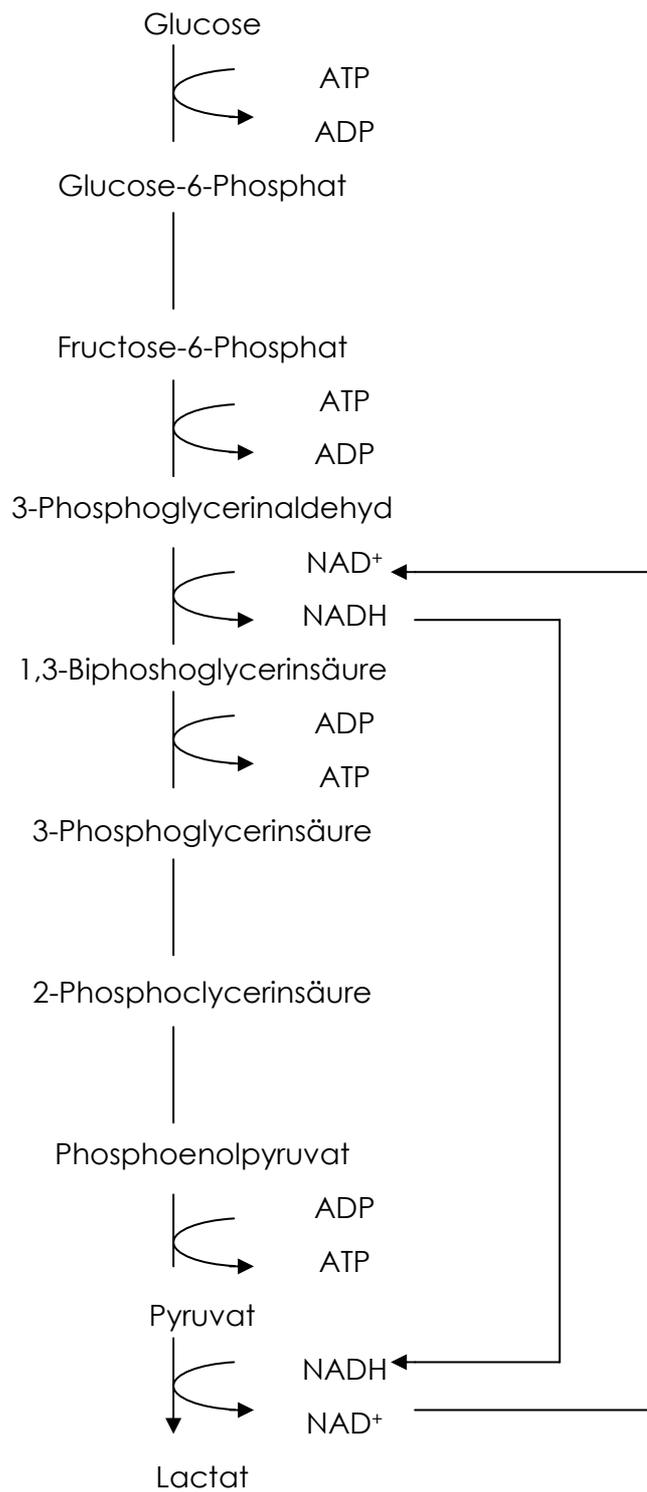


Abb. 16: Die anaerobe Glycolyse, mod. nach Löffler.

5 ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit stellte sich die Frage, ob die bewährte Methode der Kryokonservierung von Erythrozytenkonzentraten in Kombination mit einer Beimischung mit der als Antioxidans ebenfalls bekannten α -Liponsäure (R-Enantiomer und Razemat) in einer wesentlichen Qualitätsverbesserung sowohl hinsichtlich der quantitativen Ausbeute als auch der biochemischen Eigenschaften der gelagerten Erythrozyten resultiert.

Die Erythrozytenkonzentrate wurden vor der Kryokonservierung mit der α -Liponsäure behandelt und nach dem Auftauen für 5, 30 und 60 min. mit PMS als Radikalbildner versetzt. Es erfolgte ein Vergleich gegen eine Kontrollkonserve ohne α -Liponsäure.

Aus den experimentellen Ergebnissen lassen sich folgende Schlüsse ziehen:

1. Sowohl Razemat, als auch R-Enantiomer haben einen protektiven Effekt auf die Erythrozytenmembran im Hinblick auf die Lipidperoxidation; das Razemat scheint hier die besseren Ergebnisse zu zeitigen.
2. Das R-Enantiomer scheint in niedriger Dosierung die G6P-DH am ehesten zu schützen, wobei die pro-oxidativen Eigenschaften der α -Liponsäure das therapeutisch nutzbare Dosisfenster vermutlich stark einengt.
3. In zu hoher Dosierung haben sowohl Razemat als auch R-Enantiomer der α -Liponsäure einen negativen Effekt auf die Hämolyserate.
4. Bei dem Schutz der intraerythrozytären Enzymausstattung scheint ebenfalls das Razemat eine stärkere Wirkung zu entfalten.
5. Insgesamt scheint die niedrige Dosierung von 100 μ mol Razemat einen günstigeren Effekt auf den Gesamt-ATP-Gehalt zu haben.
6. Das Razemat wirkt in beiden untersuchten Dosierungen positiv auf die Ausbeute an 2,3 DPG.
7. Abhängig von der Zeitspanne, während der die Erythrozyten dem oxidativen Stress unterliegen, zeigt sich ein membranprotektiver Schutz des Razemates: in niedrigerer Konzentration für kurze Zeit, in der höheren Dosis für den länger dauernden Einfluss der Sauerstoffradikale.

Insgesamt zeigt die vorliegende Arbeit, daß der schon bestätigte antioxidativ-protektive Charakter der α -Liponsäure auch unter Anwendung der Kryokonservierung bei der Lagerung

von Erythrozytenkonzentraten wirkt, wobei mehr positive Ergebnisse im Vorliegen als Razemat erkennbar sind. Diese Wirkung scheint sich eher bei niedriger Konzentration der Substanz zu entfalten, wobei ein notierter Nachteil in dem engen Dosisfenster besteht.

Insgesamt bringt der hier zugrundeliegende Testaufbau ermutigende Resultate, wenngleich diese noch mit vielen Unklarheiten behaftet sind. Daher kann es sich hier nur um erste, vorläufige Ergebnisse handeln, die noch im Detail zu überprüfen wären.

6 ANHANG

6.1 Abkürzungen

1,3-DPG	1,3- Diphosphoglycerat
2,3-DPG	2,3-Diphosphoglycerat
3-PGAD	Phosphoglycerolaldehyd Dehydrogenase
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
DHLA	Dihydroliponsäure
G-6-P DH	Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase
GAP	Glycerinaldehyd-3-Phosphat
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase
GDH	Glycerin-3-Phosphat Dehydrogenase
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase
GSH/ GSSG	reduziertes und oxidiertes Gluthation
LDH	Lactatdehydrogenase
MDA	Malondialdehyd
NADH/ NADPH	reduziertes Nikotinsäureamid-adenin-dinukleotid
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PG	Phosphoglycerat
PGK	Phosphoglyceratkinase
PGM	Phosphoglyceratmutase
PMS	Phenazin-Methosulfat
SOD	Superoxiddismutase
TBA	Thiobarbitursäure
t-BH	tertiäres Butylhydroperoxid
TCA	Trichloressigsäure

7 LITERATUR

ADAM, H.:

Adenosine 5'triphosphate determination with phosphoglycerate kinase.
Bergmeyer, H.U. (Hrsg.): Methods of Enzymatic Analysis, Academic Press, New York (1963), 539-543.

AKERBLOM, O., VERDIER, CH. D. E., ERIKSSON, A., GARBY, L., HOGMAN, C.F.

Rapid freezing of erythrocytes using glycerol in low concentrations.
Bibl-Haematol. 29 (1968), 814-22

AKERBLOM, O., VERDIER, CH.D. E., FINNISON, M., GARBY, L; HOGMAN, C.F., JOHANSSON, S.G.:

Further studies on the effect of adenine in blood preservation
Transfusion Jan-Feb 7(1) (1967), 1-9

BIEWENGA, GP., HAENEN, GR., BAST, A.:

The pharmacology of the antioxidant lipoic acid.
General Pharmacology 29 (1997), 315-31.

BRAUN, H.:

Dihydroliponsäure und Superoxiddismutase zum "Priming" von Blutflüssigkonserven
Inauguraldiss. Univ. Würzburg, 1997

BUEGE, J. A., AUST, S.D.:

Microsomal lipid peroxidation.
Methods in Enzymology/ Vol.LII, (Biomembranes Part C), Academic Press (1978), 302-310.

BURKHART, J.:

Erythrozytenkonzentrate kryokonserviert
hämotherapie, Journal für das Krankenhaus Nr.4/96, 3-10

CHANUTIN, A.:

Effect of storage of blood in ACD-adenine-inorganic phosphate plus nucleosides on metabolic intermediates of human red cells.
Transfusion Nov-Dec 7/6 (1967), 409-19

CHMIEL, H., STROH, N., WALITZA, E.:

Verfahrenstechnische Aspekte der Gefrierkonservierung von Blutbestandteilen
Biomed. Tech. 25 (1980), 52-57

CONSTANTINESCU, A., PICK, U., HANDELMAN, GJ., HARAMAKI, N., HAN, D., PODDA, M., TRITSCHLER, HJ., PACKER, L.:

Reduction and transport of lipoic acid by human erythrocytes.
Biochem-Pharmacol. Jul 17; 50(2) (1995), 253-61

CZOK, R., LAMPRECHT, W.:

Pyruvat, Phosphoenolpyruvat und D- Glycerat-2-phosphat
H.U. Bergmeyer (Hrsg.): Methoden der enzymatischen Analyse, Verl. Chemie, Weinheim (1974), 1491ff.

EL-SERAG, H. B.:

Hepatocellular carcinoma and hepatitis C in the United States.
Hepatology. Nov 36; (5 Suppl 1) (2002), 74- 83

ELSTNER, EF.:

Die physiologische Bedeutung von Redoxsystemen in Blut und Blutgefäßen
Mikrozirkulation in Gehirn und Sinnesorganen; Hrsg.: R. Stadtmeister und L.E. Pillmat, Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart (1991), 1-17

EVELYN, K. A. MALLOY, H. T.:

Microdetermination of oxyhemoglobin, methemoglobin, and sulfhemoglobin in a single sample of blood,
J. biol. chem. 126 (1938), 655- 662

FERNANDEZ, M.C., GOTTLIEB, M., MENITOVE, J. E.:

Blood transfusion and postoperative infection in orthopedic patients.
Transfusion 32 (1992), 318-322

GEISE, W., CONRAD, F., HENRICH, HA.:

Protection of stored erythrocytes against oxidative stress and insufficient physiological function by enantiomers of α -lipoic acid
Infusionstherapie Transfusionsmedizin 26, (1999) 26-32

GOMEZ, M.M., ARRIETA, Y.S., VALLEJO, J.J.G., MERIDA DE LA TORRE, F.J., ROMERO DE LA CRUZ, M.D., ELOY-GARCIA, J.M.:

Pre and postoperative autotransfusion. A comparative study of haematology, Biochemistry and red cell metabolism in pre-donated blood and surgical drainage.
Sangre 44 (6) (1999), 443-450

GUERTLER, L.G., EBERLE, J., BADER, L.:

Transfusionsassoziierte HIV-Infektion
Infusionsther Transfusionsmed 21 (suppl 1) (1994), 7-10

HAAK, E.S., USADEL, K.H, KOHLEISEN, M., YILMAZ, A., KUSTERER, K., HAAK, T

The effect of alpha-lipoic acid on the neurovascular reflex arc in patients with diabetic neuropathy assessed by capillary microscopy.
Microvasc Res. Jul 58(1) (1999), 28-34

HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J.M.C.:

Free radicals in biology and medicine.
Oxford university press (1999), 194

HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J.M.C.:

Free radicals in biology and medicine.
Oxford university press (1999), 194

HARADIN, A., WEED, R., REED, C.:

Changes in physical properties of stored erythrocytes.
Transfusion 9 (1969), 229-237.

HAUGAARD, N., HAUGAARD, ES.:

Stimulation of glucose utilization by thioctic acid in rat diaphragm incubated in vitro
Biochim. Biophys. Acta 222 (1970), 583-586

HEATON, W.A.:

Evaluation of posttransfusion recovery and survival of transfused red cells
Transfus. Med. Rev. 6(3) (1992), 153-169

HEATON, W.A.:

Evaluation of posttransfusion recovery and survival of transfused red cells
Transfus. Med. Rev. 6(3) (1992), 153-169

HENRICH, H.A., KOBELT, F., LANGER, R., SCHMID, H., SPUTTEK, A., STEIGERWALD, R., TRENKEL, K.:

Blutersatz mit kryokonservierten Erythrozytenkonzentraten–Wirkung auf Blut- und Plasma-
rheologie, Mikrozirkulation und Gewebeversorgung.
Ber. In San (1991), I 2289-V 5493

HEROLD, T.:

Untersuchung kryopathogener Vorgänge am Erythrozyten bei -80°C-Lagerung mit
Hydroxyethylstärke
Inauguraldiss. Univ. Würzburg 1996

JILG, W.:

Hepatitis B – Bedeutung für die Transfusionsmedizin
Infusionsther. Transfusionsmed. 21 (1994), 20-26

KAEHLER, W., KUKLINSKI, B., RÜHLMANN, C., PLOETZ, C.:

Diabetes mellitus- eine mit Freien Radikalen assoziierte Erkrankung
Z. Gesamte Inn Med 48 (1993), 223-232

KAGAN, V.E., SHVEDOVA, A., SERBINOVA, E., KHAN, S., SWANSON, C., POWELL, R., PACKER, L.:

Dihydrolipoic acid – a universal both in the membrane and in the aqueous phase.
Biochem. Pharmacol. 44 (1992), 1637-1649

KERN, D.:

Wirkung der Enantiomere der α -Liponsäure auf die Lagerungsdauer von
Blutflüssigkonserven
Inauguraldiss. Univ. Würzburg 1997

KNIGHT, J.A., SEARLES, D.A., BLAYLOCK, R.C.:

Lipid Peroxidation Compared in Whole Blood with Various Nutrient- anticoagulant Solutions.

Annals of clinical and Laboratory Science, Vol. 23, No. 3 (1993), 178-183

KNIGHT, J.A., VOORHEES, R.P., MARTIN, L., ANSTALL, H.:

Lipid peroxidation in stored red cells.

Transfusion 32 (1992), 354-357

KNIGHT, J.A., SEARLES, D.A.:

The effect of various antioxidants on lipid peroxidation in stored whole blood

Ann Clin Lab Sci, Jul-Aug 24(4) (1994), 294-301

KNORPP, C.T., STARKWEATHER, W.H., SPENCER, H.H., WEATHERBEE, L.:

The survival of frozen erythrocytes protected by hydroxyethyl starch in primates after postthaw washing

Cryobiology 8 (1971), 392

KÜEHNLE, H. F.:

J. Chem. Clin. Biochem. 15 (1977), 171

KUHN, H., SCHEIWE, T., RAPOPORT, S. M.:

Catalytic activities of the haemoglobin related to lipid peroxidation

Biomed. Biochim. Acta 42 (1983), 139-143

KUHN, H., SCHEIWE, T., RAPOPORT, S.M.:

Catalytic activities of haemoglobin related to lipid peroxidation.

Biomedica Biochimica Acta 42 (1983), 139-143

KUKLINSKI, B., PIETSCHMANN, A.:

Oxidativer Stress und Altern

Z. Geriatrie 4 (1991), 224-246

LACHANT, N.A., NOBLE, N.A., MYRHE, B.A., TANAKA, K.R.:

Antioxidant metabolism during blood storage and its relationship to posttransfusion red blood cell survival.

Am. J. Hematol. 17 (1984), 237-249

LÖHR, G.W., WALLER, H.D.:

Glucose-6-phosphatase Dehydrogenase.

H.U. Bergmeyer (Hrsg.): Methods of Enzymatic Analysis. Verl. Chemie und Acad. Press, New York und London (1974), 636ff.

LOVELOCK, J.E.:

The haemolysis of human red blood-cells by freezing and thawing

Biochim. et Biophys. Acta 10 (1963), 414-426

MERYMAN, H.T., HORNBLOWER, M., SYRING, R., MESBAH-KARIMI, N.:

Extending the storage of red cells at 4°C
Transfus. Sci. 15 (1994), 105-115

MEZROW, C.K., BERGSTEIN, I., TARTTER, P.I.:

Postoperative infections after following autologous and homologous blood transfusions.
Transfusion 32 (1992), 27-30

MICHAL, G.:

D-Glycerat-2.3-diphosphat
Bergmeyer, H.U. (Hrsg.): Methoden der enzymatischen Analyse, Verlag Chemie, Weinheim (1974), 1478- 1483

MURPHY, E.L., BUSCH, M.P., TONG, M., CORNETT, P., VYAS, G.N.:

A prospective study of the risk of transfusion-acquired viral infections.
Transfus. Med. 1998 Sep; 8(3): 173-8

MURPHY, P., HEAL, J.M., BLUMBERG, N.:

Infection or suspected infection after hip replacement surgery with autologous or homologous blood transfusions.
Transfusion 32 (1991), 212-217

NAKAO, M., NAKAO, T., YAMAZOE, S.:

ATP and the maintenance of the shape of the human red cell
Nature 10 (1960), 187-195

NICKANDER, K.M., MCPHEE, B.R., LOW, P.A., TRITSCHLER, H.:

Alpha-lipoic acid: antioxidant potency against lipid peroxidation of neutral tissues in vitro and implications for diabetic neuropathy
Free Radic Biol Med 21 (1996), 631- 9

NOLL, F.:

Bestimmung mit LDH, GPT und NAD
Bergmeyer, H.U. (Hrsg.): Methoden der enzymatischen Analyse, Verlag Chemie, Weinheim, 3. Aufl., Bd. 2 (1974), 1521-25

PACKER L, TRITSCHLER H:

Alpha- lipoic acid: the metabolic antioxidant
Free Radic. Biol. Med. 20 (1996), 625-6.

PACKER L., TRITSCHLER HJ, WESSEL K:

Neuroprotection by the metabolic antioxidant alpha-lipoic acid.
Free Radic Biol Med 22 (1997), 395-78

PACKER, L., WITT, E.H., TRITSCHLER, H.J.:

Alpha- Lipoic acid as a biological antioxidant.
Free Radic. Biol. Med. 19 (1995), 227-250

PENNER, M., SIBROWSKI, W.:

Nutzen und Risiken der Eigenblutspende
Infusionsther. Transfusionsmed. 21 (suppl 1) (1994), 64-68

**PICK, U., HARAMAKI, N., CONSTANTINESCU, A., HANDELMAN, G.J., TRITSCHLER, H.J.,
PACKER, L.:**

Gluthation reductase and lipoamide dehydrogenase have opposite stereospecificities for α -
lipoic acid enantiomers.
Biochem. and Biophys. Research Communications 206 (2) (1995), 724-730

RICE-EVANS, C.A.:

Formation of free radicals and mechanisms of action in normal biochemical processes and
pathological states
Free Radical Damage and its Control (1994) Elsevier Science B. V., 131-153.

RICHTERICH, R. :

Klinische Chemie, Karger, Basel (1971), 378-388

**Richtlinien zur Blutgruppenbestimmung und Bluttransfusion. Überarbeitete Fassung
2000.**

Wissenschaftlicher Beirat der Bundesärztekammer und des Bundesgesundheitsamt 1991.

ROGGENDORF, M.:

Bedeutung der HCV-Infektion für die posttransfusionale Hepatitis.
Infusionsther Transfusionsmed 21 (suppl 1) (1994), 12-18

ROWE, A.W.:

Cryopreservation of red cells by freezing and vitrification – some recollections and
predictions
Infusionsther Transfusionsmed 29 (2002), 25-30

SCHEIWE, M. W., KÖRBER, C., NICK, H. E.:

Physical and chemical aspects of cryopreservation of human BBCs with HES 450/0.70
Vox sang. 37 (1979), 354-358

SCHOLICH, H., MURPHY, ME., SIES, H.:

Antioxidant activity of dihydrolipoate against microsomal lipid peroxidation and its
dependence on α -tocopherol
Biochim. Biophys. Acta 1001 (1989), 256-261

SCHONHEIT, K., GILLE, L., NOHL, H.:

Effect of alpha-lipoic acid and dihydrolipoic acid on ischemia/reperfusion injury of the heart and heart mitochondria.

Biochim Biophys Acta Jun 9; 1271(2-3) (1995), 335-42

SCHWARZ, T.F.:

Übertragung von Parvovirus B19 durch Blut und Blutkomponenten.

Infusionsther. Transfusionsmed. 21 (suppl 1) (1994), 27-31

SIBROWSKI, W., WÜLLENWEBER, J.:

Das Infektionsrisiko in der Hämotherapie

Infusionsther Transfusionsmed 21 (suppl 1) (1994), 60-63

SMITH, A.U.:

Prevention of hemolysis during freezing and thawing of red blood cells

Lancet (1950), 910

SPUTTEK, A., RAU, G.:

Kryokonservierung von Humanerythrozyten mit Hydroxyethylstärke (HES)

Teil 1: Verfahrensbeschreibung

Infusionstherapie 19 (1992), 269-275

SPUTTEK, A., RAU, G.:

Kryokonservierung von Humanerythrozyten mit Hydroxyethylstärke (HES)

Teil 1: Verfahrensbeschreibung

Infusionstherapie 19 (1992), 269-275

SPUTTEK, A., BACHER, C., RAU, G., HENRICH, HA.:

Kryokonservierung von Humanerythrozyten mit Hydroxyethylstärke (HES)

Teil 2: Vitalitätsanalytik

Infusionstherapie 19 (1992), 276-282.

STROKOV, I.A., KOZLOVA, N.A., MOZOLEVSKII, I.U.V., MIASOEDOV, S.P., IAKHNO, N.N.:

The efficacy of the intravenous administration of the trometamol salt of thioctic (alpha-lipoic) acid in diabetic neuropathy

Zh Nevrol Psikhiatr Im S S Korsakova 99(6) (1999), 18-22

THOMAS, L. (Hrsg.):

Labor und Diagnose

Die Medizinische Verlagsgesellschaft Marburg 1992

TILTON, W.M., SEAMAN, C. CARRIERO, D., PIOMELLI, S.:

Regulation of glycolysis in the erythrocyte: role of the lactate/pyruvate and NAD/NADH ratios

J. Lab. Clin. Med. Aug. 118(2) (1991), 146-52

TRIULZI, D.J., VANEK, K., RYAN, D.H., BLUMBERG, N.:

A clinical and immunologic study of blood transfusion and postoperative bacterial infection in spinal surgery.
Transfusion 32 (1992), 517-524

VAN DE WATERING, L., HERMANS, J., WITVLIET, M.; VERSTEEGH, M., BRAND, A.:

HLA and RBC immunization after filtered and buffy coat-depleted blood transfusion in cardiac surgery: a randomized controlled trial.
Transfusion Jun. 43 (6) (2003), 765- 771

VAN OSS, C.J., GIESE, R.F., NORRIS, J.:

Interaction between advancing ice fronts and erythrocytes. Mechanism of erythrocyte destruction upon freezing and influence of cryoprotective agents
Cell Biophys Jun. 18(3) (1991), 253-61

WALKER, W.H., NETZ, M., GAENSHIRT, K. H.:

49 Tage Lagerung von Erythrozytenkonzentraten in Blutbeuteln mit der Konservierungslösung PAGGS-Mannitol
Beitr Infusionsther. Basel, Karger, vol. 26 (1990), 55-59

WEATHERBEE, L., ALLEN, E.D., SPENCER, H.H., LINDENAUER, S.M., PERMOAD, P.A.:

Red cells preserved with 10% hydroxyethyl starch: effect of prefreeze washing
Cryobiology 12 (1975), 513-516

WOLFE, L.C.:

The membrane and the lesion of storage in preserved red cells.
Transfusion 25 (1989), 185-203

Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. H. A. Henrich danke ich für die Überlassung des Themas und seine wertvollen Anregungen und Vorschläge.

Herrn Prof. Dr. med. M. Böck danke ich für seine Bereitschaft, das Referat zu übernehmen und einen Korreferenten zu benennen.

Herrn Dr. Geise gilt mein Dank für seine Ratschläge, seine Hilfestellungen, was sowohl die Hinführung an das Thema, als auch seiner nimmermüden Bereitschaft zur Korrektur betrifft.

Frau Susanne Fertig gilt mein Dank für die praktische Einarbeitung und die hervorragende Zusammenarbeit, ihre Fröhlichkeit, die die langen Arbeitstage zu einer schönen Zeit werden ließen.

Meinen herzlichen Dank an Frau Gerti Scheuer, ohne deren Hilfe bei Terminabsprachen und Literaturbeschaffung und ohne deren gute Laune und fürsorgliches Wesen vieles sicher viel komplizierter und langwieriger gewesen wäre.

Meinem Mitdoktoranden Markus Engelschalk ein Dankeschön für seine Gabe, andere zu motivieren, und seine Starthilfe in Sachen Computer.

Dank auch an alle Mitarbeiter des Labors für die Bereitschaft zu reibungsloser Zusammenarbeit und Disziplin bei der Nutzung der Geräte.

Großer Dank gebührt Herrn Dr. med. Michael Zacher für seine unschätzbare Hilfe bei allen Fragen der Statistik. Seine freundliche, großzügige Bereitschaft mir ein mir zunächst vollkommen rätselhaftes Wissensgebiet zu erschließen verdient besondere Erwähnung. Danke für eine völlig neue Erfahrung.

Ich danke meiner Familie dafür, dass sie meine Entscheidungen immer vertrauensvoll mitgetragen hat.

Mein besonderer Dank geht an meine Freunde, ohne deren Unterstützung kritischer, moralischer, fachlicher, freundschaftlicher und liebevoller Art ich manches Tief sicher nicht so schnell und hoffnungsvoll wieder verlassen hätte - insbesondere unter manchmal schwierigen Rahmenbedingungen: Frau Ursula E. Schuh, Herrn Karl Gamperling, Herrn Ralf Lichthardt, Frau Dr. med. Irmgard Karg, Frau Dr. med. Susanne Siebelt, Herrn Dr. med. Oliver Eisen und nicht zuletzt Herrn Sascha Korchidi Gilawai für die letzte Überarbeitung des Layouts.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Sabine Beate Maria Kollmann
Geburtsdatum	02. 10. 1968
Geburtsort	Augsburg
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	deutsch
Adresse	Eduard-Spranger-Str.35 72076 Tübingen

Schulausbildung

1975 - 1979	Grundschule am Frauentor, Augsburg
1979 - 1990	A. B. von Stetten Institut, Neusprachliches Gymnasium, Augsburg
1990	Abitur

Studium

1991 - 1998	Studium der Humanmedizin an der Julius- Maximilian-Universität Würzburg
-------------	--

Berufliche Tätigkeit

1998/1999	AiP in der Inneren Medizin, Heinz-Kalk- Krankenhaus, Bad Kissingen
2000-01	Institut für Röntgendiagnostik am Klinikum Ingolstadt
2001-2002	Institut für Röntgendiagnostik am St. Elisabeth- Krankenhaus Köln/ Hohenlind
seit 01.01.2003	Abteilung für Diagnostische Radiologie am Universitätsklinikum der Eberhard-Karls- Universität Tübingen

Tübingen, 04.04.2004