



universität
wien

DIPLOMARBEIT / DIPLOMA THESIS

Titel der Diplomarbeit / Title of the Diploma Thesis

„Ermittlung der Plasma- und Gewebeskonzentration von
Chinonen nach intravenöser und intraperitonealer
Verabreichung im Maus-Modell“

verfasst von / submitted by

Christina Vollmost

angestrebter akademischer Grad / in partial fulfilment of the requirements for the degree of
Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, 2019 / Vienna, 2019

Studienkennzahl lt. Studienblatt /
degree programme code as it appears on
the student record sheet:

A 449

Studienrichtung lt. Studienblatt /
degree programme as it appears on
the student record sheet:

Diplomstudium Pharmazie

Betreut von / Supervisor:

ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Martin Czejka

Eidesstaatliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne Benutzung anderer, als der angegebenen Hilfsmittel, angefertigt habe. Die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Die Arbeit wurde bisher in gleicher oder ähnlicher Form keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt und auch nicht veröffentlicht.

Wien, September 2019

Danksagung

Ich möchte mich sehr herzlich bei Herrn ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Martin Czejka für das interessante Diplomarbeitsthema und die gute Betreuung bedanken.

Außerdem möchte ich Frau Mag. Dr. Nairi Baroian und Frau Mag. Dr. Marie Kitzmüller für die Unterstützung bei der praktischen Arbeit und für das angenehme Arbeitsklima danken. Sie standen mir immer mit Rat und Tat zur Seite.

Besonders großer Dank gilt meiner Familie, die mir dieses Studium ermöglicht hat, ebenso meinem Freund, sowie Studienkolleginnen und Freundinnen, die mich immer unterstützt haben.

Inhaltsverzeichnis

1. Theoretischer Teil	1
1.1. Anthrachinone	1
1.2. Pharmakokinetik.....	2
1.2.1. Liberation	2
1.2.2. Resorption	2
1.2.3. Distribution	2
1.2.3.1. Organdurchblutung und Verteilung	3
1.2.3.2. Bindung und Speicherung im Gewebe	4
1.2.4. Metabolismus.....	5
1.2.5. Elimination	5
1.3. Pharmakologie	6
1.3.1. präklinische Prüfung	6
1.3.2. klinische Prüfung	7
2. Rationale	9
3. experimenteller Teil.....	10
3.1. Studiendesign	10
3.2. Versuchstierdaten	11
3.2.1. Serie 1	11
3.2.2. Serie 2	12
3.3. Analytik.....	14
3.3.1. Chemikalien und Reagenzien	14
3.3.2. Herstellung der Eluenten	15
3.3.3. Herstellung der Waschflüssigkeit	15
3.3.4. Herstellung der Lösungsmittel	15
3.4. Geräte und Materialien.....	15
3.4.1. HPLC	17
3.4.2. FORMplus.....	19

3.4.2.1. Durchführung des FORT-Test.....	20
3.4.2.2. Durchführung des FORD-Test	20
3.4.3. Reflotron	22
3.5. Herstellung des internen Standards für die Mausproben	24
3.6. Erstellung der Eichgerade mit SL 11 für die übrigen Tierorgane	24
3.6.1. Ergebnisse der Eichgerade.....	26
3.7. Vortests	26
3.8. Probendurchführung.....	29
3.8.1. SERIE 1: Mausproben: Plasma und Gewebeverteilung.....	29
3.8.2. SERIE 2: Mausproben: Plasma und Gewebeverteilung, i.p., i.v.	29
3.8.3. Gewebeproben: Herz, Leber, Hirn, Niere, Lunge	31
3.9. Software	32
4. Ergebnisse und Diskussion	33
4.1. Ergebnisse der Serie 1	33
4.1.1. Fort/Ford	33
4.1.2. Reflotron	35
4.1.3. Gewebeverteilung (i.v.)	37
4.2. Ergebnisse der Serie 2: Plasma und Gewebeverteilung (i.p., i.v.)	40
4.3. Ergebnisse der Gewebeproben von Hühnerherz, Schweineleber, -hirn, -niere und Rinderlunge	48
5. Zusammenfassung	60
6. Summary	61
7. Literaturverzeichnis.....	62
8. Abbildungsverzeichnis	65
9. Tabellenverzeichnis	68
10. Abkürzungsverzeichnis	69

1. Theoretischer Teil

1.1. Anthrachinone

Die seit Jahren steigende Resistenz zahlreicher Erreger gegen Antibiotika ist mittlerweile eine der Hauptgefahren für die Gesundheit.

Die Firma SeaLife Pharma entwickelt deshalb Wirkstoffe gegen Krankheitserreger, gegen die herkömmliche Antibiotika keine Chance haben. Dabei verwendet das Unternehmen Bakterien oder Pilze aus Korallen, Schwämmen oder Algen. Die Wirkstoffe werden gesammelt, isoliert, fermentiert, beziehungsweise kultiviert und extrahiert. Danach hat man eine Struktur, die anschließend chemisch nachgebaut und für die Anwendung am Menschen angepasst wird. [1]

Im Rahmen dieser Diplomarbeit werden präklinische pharmakokinetische Informationen über potentiell wirksame Anthrachinone der Firma SeaLife Pharma eingeholt und die Plasma- und Gewebekonzentration von Chinonen ermittelt.

Die untersuchten Testsubstanzen haben eine Anthrachinongrundstruktur und unterscheiden sich nur durch ihre Reste an den phenolischen Ringen.

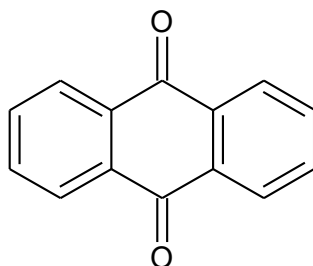


Abbildung 1: Grundstruktur Anthrachinone

Alle Verbindungen sind photosensibel, stark lipophil und daher schlecht wasserlöslich. In ACN bzw. DMSO sind sie sehr gut löslich, weshalb bei den durchgeführten Versuchen auch hauptsächlich mit diesen beiden Lösungsmitteln gearbeitet wurde. [2]

1.2. Pharmakokinetik

Die Pharmakokinetik beschreibt die:

Freisetzung (Liberation),

Aufnahme (Resorption),

Verteilung (Distribution),

Verstoffwechslung (Metabolismus bzw. Biotransformation) und

Ausscheidung (Elimination) von Arzneistoffen. [3]

1.2.1. Liberation

Die Liberation ist die Freisetzung des Wirkstoffes aus der Tablette oder einer anderen Darreichungsform. [3]

1.2.2. Resorption

Die Resorption von Arzneistoffen ist deren Aufnahme in die Blutbahn oder in das Lymphgefäßsystem, von wo aus sie zum Ort ihrer Wirkung, den Zellen von Organen gelangen. [4]

Die wichtigsten Resorptionsorte sind die Haut, das Muskelgewebe (bei intramuskulärer Applikation), der Atmungstrakt (bei Inhalation), die Mundschleimhaut (bei sublingualer Applikation) und der Magen-Darm-Trakt (bei oraler Applikation). [5]

Die Geschwindigkeit der Resorption ist nur bei einer akuten Arzneitherapie von Bedeutung. Zum Beispiel wünscht man sich bei einem Kopfschmerzanfall eine rasche Resorption des Arzneimittels zur Schmerzbefreiung.

Bei der chronischen Arzneitherapie ist die Geschwindigkeit der Resorption bedeutungslos. Für die Wirksamkeit einer chronischen Arzneitherapie sind nur die Dosis und das Dosisintervall ausschlaggebend. [5]

1.2.3. Distribution

Ist das Pharmakon in die Blutbahn gelangt, wird es im Gefäßsystem mit dem Blutstrom verteilt. [6]

Dabei ist die an den Wirkort gelangende Menge, bezogen auf die applizierte Dosis, meist gering. Das Pharmakon kann zudem im Plasma und in den Körpergeweben gebunden oder gespeichert werden. [7]

Nach seinen physikochemischen Eigenschaften wird sich ein Stoff entweder in Lipidstrukturen oder in wässrigen Körperräumen verteilen. Bei hoher Lipidlöslichkeit eines Stoffes wird sich dieser im Gehirn anreichern. Stoffe mit niedriger Lipid-, aber hoher Wasserlöslichkeit können nicht ins Zentralnervensystem gelangen. Der Prozess der Verteilung ist bei der vorgeschriebenen Dosierung jedes Arzneimittels berücksichtigt. [5]

1.2.3.1. Organdurchblutung und Verteilung

Nach einer i.v. Injektion gelangt ein Pharmakon mit dem Blutstrom zunächst bevorzugt in die am stärksten durchbluteten Organe. [7]

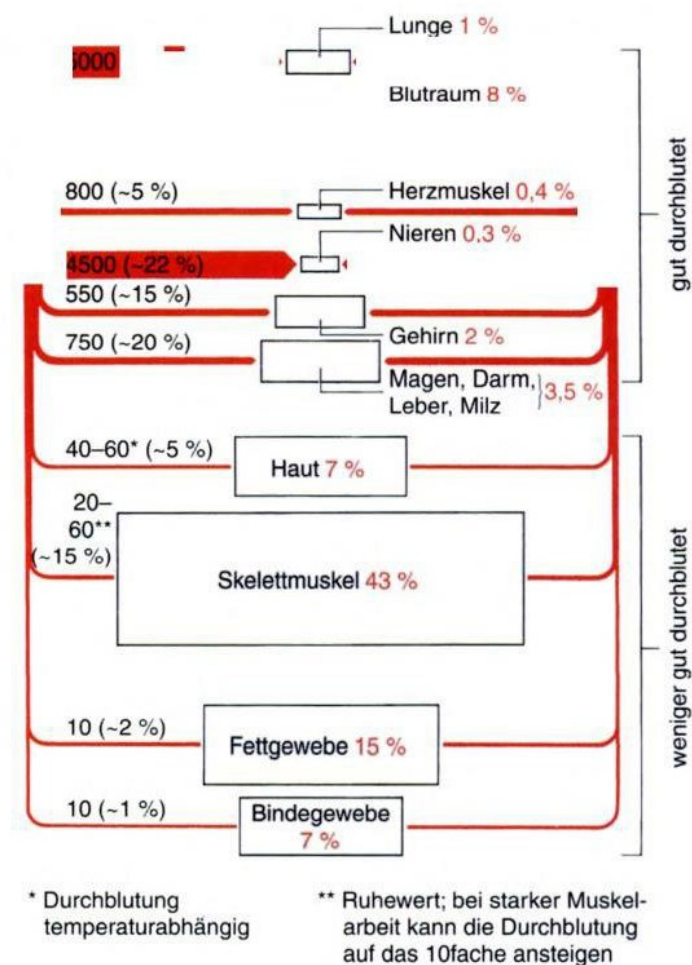


Abb. 2: Durchblutung verschiedener Organe sowie Anteil dieser Organe am Körpergewicht
 Organdurchblutung in ml min⁻¹ x kg⁻¹ (schwarze Zahlen). Der prozentuale Anteil am Herzminutenvolumen ist daneben in Klammern aufgeführt. Die roten Zahlen neben den Organbezeichnungen geben den Anteil des Organs am Körpergewicht wieder. Die grauen Flächen

veranschaulichen die relativen Größenverhältnisse. (Die Werte wurden aus stark voneinander abweichenden Literaturangaben gemittelt und können daher nur ein ungefähres Bild der Größenordnungen vermitteln.)

Die Darstellung zeigt, dass im großen Kreislauf über 60% des Herzzeitvolumens durch gut durchblutete Organe wie Herzmuskel, Nieren, Gehirn, Milz, Leber und Magen-Darm-Trakt fließen, obwohl diese Organe zusammen nur 6% des Körpergewichts ausmachen. Dagegen fließen durch die weniger gut durchbluteten Organe Haut, Skelettmuskel, Fett- und Bindegewebe, die über 70% des Körpergewichts ausmachen, nur 23% des Herzzeitvolumens. [7]

1.2.3.2. Bindung und Speicherung im Gewebe

Die meisten Pharmaka werden im Plasma in mehr oder weniger hohem Ausmaß reversibel an Proteine gebunden.

Außer an Plasmaproteine können Pharmaka auch erheblich an Gewebe gebunden werden. Berücksichtigt man, dass alleine die Muskulatur ca. 40 % des Körpergewichtes ausmacht, so wird verständlich, dass der Gewebefixierung theoretisch eine größere quantitative Bedeutung zukommt als der Plasmaproteinbindung.

Da sich die Gewebefixierung aber zumindest beim Menschen experimentell nur schwer bestimmen lässt, ist darüber nicht viel bekannt. Es hat sich gezeigt, dass sich die Bindung der meisten Pharmaka im Gewebe nicht durch eine Bindung an das extravaskuläre Albumin (das 50 – 60% des gesamten Albuminpools ausmacht) erklären lässt.

Pharmaka können an eine Vielzahl von Gewebeproteinen (z.B.: kontraktile Proteine der Muskulatur oder Glutathion-S-Transferase der Leber) und an Membranphospholipide (Zellmembranen, endoplasmatisches Reticulum) gebunden werden. Rückschlüsse von der Plasmaprotein- auf die Gewebefixierung sind daher meist nicht möglich. [7]

Bei verminderter Plasmaproteinbindung werden in vielen Fällen die Arzneistoffmoleküle, die freigesetzt werden, nicht im Plasma bleiben, sondern sich bis zur Gleichgewichtseinstellung ins Gewebe verteilen. Solange das Verteilungsvolumen des Arzneistoffs groß ist, d.h. sich nur wenige Arzneistoffmoleküle im Plasma, aber viele im Gewebe befinden, ist die absolute Zahl der aus der Proteinbindung freisetzbaren Arzneistoffmoleküle nur gering. Daraus ergibt sich, dass die ungebundene Plasmakonzentration (C_u), die ungebundene Gewebekonzentration ($C_{u,T}$) sowie die Arzneistoffbindung an die pharmakodynamisch wirksamen Rezeptoren weitgehend konstant bleiben. Jeder leichtere Anstieg in der ungebundenen Arzneistoffkonzentration wird außerdem durch eine erhöhte

Elimination (Metabolisierung und/oder Exkretion) ausgeglichen, da die Eliminationsleistung (Clearance) durch den ungebundenen Anteil beeinflusst wird. [8]

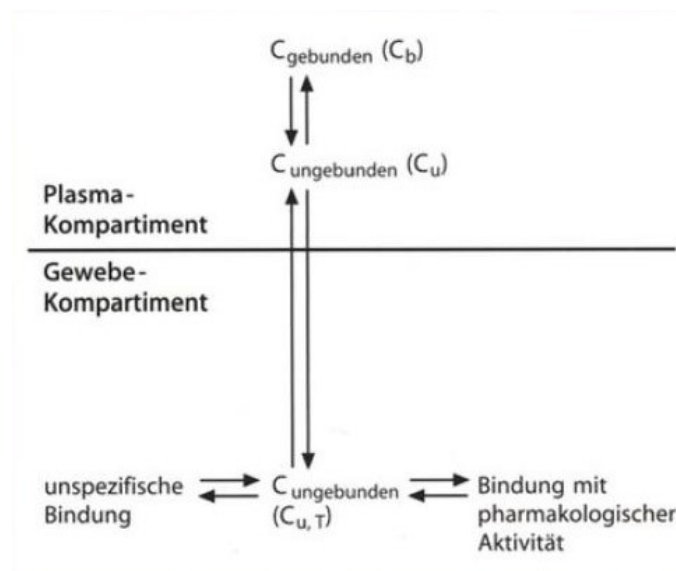


Abb. 3: Gleichgewicht zwischen gebundenen und ungebundenen Arzneistoffkonzentrationen im Plasma und Gewebe [8]

1.2.4. Metabolismus

Unter Metabolisierung versteht man den Umbau der Ausgangssubstanz durch enzymatisch-biochemische Prozesse. Hierdurch sollen Produkte gebildet werden, die der Organismus ausscheiden kann. [9]

Der Metabolismus der Arzneistoffe erfolgt hauptsächlich in der Leber und in der Darmschleimhaut. [5]

1.2.5. Elimination

Die Ausscheidung eines Pharmakons bzw. seiner Abbauprodukte (Metaboliten) führt zur Abnahme der Wirkstoffkonzentration im Körper.

Sie kann in Abhängigkeit von den physikalisch-chemischen Eigenschaften (Molekulargewicht, pKa-Wert, Löslichkeit, Dampfdruck) der auszuscheidenden Substanz renal (über die Niere mit dem Urin), biliär (mit der Galle) und intestinal (mit den Fäzes) oder pulmonal (über die Lunge mit der Ausatemungsluft) erfolgen.

Der Ausscheidung von Pharmaka durch die Haut kommt nur eine geringe Bedeutung zu. [10]

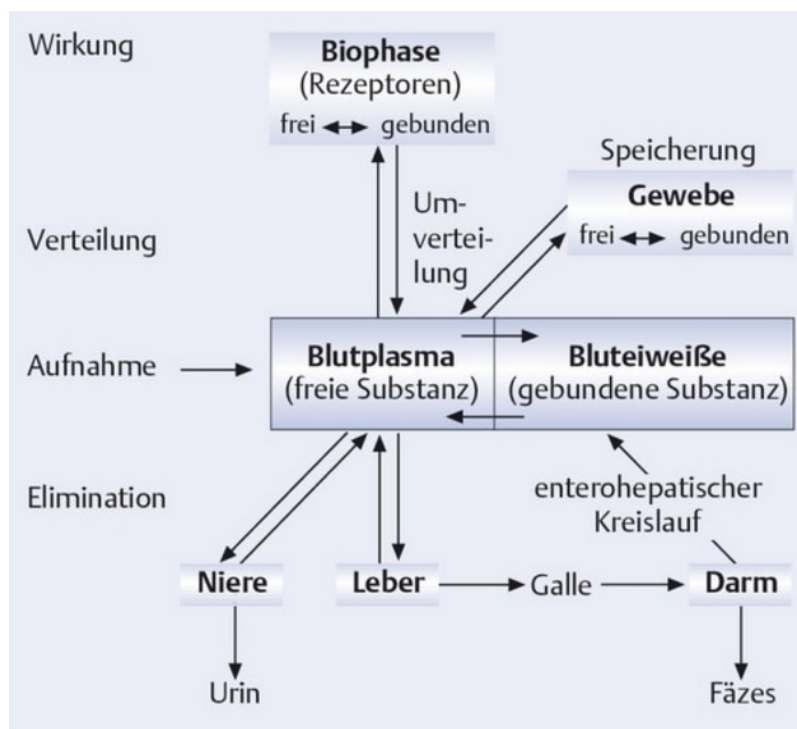


Abb. 4: Weg eines Pharmakons durch den Organismus [9]

1.3. Pharmakologie

1.3.1. präklinische Prüfung

Bei der präklinischen Prüfung wird die Substanz zuerst an Zellkulturen und isolierten Zellen und Organen getestet.

Wenn möglich werden auch biochemisch-pharmakologische Untersuchungen durchgeführt, um Rezeptor-Bindungseigenschaften identifizieren zu können.

Um die Giftigkeit bei akuter bzw. chronischer Anwendung herauszufinden, werden auch toxikologische Untersuchungen gemacht. Dabei wird auch besonderer Wert auf mögliche Mutagenität (Erbgutschädigung), Kanzerogenität (krebserzeugende Wirkung) und Teratogenität (Missbildungsauslösung) gelegt.

Die präklinischen Studien schließen mit Tierversuchen ab. Dabei werden die gewünschte Wirkung, möglicherweise fatale Nebenwirkungen und die Pharmakokinetik des Arzneistoffes getestet und beobachtet.

Die präklinische Phase sollte in einer Zeit von unter sechs Jahren abgeschlossen sein. [11]

Die Resultate dieser präklinischen Studien und sich daraus ergebende Risiken müssen dem Leiter der klinischen Prüfung bekannt und beim Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte hinterlegt sein. Ein detaillierter Prüfplan muss erstellt werden, der vor Beginn der Studie einer unabhängigen Ethikkommission zur Bewertung vorgelegt wird. Erst nach deren positivem Votum darf ein Arzneimittel am Menschen getestet werden. [12]

1.3.2. klinische Prüfung

Die klinische Prüfung teilt sich in vier Phasen und soll wichtige Informationen über Langzeittoxikologie, pharmakokinetische und pharmakologische Parameter, Dosierungen und Verträglichkeit liefern. [11]

Phase I

In Phase I erfolgt erstmals der Einsatz einer Substanz beim Menschen. Im Vordergrund stehende Untersuchungsziele sind die Gewinnung von Daten zur Verträglichkeit und Pharmakokinetik des Arzneimittels, in der Regel bei 20-50 gesunden Versuchspersonen. [13]

Phase II

Die Phase II (therapeutisch-exploratorisch) untersucht die Wirkung im geplanten Indikationsgebiet. Dabei erfolgt die Gabe der Prüfsubstanz zunächst unter Kurzzeitanwendung in ca. 2-3 Studien pro Indikation an einer begrenzten Anzahl von bis zu 100 Patienten. Danach können vergleichende Prüfungen zur Dosisfindung und zur Erfassung von Dosis-Wirkungs-Beziehungen und zur Verträglichkeit bei zum Teil mehreren hundert Patienten begonnen werden. [14]

Phase III

Phase III gestaltet sich finanziell und zeitlich weit aufwändiger als die Prüfungen zuvor. [11]

Diese Phase umfasst eine große Patientenzahl (> 1000) und dient dem Nachweis der Wirksamkeit und der Unbedenklichkeit. Studien der Phase III werden entweder gegen eine Placebothherapie oder die bisher wirksamste Arzneimitteltherapie durchgeführt. [15]

Phase IV

Die Phase IV (Produktbeobachtungsphase) schließt sich nach der Zulassung an. In dieser Phase sollen die Erkenntnisse über den therapeutischen Wert des Arzneimittels im Rahmen des bestimmungsgemäßen Gebrauchs des bereits zugelassenen Arzneimittels vertieft werden. Es wird beobachtet, ob sich die Erfahrungen aus der klinischen Prüfung bei breiter Anwendung des Arzneimittels bestätigen. [16]

2. Rationale

Ziel dieser Diplomarbeit war es, präklinische pharmakokinetische Informationen über potentiell wirksame Anthrachinone der Firma SeaLife Pharma zu erhalten.

Es wurde die Plasma- und Gewebeskonzentration von Chinonen einerseits nach intravenöser bzw. intraperitonealer Verabreichung im Mausmodell ermittelt. Andererseits die Verteilung der Substanz in verschiedenen tierischen Organen wie Herz, Leber, Hirn, Niere, Lunge festgestellt.

3. experimenteller Teil

3.1. Studiendesign

Die Proben der Versuchstiere (Mäuse) wurden vom Institut für Pharmakologie und Toxikologie der medizinischen Universität Wien (1090 Wien, Schwarzspanierstraße) bereitgestellt und an der Division für klinische Pharmazie und Diagnostik analysiert.

Die übrigen Tierorgane wie Hühnerherz, Schweineleber, Schweinehirn, Schweineniere und Rinderlunge wurden handelsüblich bezogen.

3.2. Versuchstierdaten

3.2.1. Serie 1

Tabelle 1: Versuchstierdaten der Serie 1

Maus	1	2	3	4	5	6
Geschlecht	m	m	m	m	m	m
Gewicht (g)	28,4	29,8	30,4	29,8	27,0	29,7
Substanz	SL 19	SL 19	SL 11	SL 11	Kontrolle	Kontrolle
Methode	i.v.	i.v.	i.v.	i.v.	i.v.	i.v.
Dosis (mg/kg)	30	30	30	30	–	–
Solvent	30% KZI + 70% RL 0,09 ml	30% KZI + 70% RL 0,09 ml	30% KZI + 70% RL 0,06 ml	30% KZI + 70% RL 0,06 ml	30% KZI + 70% RL 0,08 ml	30% KZI + 70% RL 0,09 ml
Anästhetikum	Isofluran	Isofluran	Isofluran	Isofluran	Isofluran	Isofluran
Gewicht Lunge (mg)	200	180	190	220	200	220
Gewicht Leber (mg)	200	220	210	220	210	210
Gewicht Niere (mg)	180	170	170	190	170	170
Urin Volumen	80 µl x 1,5=120 µl ACN	80 µl x 1,5=120 µl ACN	80 µl x 1,5=120 µl ACN	80 µl x 1,5=120 µl ACN	80 µl x 1,5=120 µl ACN	80 µl x 1,5=120 µl ACN
Plasma nach 16-24 h	270 µl -130µl ACD	270 µl -130µl ACD	350 µl -130µl ACD	350 µl -130µl ACD	400 µl -130µl ACD	400 µl -130µl ACD
nach ~ 16 h	80µl + 120µl ACN	80µl + 120µl ACN	80µl + 120µl ACN	80µl + 120µl ACN	–	–
nach ~ 20 h	–	–	–	–	80µl + 120µl ACN	80µl + 120µl ACN

3.2.2. Serie 2

Tabelle 2: Versuchstierdaten der Serie 2

Maus	1	2	3	4	5	6	7
Geschlecht	m	m	m	w	w	w	w
Gewicht (g)	24,8	26	26.2	18.4	18.3	25	18.3
Substanz	SL 11	SL 11	SL 11	SL 23	SL 23	SL 23	Kontrolle
Methode	i.p.	i.p.	i.p..	i.p.	i.p.	i.v.	–
Dosis (mg/kg)	20	20	20	20	20	20	–
Solvent	KZI-Mix 0,2 ml	KZI-Mix 0,21 ml	KZI-Mix 0,21 ml	KDI2,2-Mix 0,15 ml	KDI2,2-Mix 0,15 ml	KDI2,2-Mix 0,2 ml	–
Anästhetikum	Isofluran	Isofluran	Isofluran	Isofluran	Isofluran	Isofluran	Isofluran
Gewicht Lunge (mg)	200	190	150	160	140	210	160
Gewicht Leber (mg)	220	230	220	220	200	200	230
Gewicht Niere (mg)	180	180	170	110	120	150	110
Urin Volumen	–	–	80	–	70	–	–
Plasma nach 30 min	270 µl (1:10 mit ACD verdünnt) 80µl	170 µl (1:10 mit ACD verdünnt) 80µl	200 µl (1:10 mit ACD verdünnt) 80µl	140 µl (1:10 mit ACD verdünnt) 80µl	160 µl (1:10 mit ACD verdünnt) 80µl	220 µl (1:10 mit ACD verdünnt) 80µl	

Plasma nach 120 min	160 µl (1:10 mit ACD verdünnt) 80µl	240 µl (1:10 mit ACD verdünnt) 80µl	350 µl (1:10 mit ACD verdünnt) 80µl	190 µl (1:10 mit ACD verdünnt) 80µl	200 µl (1:10 mit ACD verdünnt) 80µl	180 µl (1:10 mit ACD verdünnt) 80µl	
Plasma Volumen							250 µl (1:10 mit ACD verdünnt) verklumpt! (gelartig) nicht analysierbar!

Maus 1-6: die Entnahme von mehr als 80 µl Plasma war nicht möglich, da das Plasma gelartig verklumpt ist!

(Maus 6: Die erste Maus ist nach der Injektion gestorben → beim 2. Versuch hat die Maus überlebt, war aber kaum bei Bewusstsein).

3.3. Analytik

3.3.1. Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 3: verwendete Substanzen

Substanzen	Hersteller
SL 11	SeaLife Pharma GmbH
SL 19	SeaLife Pharma GmbH
SL 22	SeaLife Pharma GmbH
SL 23	SeaLife Pharma GmbH

Die Benennung der Substanzen erfolgt aus patentrechtlichen Gründen mit „SL“ und einer Zahl, wobei „SL“ für die Herstellungsfirma SeaLife Pharma steht.

Tabelle 4: verwendete Chemikalien und Reagenzien

Chemikalien und Reagenzien	Hersteller
Acetonitril >99,9%	Chem-Lab
Aqua destillata	Department für Pharmakognosie, Universität Wien
Dimethylsulfoxid >99,9%, D4540	Sigma-Aldrich
Essigsäure >99,9%, 338826	Sigma-Aldrich
FORD Reagenzien: R1=Chromogen	Callegari
R2=Puffer	Callegari
FORT Reagenzien: C1=Chromogen	Callegari
S1=hyperosmolarer Puffer	Callegari
S2=Acetat Puffer pH 5,2	Callegari
S3=Eisenlösung	Callegari
Phosphatpuffertablette	Sigma-Aldrich

3.3.2. Herstellung der Eluenten

Eluent A

Essigsäure:Wasser = 1:1000

Es werden 999 ml destilliertes Wasser in eine 1 Liter Flasche übergeführt und danach 1 ml Essigsäure zugegeben.

Eluent B

Essigsäure:ACN = 1:1000

Es werden 999 ml ACN in eine 1 Liter Flasche übergeführt und danach 1 ml Essigsäure zugegeben.

Die Eluenten werden auf einem Magnetrühren 2-3 min durchmischt und anschließend 30 min ins Ultraschallbad gestellt.

3.3.3. Herstellung der Waschflüssigkeit

dest. Wasser:ACN = 20:80

Es werden 200 ml destilliertes Wasser und 800 ml ACN gemischt, auf einem Magnetrührer durchmischt und für 30 min ins Ultraschallbad gestellt.

3.3.4. Herstellung der Lösungsmittel

PBS

1 Tablette „phosphate buffered saline“ wird in 200 ml destilliertem Wasser gut gelöst und 60 min auf einem Magnetrührer durchmischt.

3.4. Geräte und Materialien

Tabelle 5: verwendete Geräte und Materialien

Geräte und Materialien	Bezeichnung	Hersteller
Analysenwaage	Sartorius handy	Sartorius Mechatronics Austria GmbH

Einmal-Latexhandschuhe		Merck VWR International
Eppendorf Gefäße	Micro Tubes, 1,5 ml, Plastibrand	BRAND GmbH, Deutschland
Eppendorf Pipetten (verschiedene Größen)	2-20µl, 20-200µl, 100-1000µl	Research Plus
Eppendorf Pipettenspitzen	Universal; gelb: 2-200µl, blau: 50-1000µl	Merck VWR International
FORM Messgerät	CR 3000	Callegari
Gewebehomogenisator	Minilys	bertin technologies
Heizblock	Dri-Block®	Techne
HPLC Mikrovials		Biolab GmbH
HPLC Vials		Biolab GmbH
HPLC-Anlage Hitachi Chromaster		Merck VWR International
HPLC-Anlage 2		Merck Hitachi LaChrom
Kühlzentrifuge	EBA 12R	Hettich ZENTRIFUGEN
Magnetrührer	MR 3001 K	Heidolph Instruments GmbH & Co KG
Parafilm	Laboratory Film „M“	Bemis Company
Pasteurpipette aus Glas	150 mm	Merck VWR International
Pipettensauger		
Reflotron® IV		Boehringer Mannheim GmbH
Schüttler	Vortex Mixer	VELP® Scientifica
Sezierbesteck		Labor Siebert
Ultraschallbad	Bandelin Sonorex	BANDELIN electronic GmbH & Co KG
Zentrifuge (groß)	Labofuge 400 FUNCTION Line	Heraeus Instruments GmbH
Zentrifuge (klein)	Galaxy 16 DH	Merck VWR International

3.4.1. HPLC

Die Substanzen werden mit Hilfe der Umkehrphasen-Chromatographie analysiert. Dies bedeutet, dass die stationäre Phase weniger polar ist als die mobile Phase. Probesubstanzen werden von der Umkehrphasen-Oberfläche umso stärker festgehalten, je weniger sie in Wasser löslich, d.h. je unpolarer sie sind. [17]

In der Umkehrphasenchromatographie werden die polaren Verbindungen zuerst eluiert und je polarer die mobile Phase eingestellt worden ist, desto stärker werden die unpolaren Komponenten zurückgehalten. [18]

Als Elutionsmethode für die mobile Phase wurde die Gradientenelution gewählt. Dabei wird die Zusammensetzung der mobilen Phase mit der Zeit verändert. Daraus resultiert eine permanente Verstärkung der Wechselwirkung zwischen Eluent und stationärer Phase. [19]

Tabelle 6: Daten der HPLC 4 – Anlage

HPLC	Merck, VWR HITACHI Chromaster
Auto Sampler	5210, Temperatur 16 °C
Vorsäule	Nukleosil LiChrospher 100 RP-18, 5 µm, LiChroCART Merck Hitachi
Trennsäule	Zorbax Eclipse XDB-C8, 250 x 4,6 mm ID 5 µm, Agilent Technologies
Säulenofen	5310
Säulentemperatur	36 °C
Druck	28 bar
Flussrate	0,5 ml/min
Injektionsvolumen	40 µl
UV Detektor	5410
Wellenlänge	235/270 nm
Pumpe	5110
Analysezeit	42/45 min
Software	HP Compaq LA1951g

Tabelle 7: Daten der HPLC 2 – Anlage

HPLC	Merck Hitachi LaChrom
Auto Sampler	L-7200 La Chrom
Vorsäule	LiChrospher 100 RP-18, 20x4,6mm, 5µm
Trennsäule	Zorbax Eclipse XDB-C8, 250 x 4,6 mm ID 5 µm, Agilent Technologies
Säulenofen	L-7300
Säulentemperatur	36 °C
Eluent	Gradientenelution
Druck	10–200 bar
Flussrate	0,5 ml/min
Injektionsvolumen	20 µl
UV Detektor	L-7400 La Chrom
Wellenlänge	270 nm
Pumpe	L-7120 La Chrom
Analysezeit	45 min
Kühler	Peltier Sample Thermostat



Abbildung 5: HPLC 2

3.4.2. FORMplus

Das FORMplus ist ein Photometer zur Messung der freien Radikale (FORT Test) und der antioxidativen Kapazität (FORD Test).

Das gesamte System verwendet nasschemische gebrauchsfertige Reagenzien (FORT-, FORD-, Harnsäure-, Hämoglobin- und Hämatokrit-Testkits), sowie einen speziellen Hightech-Photometer. Das Gerät basiert auf monochromatischer Lichtabsorption, welche die Farbveränderung der Probe im Küvettenschacht misst.

Bei Erreichen von 37 °C wird die Temperatur für die gesamte Dauer des Einschaltens konstant gehalten und das FORMplus ist nun bereit, um den Test jederzeit durchzuführen. [20]

Tabelle 8: technische Daten FORMplus

Messprinzip	Absorption (Lambert-Beersches-Gesetz)
Temperatur Messzelle	37 +/- 0.2 °C
Lichtquelle	LED, Light Emitting Diode, 505 nm
Optischer Weg	1 cm
Display	Touch Screen, 128x128 Pixel
Gewicht	ca. 1.1 kg
Maße	255 Breite x 273 Länge x 74 Höhe mm
Strom	90-260 V AC 50-60 Hz
Energieabsorption	max. 45 Watt
Arbeitsbedingungen	15 – 34 °C
Zertifizierung	CE-Zeichen



Abbildung 6: FORMplus Gerät



Abb. 7: Küvette

3.4.2.1. Durchführung des FORT-Test

20 µl Plasma entnehmen und in die mit Reagenz gefüllte Mikrovette R2 geben und diese fest schließen.

Die Mikrovette vorsichtig hin und her schwenken bis die Lösung, die im Inneren der Kapillare zu sehen ist, dieselbe Farbe aufweist wie die Flüssigkeit in der Mikrovette.

Danach den gesamten Inhalt der Mikrovette in die quadratische Küvette R1 gießen, die das Chromogenlyophilisat enthält und den Inhalt vorsichtig mischen, bis sich das Reagenzlyophilisat vollständig aufgelöst hat. Die Küvette muss an den nicht gerippten Seiten ganz sauber bleiben.

Nun die Küvette mit einer der gerippten Seiten nach oben in die Zentrifuge geben und eine Minute zentrifugieren. Die „Ausgleichsküvette“, die mit der Zentrifuge mitgeliefert wird, muss gegenüber liegen. Nach Beendigung der Zentrifugation die Küvette (am Schraubverschluss halten, damit sich keine Abdrücke oder Verschmutzungen auf den blanken Seiten abzeichnen können!) vorsichtig in den Küvettenschacht des FORM Messgerätes einsetzen, wobei das Barcode-Etikett nach vorne zeigen muss.

Das Testen beginnt automatisch, nachdem die Küvette in die Messzelle gesetzt wurde. Das Gerät führt eine Messung nach drei Minuten und erneut nach weiteren drei Minuten durch; nach deren Ablauf wird das Ergebnis angezeigt. Nach der Messung wird die Küvette entnommen und entsorgt.

Es wird die Absorptionsdifferenz ermittelt und daraus der Fort Wert berechnet. [20]

3.4.2.2. Durchführung des FORD-Test

Es werden 50 µl Plasma in die Mikrovette S1 gegeben und vorsichtig durch wiederholte Umkehrung geschwenkt.

Anschließend eine Minute zentrifugieren. Darauf achten, dass die „Ausgleichsmikrovette“ gegenüber eingesetzt ist. Die zentrifugierte Mikrovette vorsichtig ohne zu schütteln entnehmen.

Danach gibt man den Inhalt der farbigen Mikrovette S2 in die quadratische Küvette C1.

Dann werden 50 µl des Reagenz S3 der Küvette hinzugefügt und einige Sekunden geschwenkt, um das Chromogen aufzulösen.

Die Küvette in den Küvettenschacht des FORMplus Gerätes, mit dem Barcodeetikett nach vorne zeigend, setzen. Die erste Messung dauert vier Minuten (= 1. Messung).

Danach die Küvette herausnehmen und 100 µl des zentrifugierten Überstands (= Serum) hinzufügen.

Die Küvette verschließen, mehrfach schwenken und unverzüglich in den Küvettenschacht des FORMplus Gerätes, mit dem Barcodeetikett nach vorne zeigend, setzen.

Das Ergebnis wird nach zwei Minuten angezeigt (= 2. Messung). [20]

Tabelle 9: Referenzwerte der mit FORMplus messbaren Parameter (human) [20]

PARAMETER	NORMALWERTE
FORT	bis zu 310 FORT Einheiten – 2.36 mmol/l H ₂ O ₂
FORD	1.07 – 1.53 mmol/l Trolox

3.4.3. Reflotron

Tabelle 10: technische Daten Reflotron [21]

Messprinzip	Reflexionsmessung mit Ulbrichtscher Kugel nach dem Kompensationsprinzip über einen Referenzstrahl
Messtemperatur	37.0 ° C ± 0.1 ° C
Lichtquellen	Lichtemittierende Dioden (LED's)
Lichtempfänger	Photodioden (2)
Umgebungsbedingungen im Betrieb	Temperatur: 15 °C bis 34 °C, relative Luftfeuchtigkeit max. 95 %
Abmessungen	ca. 300 x 350 x 195 mm
Gewicht	ca. 5.8 kg



Abb. 8: Reflotron

Mit Hilfe des Reflotrons können 17 Parameter aus Vollblut, Plasma oder Serum bestimmt werden – darunter Leber- und Pankreasenzyme, Stoffwechselprodukte, Blutfette, Hämoglobin und Kalium. [22]

Im Rahmen dieser Diplomarbeit werden ALP, GGT, GOT und GPT gemessen.

Die Probe braucht weder speziell vorbereitet noch behandelt zu werden. Es müssen keine Reagenzien hergestellt werden und das Gerät bedarf keiner Kalibrierung.

Auf den Teststreifen wird 32 µl Probe aufgetragen und in die Reflotron Messkammer eingeführt.

Ein testspezifischer magnetischer Code erkennt die relevanten Parameter.

Alle weiteren Vorgänge werden von dem Gerät automatisch innerhalb von 2 bis 3 Minuten ausgeführt. Die Ergebnisse werden auf dem Display angezeigt. [22]

Tabelle 11: Referenzwerte ALP, GGT, GOT, GPT (human) [23]

PARAMETER	REFERENZWERTE	
ALP	♂ 40 – 129 U/l	0,67 – 2,15 µkat/l
	♀ 35 – 104 U/l	0,58 – 1,74 µkat/l
GGT	♂ 10 – 71 U/l	0,67 – 2,15 µkat/l
	♀ 6 – 42 U/l	0,58 – 1,74 µkat/l
GOT	♂ < 40 U/l	< 0,67 µkat/l
	♀ < 33 U/l	< 0,55 µkat/l
GPT	♂ < 41 U/l	< 0,68 µkat/l
	♀ < 32 U/l	< 0,53 µkat/l

3.5. Herstellung des internen Standards für die Mausproben

Zur Herstellung des internen Standards werden 1 mg/ml SL 23 in 32%igem DMSO/PBS gelöst. Davon werden 10 µl zu einer 1200 µl Lösung pipettiert. Somit ergibt sich eine Verdünnung von 5 µg/ml.

Die 1200 µl Lösung setzt sich aus 200 mg Gewebe, 300 µl PBS und 700 µl ACN zusammen.

3.6. Erstellung der Eichgerade mit SL 11 für die übrigen Tierorgane

a) mit 32%igem DMSO/PBS

Die Substanz SL 11 liegt in Pulverform vor und wird in 32%igem DMSO/PBS gelöst, sodass man eine Stammlösung mit der Konzentration 1mg/ml erhält.

Anschließend werden fünf unterschiedliche Konzentrationen hergestellt:

Man überführt 125 µl Stammlösung in eine Eprovette und pipettiert 2375 µl Leer-Plasma dazu. So erhält man eine Mischung von 2,5 ml mit einer Konzentration von 50,0 µl/ml.

Danach muss man unbedingt vortexen, sodass die Lösung gut durchmischt ist. Es wird 1 ml in eine Eprovette pipettiert, in der 1 ml Leer-Plasma vorgelegt ist. Nach diesem Schritt wird wieder gevortext und anschließend wird davon wieder 1 ml entnommen und in eine Eprovette, in der 1 ml Leer-Plasma vorgelegt ist pipettiert.

Die Schritte werden fünfmal wiederholt, wobei der letzte entnommene Milliliter verworfen wird.

So erhält man am Schluss fünf unterschiedliche Konzentrationen:

- 50,000 µg/ml
- 25,000 µg/ml
- 12,500 µg/ml
- 6,250 µg/ml
- 3,125 µg/ml

Nachdem diese Konzentrationen hergestellt sind, werden die Proteine gefällt, indem man aus jeder Verdünnung 250 µl entnimmt, sie in ein Eppendorf Gefäß pipettiert und mit 625 µl ACN versetzt. (Der Faktor für die Proteinfällung mit ACN ist 2,5 $\rightarrow$ 250 µl x 2,5 = 625 µl)

Anschließend wird gevortext und 3,5 Minuten bei 10.000 U/min zentrifugiert. Die Eluate werden mit Hilfe von Mikroeinsätzen in Autosampler vials pipettiert und mit Hilfe der HPLC analysiert.



Abb. 9: Vortex

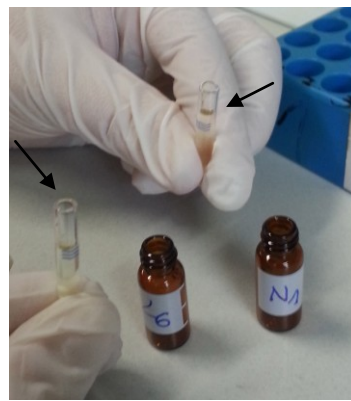


Abb. 10: Mikroeinsätze



Abb. 11: befüllte vials bereit zur HPLC-Analyse

3.6.1. Ergebnisse der Eichgerade

In der folgenden Abbildung wird das Ergebnis der Eichgerade dargestellt:

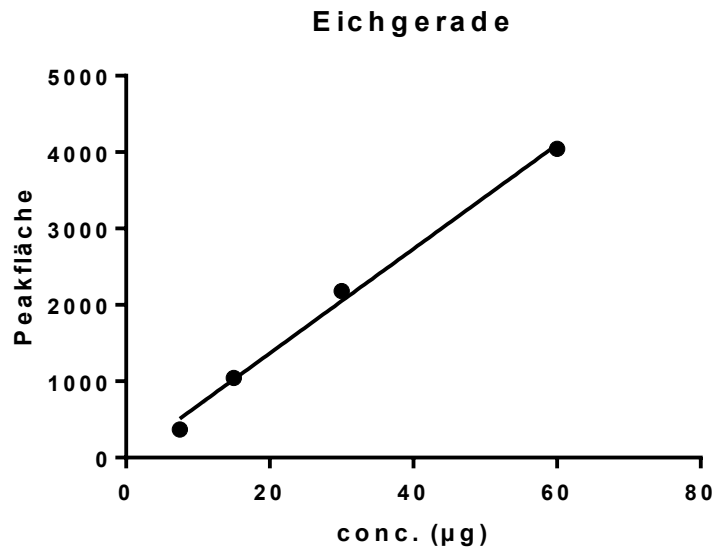


Abbildung 12: Eichgerade

Tabelle 12: Statistische Parameter der Eichgerade

Best fit values	
Slope	68,34 ± 1,7145
95% Confidence Intervals	
Slope	62,88 to 73,795
Goodness of Fit	
R square	0,9947
Data	
Number of XY Pairs	4

3.7. Vortests

Bevor Tests an den Mäuseproben durchgeführt werden, werden Vortests mit einer Leber aus dem Supermarkt gemacht.

Einerseits werden zwei verschieden gefüllte Probengefäße des Homogenisators MINILYS® getestet. Eines enthält Stahlkügelchen Ø 2,8 mm (= **MK28R**), das andere Keramikkügelchen Ø 1,4 mm (= **CK14**).



Abb. 13: Minilys



Abb. 14: Probengefäße mit Keramik Kügelchen

Andererseits werden Versuche bezüglich der Reihenfolge in der die einzelnen Bestandteile zugegeben werden durchgeführt:

Methode 1:

Je zirka 200 mg Leber wird in CK14 und CK28R gegeben und mit 10 µl internem Standard und 300 µl PBS versetzt, anschließend wird mit Hilfe des MINILYS® 3 x 30 sec auf höchster Stufe homogenisiert. Man pipettiert 700 µl ACN dazu und vortext. Danach wird zentrifugiert.

Methode 2:

Je zirka 200 mg Leber wird in CK14 und CK28R gegeben und mit 300 µl PBS versetzt, anschließend wird mit Hilfe des MINILYS® 3 x 30 sec auf höchster Stufe homogenisiert. Man pipettiert 700 µl ACN und 10 µl internen Standard dazu und vortext. Danach wird zentrifugiert.

Es konnte kein nennenswerter Unterschied zwischen den Stahl- und den Keramikkügelchen festgestellt werden.

Es wurde folgendes Anwendungsschema laut der Gebrauchsanweisung von MINILYS® erstellt:

<u>Organ</u>	<u>Probengefäß</u>
Lunge	CK28R
Herz	CK28R
Leber	CK14
Niere	CK14
Hirn	CK14

Es stellt sich heraus, dass Methode 2, bei der der interne Standard erst nach dem Homogenisieren dazugegeben wird besser funktioniert.

Des Weiteren wird festgestellt, dass es keinen Unterschied macht, ob man zum Schluss mit der Kühlzentrifuge (12 °C, 4 min, 12.000 U/min) oder mit der Zentrifuge „Galaxy 16 DH“ (3,5 min, 12.000 U/min) zentrifugiert.



Abb. 15: Zentrifuge „Galaxy 16 DH“



Abb. 16: Kühlzentrifuge

3.8. Probendurchführung

3.8.1. SERIE 1: Mausproben: Plasma und Gewebeverteilung

Maus 1+2	SL 19
Maus 3+4	SL 11
Maus 5+6	Kontrolle

Es werden je 6 x Lunge, Leber, Niere und Plasma, sowie 2 x Urin untersucht. (Urin ist von Maus 3 und 4 vorhanden).

Zirka je 80 µl Plasma bzw. Urin werden in ein Eppendorf-Gefäß pipettiert, anschließend gevortext, mit 120 µl ACN (= 80 x 1,5) und 1,66 µl internem Standard versetzt und nochmals gevortext. Danach wird mit Hilfe der Kühlzentrifuge (12 °C, 4 min, 12.000 U/min) zentrifugiert. Die Eluate werden in Autosampler vials pipettiert und mit Hilfe der HPLC analysiert.

Die Urinanalyse wird geruchsbedingt unter dem Abzug gemacht.

Von der Lunge, der Leber und der Niere werden je etwa 200 mg mit PBS gewaschen, in ein Homogenisationsröhrchen eingewogen und 300 µl PBS dazupipettiert. Danach wird 3 x 30 sec mit dem MINILYS® bei höchster Stufe homogenisiert. Anschließend werden 700 µl ACN und 10 µl interner Standard hinzugefügt, gevortext und auf der Kühlzentrifuge (12 °C, 4 min, 12.000 U/min) zentrifugiert. Die Eluate werden in Autosampler vials pipettiert und mit Hilfe der HPLC analysiert.

3.8.2. SERIE 2: Mausproben: Plasma und Gewebeverteilung, i.p., i.v.

Maus 1+2	SL 11, i.p.
Maus 3	SL 11, i.v.
Maus 4+5	SL 22, i.p.
Maus 6	SL 22, i.v.
Maus 7	Kontrolle

Es werden je 7 x Lunge, Leber, Niere und Plasma, sowie 4 x Urin untersucht. (Urin ist von Maus 3, 5, 6 und 7 vorhanden).

Je zirka 80 µl Plasma bzw. Urin werden in ein Eppendorf-Gefäß pipettiert, anschließend gevortext, mit 80 µl ACN versetzt, neuerlich gevortext und mit 1,3 µl internem Standard versetzt. Danach wird zentrifugiert (4 min, 12.000 U/min). Die Eluate werden in Autosampler vials pipettiert und mit Hilfe der HPLC analysiert.

Je etwa 200 mg Lunge, Leber und Niere werden mit PBS gewaschen, in ein Homogenisationsröhrchen eingewogen und mit der doppelten Menge an ACN (400 µl) versetzt. Mit dem MINILYS® wird 3 x 30 sec bei höchster Stufe homogenisiert und 5 µl interner Standard dazugegeben. Anschließend wird gevortext und zentrifugiert (4 min, 12.000 U/min). Die Eluate werden in Autosampler vials pipettiert und mit Hilfe der HPLC analysiert.

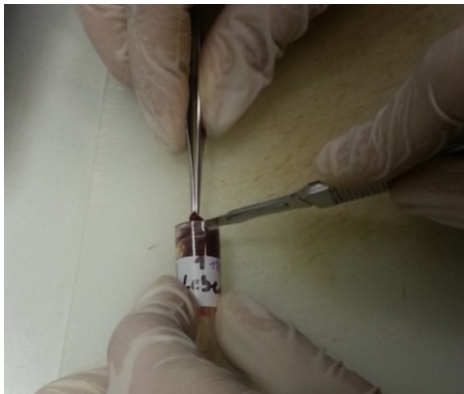


Abb. 17: Entnahme der Leber

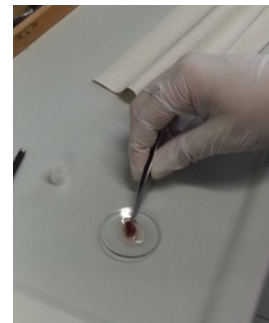


Abb. 18: waschen mit PBS



Abb. 19: Einwaage von ca. 200 mg in ein Homogenisationsröhrchen

3.8.3. Gewebeproben: Herz, Leber, Hirn, Niere, Lunge

Es werden Hühnerherzen, Schweineleber, -hirn, -niere und Rindslunge im Supermarkt gekauft und für die Analyse verwendet.



Abb. 20: Hühnerherz



Abb. 21: Schweineleber

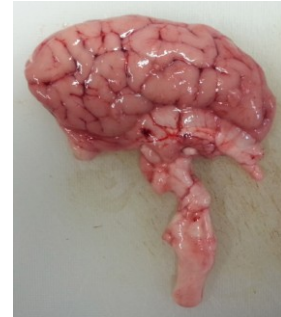


Abb. 22: Schweinehirn

Zunächst wird die Substanz SL 11 in ACN gelöst, sodass man eine Stammlösung mit der Konzentration 1 mg/ml erhält. Es werden unterschiedliche Verdünnungen erstellt: 60 µl, 30 µl, 15 µl und 7,5 µl

Danach werden Leerwerte hergestellt, um später Peaks die durch das Organ zustande kommen und Peaks die von der Substanz kommen unterscheiden zu können. Bei den Leerwerten werden nur die Organe ohne Substanz vermessen. Man geht wie folgt vor: je 200 mg Gewebe werden in ein Homogenisationsröhrchen eingewogen und 400 µl ACN dazupipettiert. Danach wird das Ganze 3 x 30 sec bei höchster Stufe homogenisiert.

Je 200 mg Gewebe werden in ein Homogenisationsröhrchen eingewogen und 400 µl ACN dazupipettiert, anschließend wird mit dem MINILYS® 1 x 30 sec bei höchster Stufe homogenisiert. Danach werden die verschiedenen Konzentrationen der Stammlösung dazugegeben, 2 x 30 sec bei höchster Stufe homogenisiert und jeweils nach 0 min, 10 min, 30 min und 90 min Proben entnommen und in ein Eppendorf-Gefäß übergeführt. Anschließend wird zentrifugiert (4 min, 10.000 U/min), die Eluate in Autosampler vials pipettiert und mittel HPLC analysiert.

3.9. Software

- Microsoft® Office Excel 2007: Statistik, Berechnungen und Tabellen
- GraphPad Prism® 6.0 for Windows, GraphPad Software, La Jolla California USA: Berechnungen, Erstellung von Kurven und Layouts
- Microsoft® Office Word 2007: Erstellung der Diplomarbeit

4. Ergebnisse und Diskussion

4.1. Ergebnisse der Serie 1

4.1.1. Fort/Ford

Tabelle 13: Ergebnisse der Fort bzw. Ford-Messungen

TIER	nach	Fort [FortU]	[mmol/l H ₂ O ₂]	Ford [mmol/l TROLOX]
MS 1	5 Minuten	< 160	< 1,22	2,36
MS 2	5 Minuten	< 160	< 1,22	2,29
MS 5	10 Minuten	184	1,4	2,18
MS 6	10 Minuten	< 160	< 1,22	1,65
MS 7	15 Minuten	< 160	< 1,22	1,71
MS 9	15 Minuten	< 160	< 1,22	1,72
MS 10	30 Minuten	< 160	< 1,22	1,72
MS 12	30 Minuten	< 160	< 1,22	1,35
MS 13	60 Minuten	171	1,3	1,80
MS 15	60 Minuten	166	1,26	1,79
MS 17	180 Minuten	< 160	< 1,22	2,07
MS 18	180 Minuten	< 160	< 1,22	1,82
MS 19	360 Minuten	< 160	< 1,22	2,14
MS 20	360 Minuten	< 160	< 1,22	2,03
MS 22	Leerwert	< 160	< 1,22	1,32
MS 24	Leerwert	< 160	< 1,22	2,07

Tabelle 14: Referenzwerte der mit FORMplus messbaren Parameter für Menschen

PARAMETER	NORMALWERTE
FORT	bis zu 310 FORT Einheiten – 2.36 mmol/l H ₂ O ₂
FORD	1.07 – 1.53 mmol/l Trolox

Der oxidative Stress ist ein Phänomen des Gleichgewichts von Oxidanzien und Antioxidanzien. Lebende Organismen haben ein komplexes antioxidatives System entwickelt, um den freien Radikalen begegnen zu können. Auf diese Weise wird eine Gewebeschädigung durch oxidativen Stress vermindert.

Ein Mangel an Antioxidanzien oder eine Überproduktion freier Radikale kann jedoch zu einem gefährlichen Ungleichgewicht im Organismus führen und somit zu einem Anstieg des oxidativen Stresses. [24]

Alle Ergebnisse des FORT-Tests liegen unter 310 FortU bzw. 2,36 mmol/l H_2O_2 . Das bedeutet die Radikalbildung ist sehr niedrig.

Die antioxidative Kapazität (FORD-Werte) liegt bei allen Mäusen – außer bei Nummer 12 und 22 – knapp über den humanen Normalwerten von 1.07 – 1.53 mmol/l Trolox.

Die Ergebnisse sind zufriedenstellend, da weder eine Überproduktion von freien Radikalen, noch ein Mangel an Antioxidanzien vorliegt und die Mäuse somit keinem (übermäßigen) oxidativen Stress ausgesetzt waren.

Außerdem spielt es keine Rolle, ob nach 5, 10, 15 oder 30 Minuten bzw. nach 1, 3 oder 6 Stunden Proben abgenommen wurden.

Die chemische Radikalbildung erfolgt als Kettenreaktion innerhalb weniger Sekunden. Die allfällige Schädigung eines Organes ist allerdings ein längerer Prozess.

4.1.2. Reflotron

Im Rahmen dieser Diplomarbeit werden ALP, GGT, GPT und GOT bestimmt.

Es werden 32 µl auf den Teststreifen pipettiert und im Reflotron analysiert.

Den Mäusen werden je 20 mg/kg SL 11 intravenös appliziert.

24 Mäuse werden jeweils in Dreiergruppen zusammengefasst (z.B.: Maus 1,2,3 = Gruppe 1, usw.)

Tabelle 15: Schema der Probenentnahme für die Enzymaktivitätsbestimmung

Zeitpunkt der Entnahme nach Applikation der Substanz	Proben Nr. Plasma
5 Minuten	1,2,3
10 Minuten	4,5,6
15 Minuten	7,8,9
30 Minuten	10,11,12
60 Minuten	13,14,15
180 Minuten	16,17,18
360 Minuten	19,20,21
Leerwert	22,23,24

Um die Ergebnisse der Enzymparameter der einzelnen Gruppen besser darstellen zu können, werden die 3 Messungen pro Gruppe zu einem Mittelwert zusammengefasst (siehe Tabelle 16) und außerdem grafisch dargestellt (siehe Abbildung 23).

Tabelle 16: Ergebnisse der Enzymaktivitätsmessungen

Enzym	Temp. °C	Leerwert U/l	5 min U/l	15 min U/l	60 min U/l	180 min U/l	360 min U/l
ALP	37	92,2	103	–	98,3	98,6	98,6
GGT	25	< 2,8	< 2,8	< 2,8	< 2,8	< 2,8	< 2,8
GPT	25	15,5	18,5	31,6	55	22,6	47,9
GOT	25	64,6	–	70,4	143	110	90,3

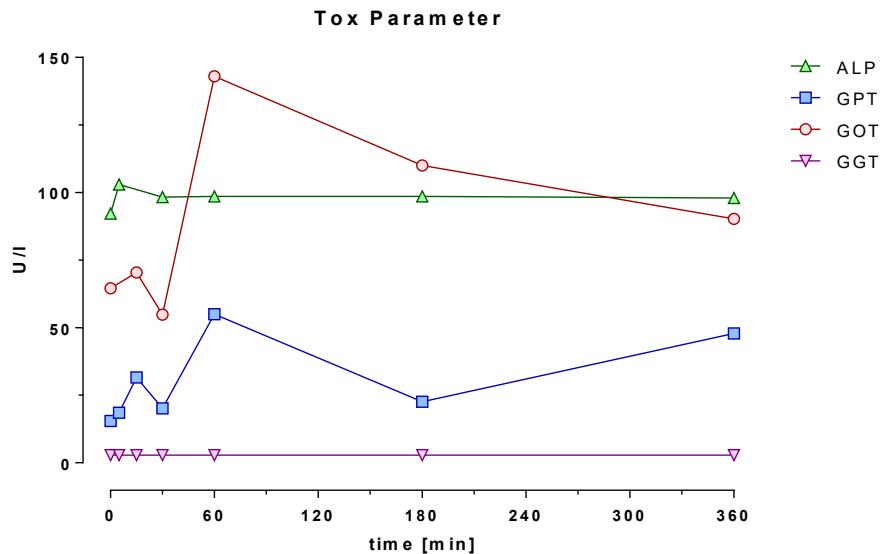


Abb. 23: grafische Darstellung der Enzymaktivitätsmessungen

Unter dem Begriff Alkalische Posphatase (ALP) wird eine Gruppe von membranständigen Enzymen zusammengefasst, die im alkalischen pH-Bereich die Hydrolyse von Phosphorsäuremonoestern katalysieren. [25]

Die ALP-Werte aller Mäuse entsprechen den humanen Normalwerten.

Die Gamma-Glutamyltransferase (GGT) ist ein überwiegend membran-gebundenes Enzym, das in vielen parenchymatösen Organen vorkommt. Erhöhte GGT-Aktivitäten können ein Indikator für zahlreiche Erkrankungen oder Mitreaktionen der Leber sein. [21]

Alle gemessenen GGT-Werte liegen unter den humanen Referenzwerten.

Die Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT) kommt fast ausschließlich in der Leber vor, wo sie nur im Zytoplasma der Parenchymzellen vorhanden ist. [21]

Die GPT-Werte der Mäuse 14 und 21 sind erhöht. Die Werte der übrigen Mäuse liegen in den humanen Normalwerten.

Die Bestimmung der Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT) wird besonders zur Diagnostik von Erkrankungen der Leber und des Herzmuskels eingesetzt. [21]

Die gemessenen GOT-Werte befinden sich alle über den humanen Referenzwerten.

4.1.3. Gewebeverteilung (i.v.)

Die Verabreichung der SL-Substanzen erfolgt bei Serie 1 ausschließlich intravenös. (siehe Tabelle 1)

Nach Analyse der Reinsubstanzen ergeben sich folgende Retentionszeiten:

SL 11: 14,4 min

SL 19: 14,7 min

Die Analysezeit der Chromatogramme beträgt 45 Minuten. Die nachfolgenden Diagramme werden aber verkürzt dargestellt, um die wesentlichen Peaks besser sichtbar zu machen.

Der Pfeil zeigt die Retentionszeit der jeweiligen SL-Substanz im Chromatogramm an. Dies gilt für alle folgenden Chromatogramme.

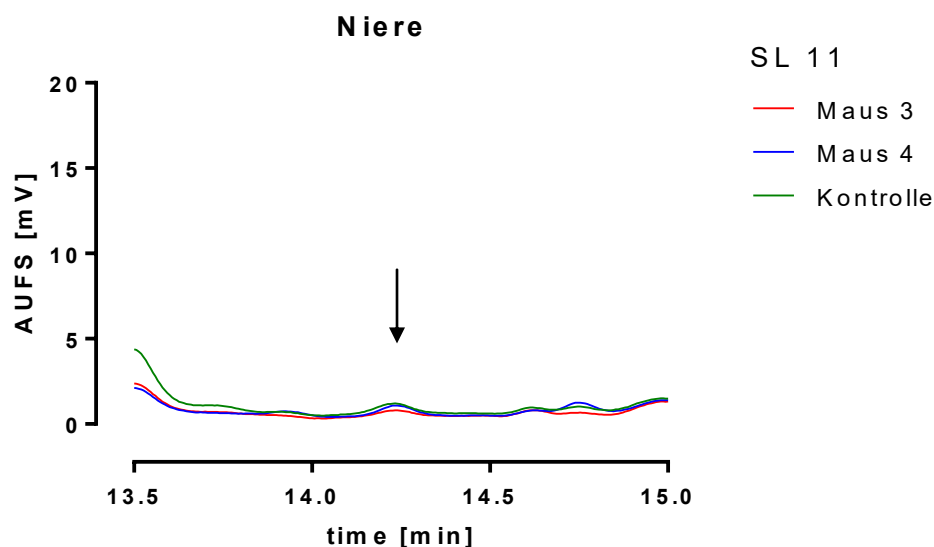


Abb. 24: Chromatogramm der Substanz SL 11 in der Niere bei Maus 3+4

Bei Maus 3 und 4 sind in der Niere kleine Mengen des Analyten SL 11 detektierbar.

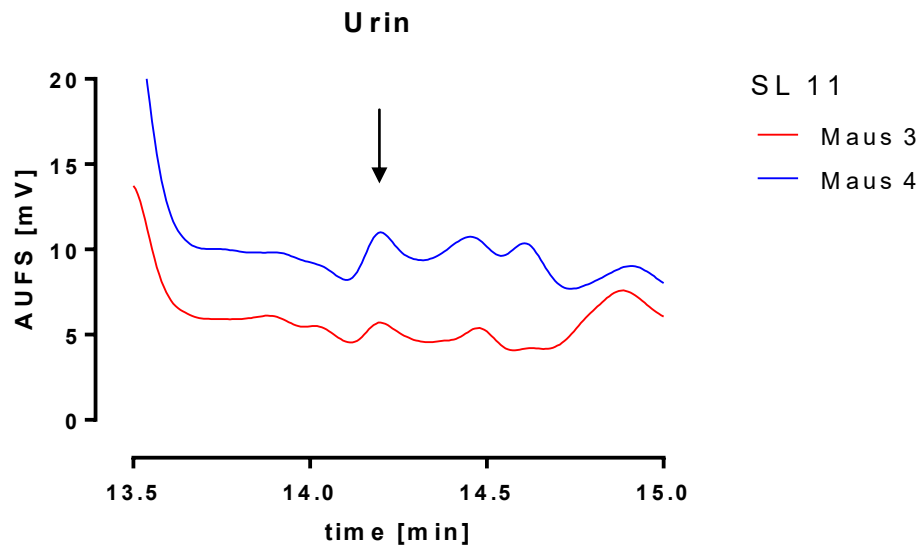


Abb. 25: Chromatogramm der Substanz SL 11 im Urin bei Maus 3+4

SL 11 ist im Urin der Maus 3 und 4 erkennbar.

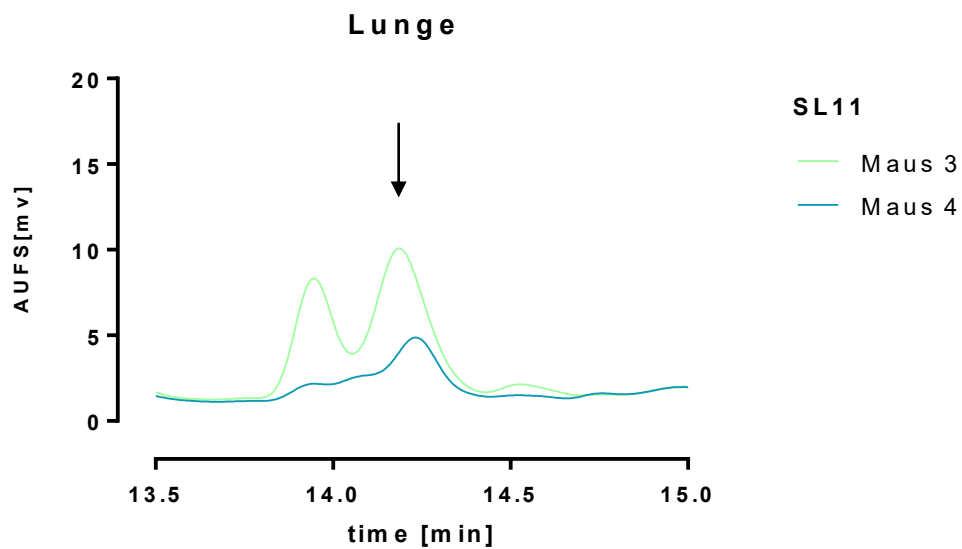


Abb. 26: Chromatogramm der Substanz SL 11 in der Lunge bei Maus 3+4

Bei Maus 3 und 4 sind in der Lunge deutliche Peaks der Substanz SL 11 zu sehen.

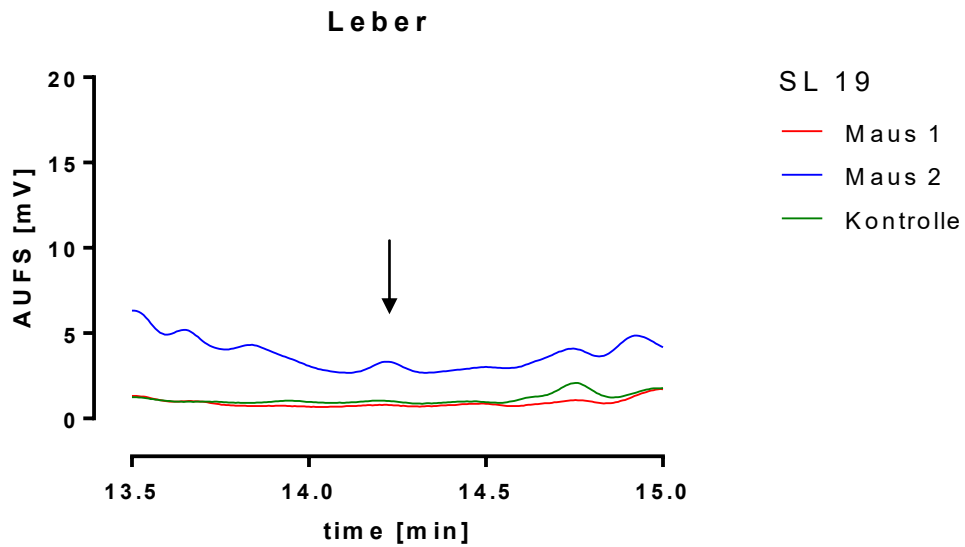


Abb. 27: Chromatogramm der Substanz SL 19 in der Leber bei Maus 1+2

Die Substanz SL 19 ist in der Leber bei Maus 2 in kleinen Mengen detektierbar, bei Maus 1 und in der Kontrollmaus jedoch nicht.

4.2. Ergebnisse der Serie 2: Plasma und Gewebeverteilung (i.p., i.v.)

Nach Analyse der Reinsubstanzen ergeben sich folgende Retentionszeiten:

SL 11: 14,4 min

SL 22: 16,5 min

Die Analysezeit der Chromatogramme beträgt 45 Minuten. Die nachfolgenden Diagramme werden ebenfalls verkürzt dargestellt, um die wesentlichen Peaks besser sichtbar zu machen.

Der Pfeil zeigt die Retentionszeit der jeweiligen SL-Substanz im Chromatogramm an. Dies gilt für alle folgenden Chromatogramme.

Die jeweiligen SL-Substanzen werden den Mäusen i.v. oder i.p. appliziert.

Die Chromatogramme zeigen die Konzentration von SL 11 und SL 22 im Plasma bzw. in der Gewebeprobe bei Entnahme nach 30 bzw. 120 Minuten. Damit kann der zeitliche Verlauf des Abbaus dieser Substanzen aufgezeigt werden, d.h. ob sich die Substanz nach 120 Minuten noch nachweisen lässt, oder ob sie bereits vollständig abgebaut worden ist.

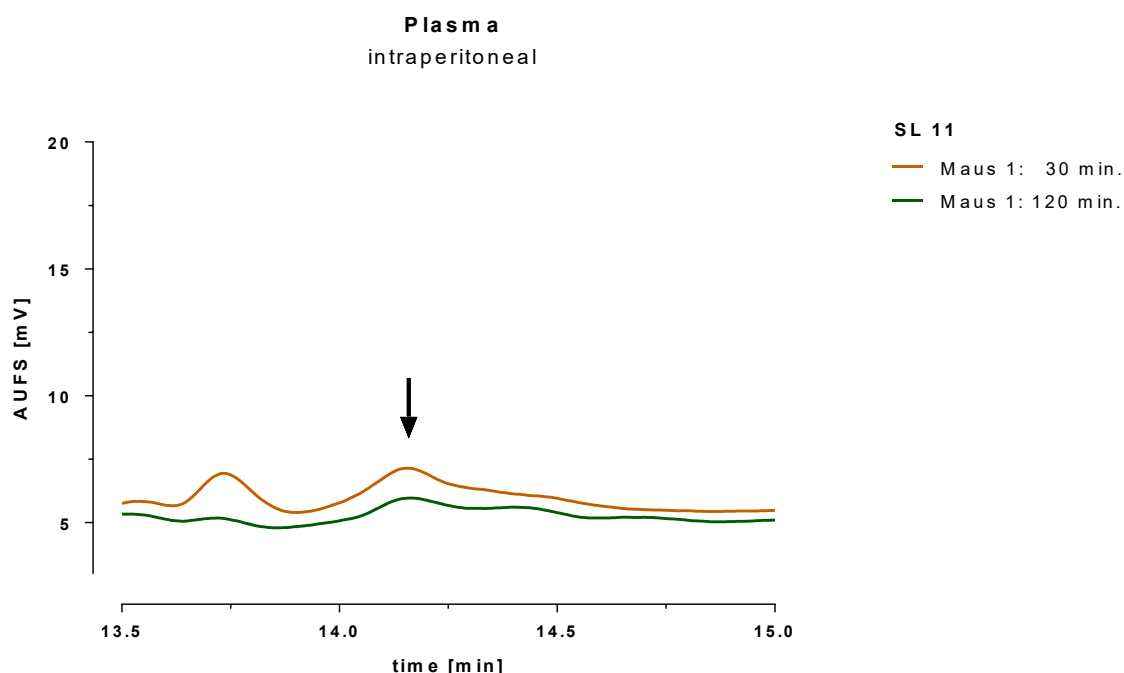


Abb. 28: Chromatogramm der Substanz SL 11 bei Maus 1 nach 30 und 120 min im Plasma nach intraperitonealer Gabe

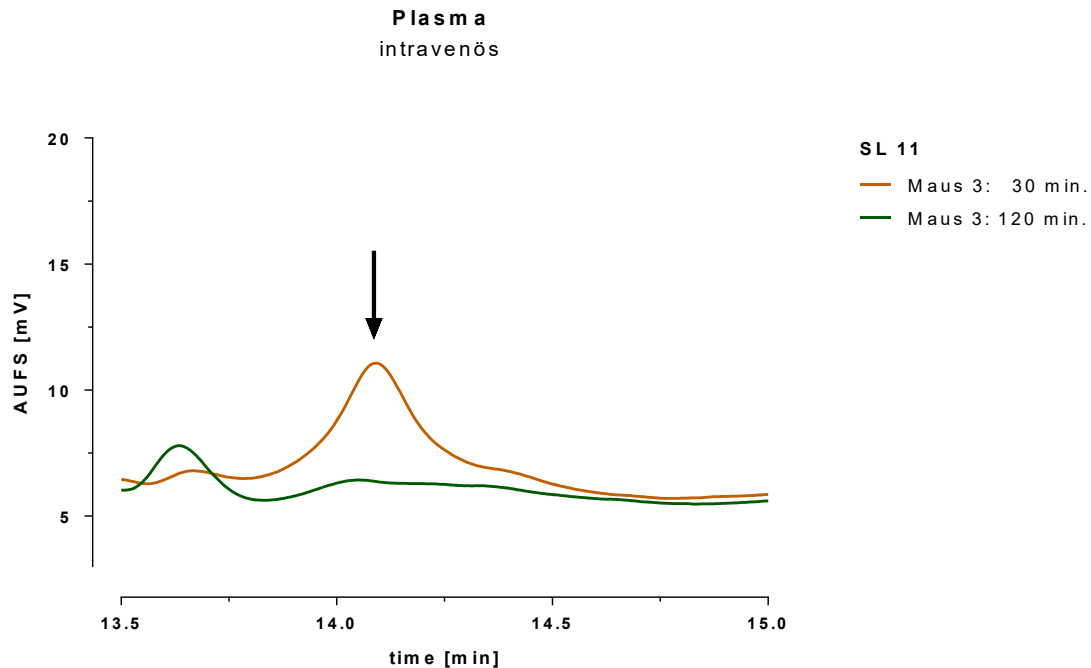


Abb. 29: Chromatogramm der Substanz SL 11 bei Maus 3 nach 30 und 120 min im Plasma nach intravenöser Gabe

Aufgrund der obigen Chromatogramme sind folgende Schlüsse für SL 11 in Mausplasma möglich: Bei intraperitonealer Gabe (Maus 1) sind nach 30 Minuten kleinere Mengen Analyt in der Plasmaprobe feststellbar, als vergleichsweise bei intravenöser Gabe (Maus 3).

Nach 120 Minuten sind allerdings in Maus 1 immer noch Reste des Analyten messbar, während in Maus 3 keine Rückstände mehr detektiert werden.

Somit kann vermutet werden, dass die Methode i.v. oder i.p. einerseits Auswirkung auf die Aufnahme, als auch auf den Abbau der Analyten hat.

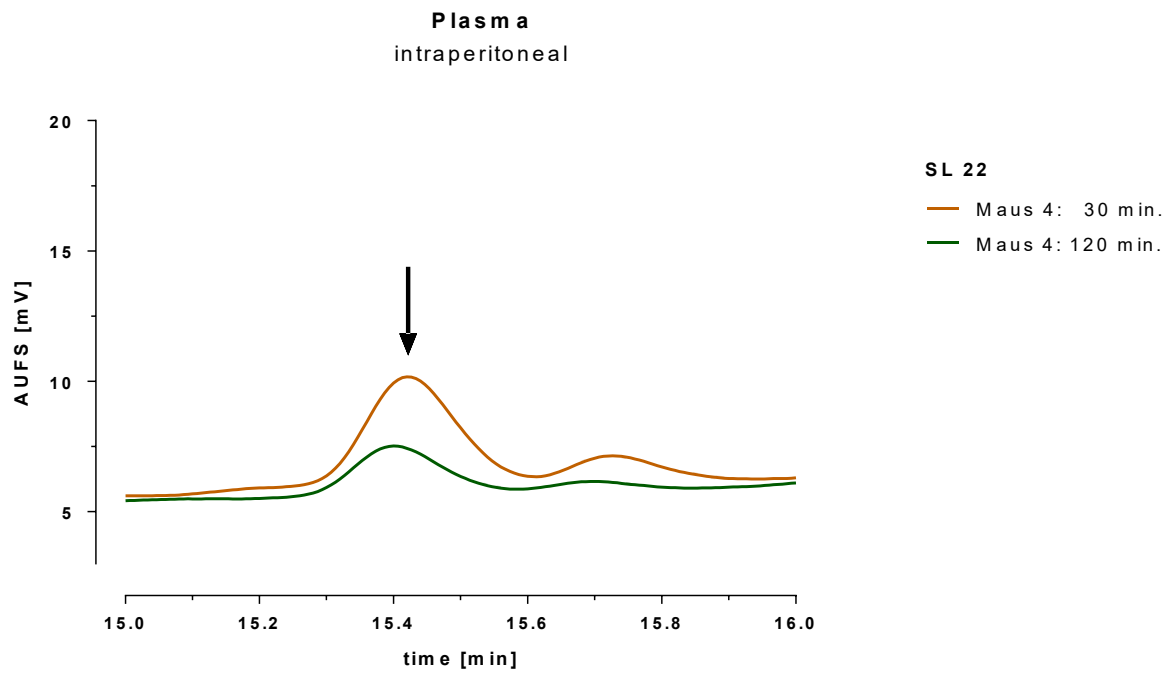


Abb. 30: Chromatogramm der Substanz SL 22 bei Maus 4 nach 30 und 120 min im Plasma nach intraperitonealer Gabe

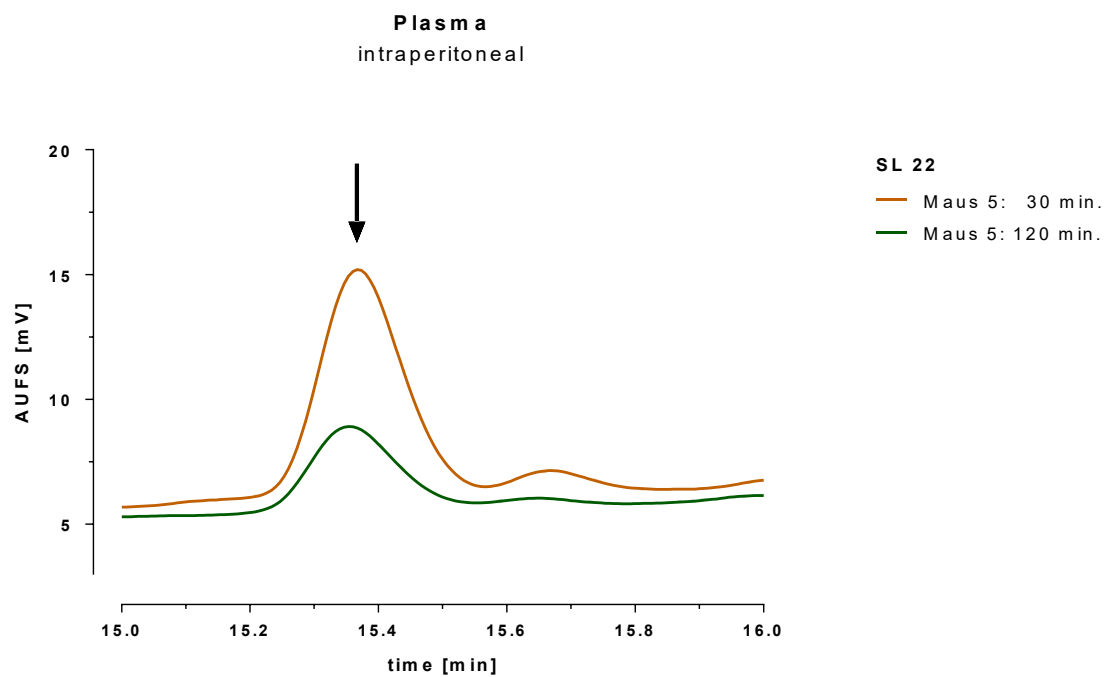


Abb. 31: Chromatogramm der Substanz SL 22 bei Maus 5 nach 30 und 120 min im Plasma nach intraperitonealer Gabe

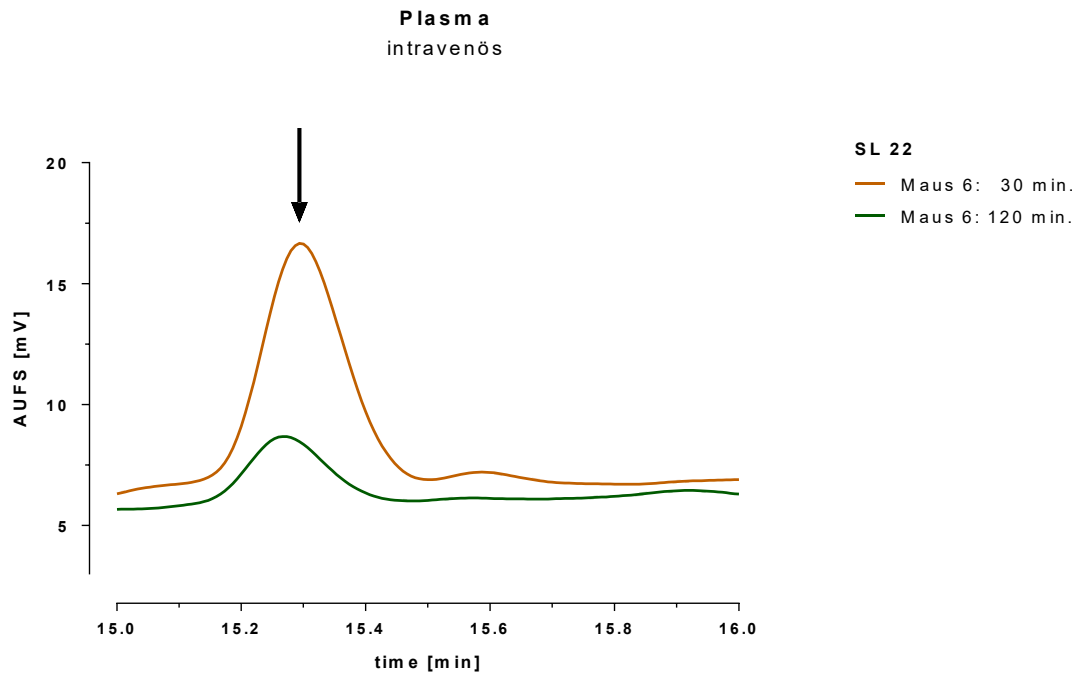


Abb. 32: Chromatogramm der Substanz SL 22 bei Maus 6 nach 30 und 120 min im Plasma nach intravenöser Gabe

Für Arzneistoff SL 22 zeigen i.v. (Maus 6) und i.p. (Maus 4 + 5) Applikation keinen großen Unterschied. Der Analyt ist jeweils nach 30 Minuten als deutlicher Peak festzustellen und reduziert seine Intensität nach 120 Minuten auf etwa 30%.

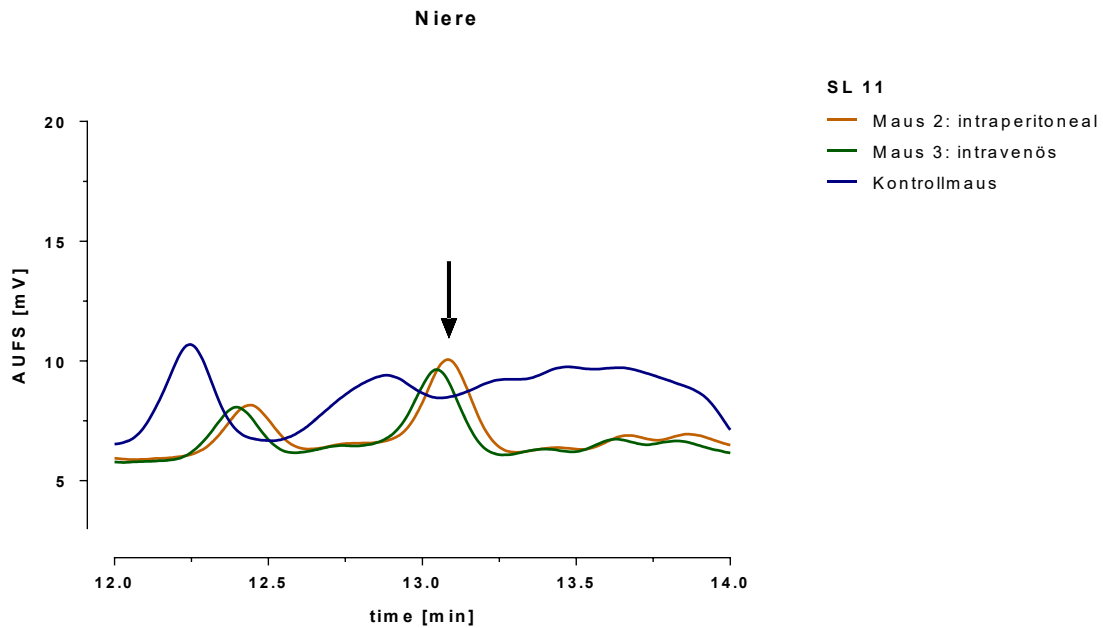


Abb. 33: Chromatogramm der Substanz SL 11 in der Niere bei Maus 2 nach intraperitonealer Gabe und Maus 3 nach intravenöser Gabe

Unabhängig von i.v. oder i.p. Gabe ist der Analyt SL 11 auch in der Niere detektierbar.

Im Vergleich dazu zeigt das Chromatogramm der Gewebeprobe der Kontrollmaus kein klares Signal mit der Retentionszeit des Analyten. Allerdings zeigt das Chromatogramm eine deutlich erhöhte Basislinie und sogenannte „Late Fluting Peaks“ von der vorigen HPLC und unterscheidet sich damit von den Chromatogrammen der untersuchten Mäuse 2 und 3.

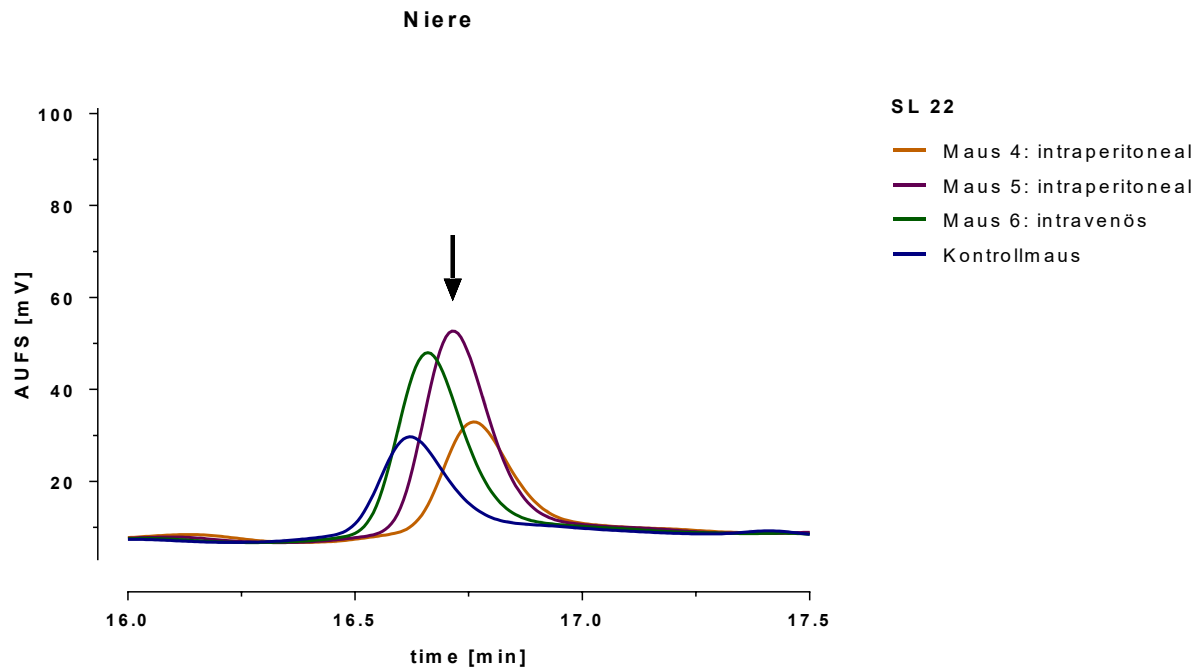


Abb. 34: Chromatogramm der Substanz SL 22 in der Niere bei Maus 4+5 nach intraperitonealer Gabe und Maus 6 nach intravenöser Gabe

Der Analyt SL 22 ist in der Niere feststellbar. Auch hier zeigen die Peaks Unterschiede in ihrer Retentionszeit: Der Peak für i.v. scheint ca. 0.1 min früher zu eluieren.

Zusätzlich fällt auf, dass auch die Probe der Kontrollmaus einen (zusätzlich verfrüht eluierenden) Peak zeigt.

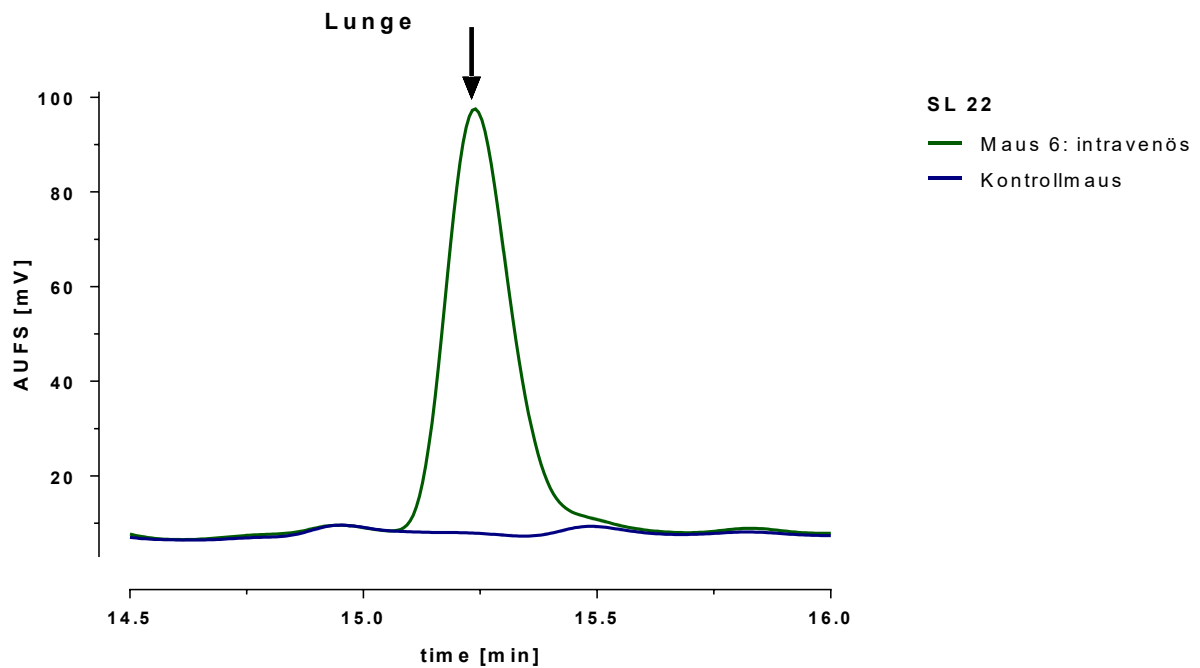


Abb. 35: Chromatogramm der Substanz SL 22 in der Lunge bei Maus 6 nach intravenöser Gabe

In den Lungenproben ist SL 22 in Maus 6 eindeutig identifizierbar, nicht aber in der Kontrollmaus.

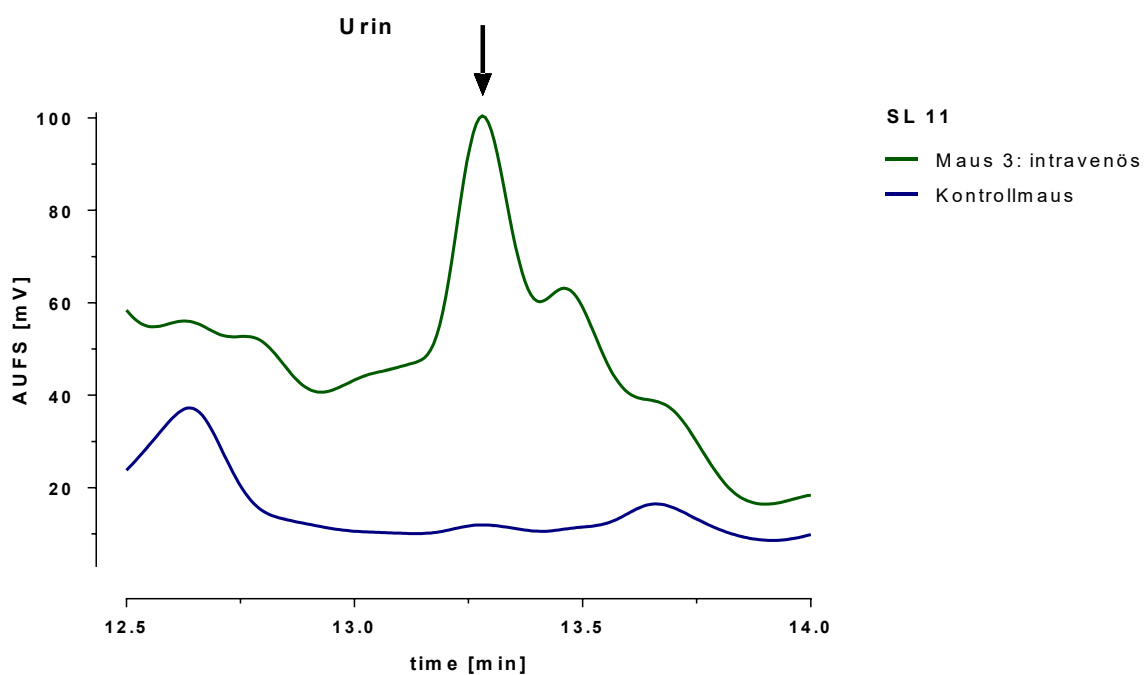


Abb. 36: Chromatogramm der Substanz SL 11 im Urin bei Maus 3 nach intravenöser Gabe

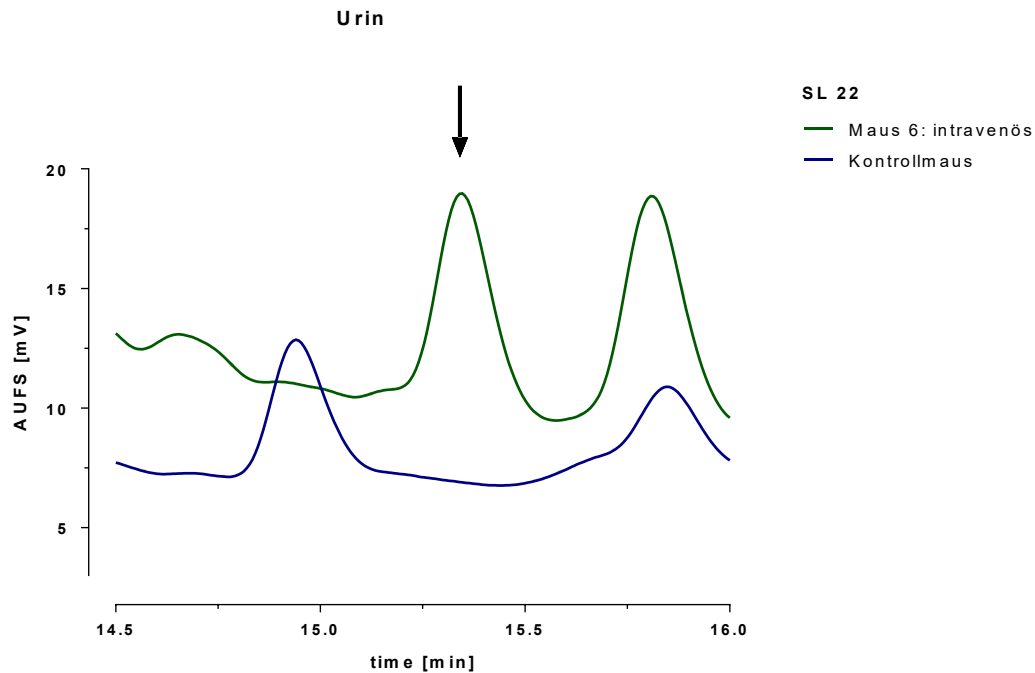


Abb. 37: Chromatogramm der Substanz SL 22 im Urin bei Maus 6 nach intravenöser Gabe

SL 11 und SL 22 werden im Urin der Maus 3 (SL 11) und 6 (SL 22) detektiert, nicht aber im Vergleichsurin der Kontrollmaus.

Die Retentionszeiten sowohl bei Punkt 4.1.3. als auch bei 4.2. sind leicht verschoben, was durch die unterschiedliche Matrix verursacht sein kann.

Andere Gründe können zum Beispiel sein:

- ungleiche Fließgeschwindigkeit (im Promillebereich)
- Prozentsatz organischen Anteils verdunstet (wenn Raumtemperatur > 25 °C)
- alte – neue Säule
- Auftragevolumen der Probe

4.3. Ergebnisse der Gewebeproben von Hühnerherz, Schweineleber, -hirn, -niere und Rinderlunge

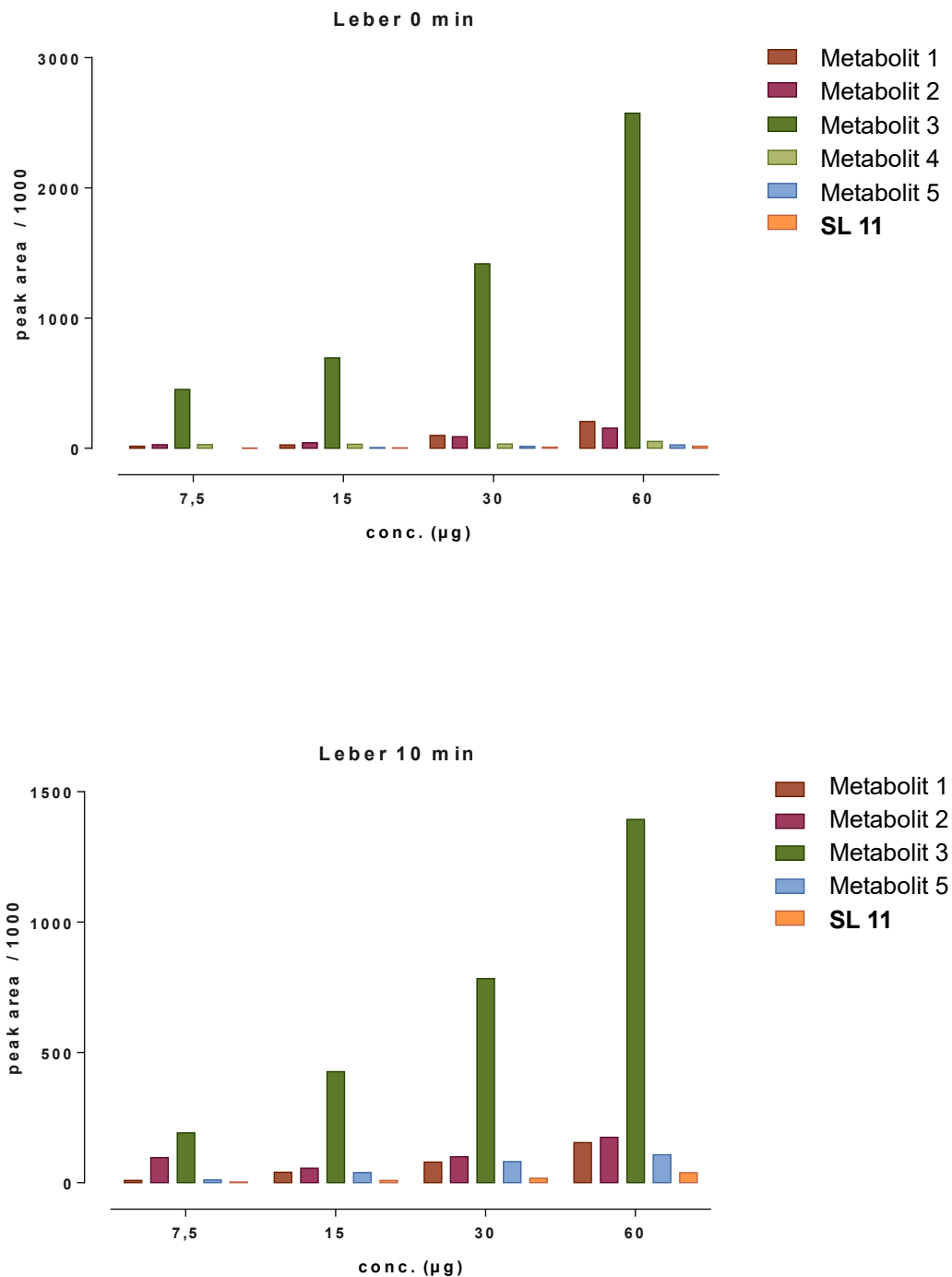


Abb. 38: Chromatogramm Peakflächen von SL11 in der Leber zu verschiedenen Abnahmezeitpunkten bei den Konzentrationen 7,5 µg, 15 µg, 30 µg und 60 µg

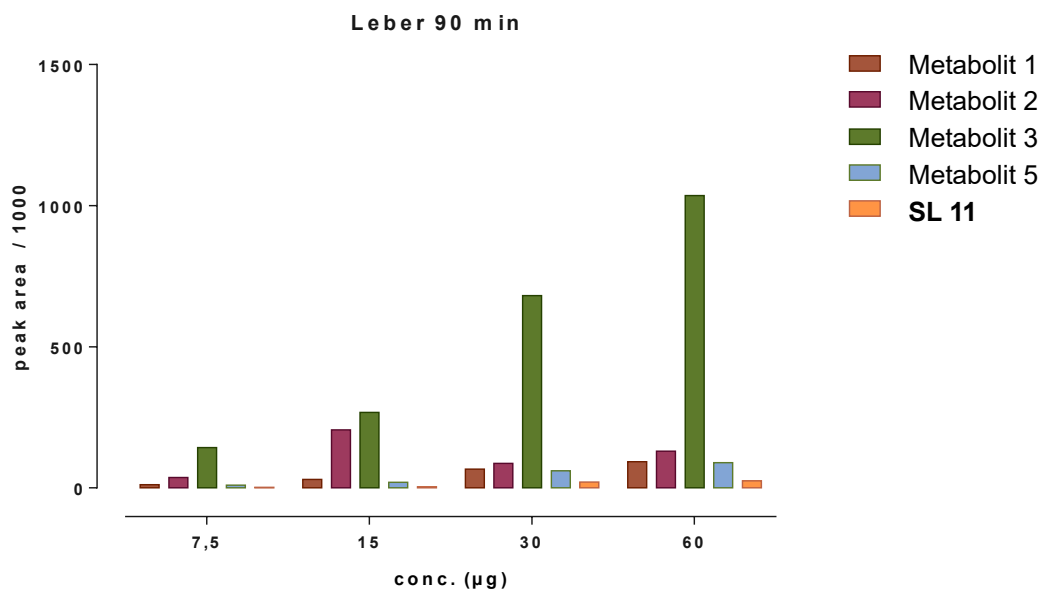
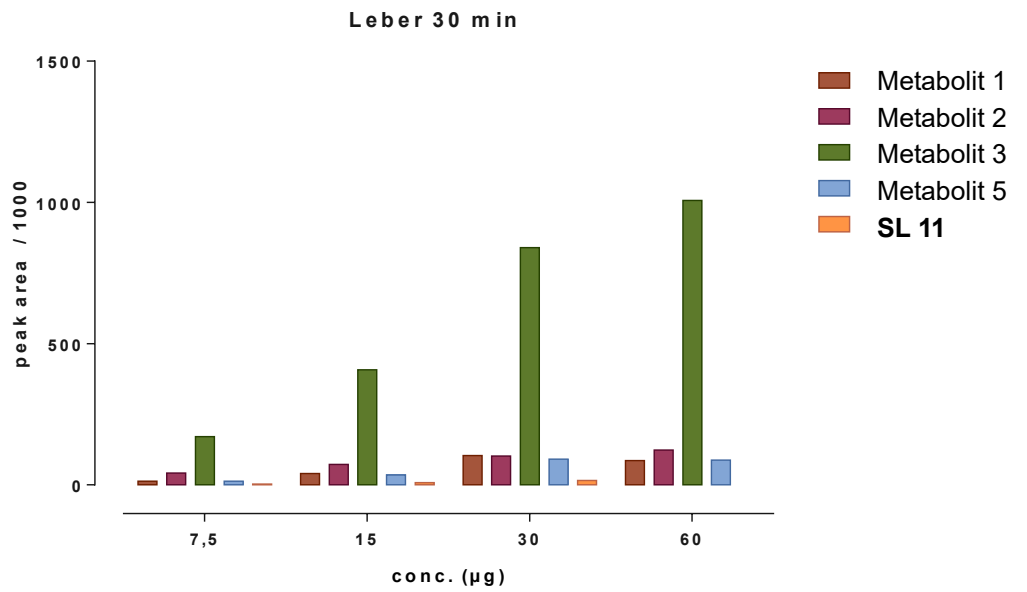


Abb. 39: Chromatogramm Peakflächen von SL11 in der Leber zu verschiedenen Abnahmezeitpunkten bei den Konzentrationen 7,5 µg, 15 µg, 30 µg und 60 µg

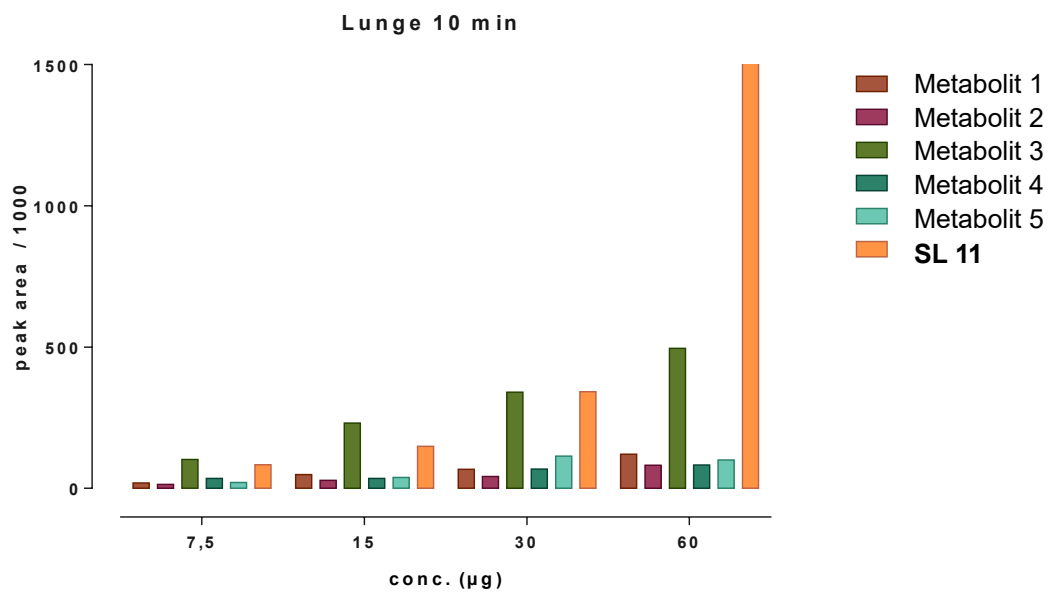
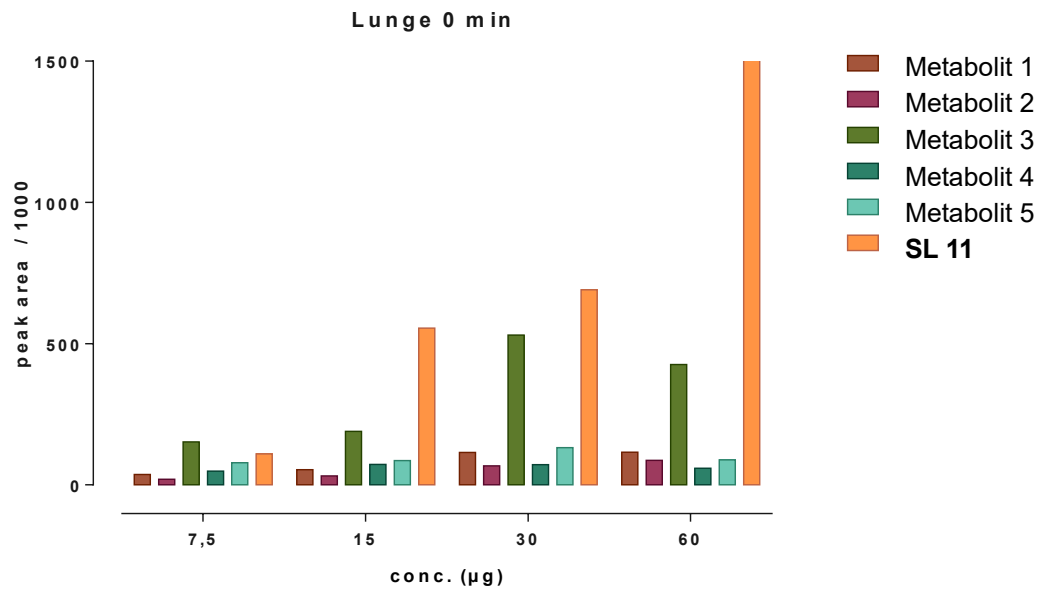


Abb. 40: Chromatogramm Peakflächen von SL11 in der Lunge zu verschiedenen Abnahmezeitpunkten bei den Konzentrationen 7,5 µg, 15 µg, 30 µg und 60 µg

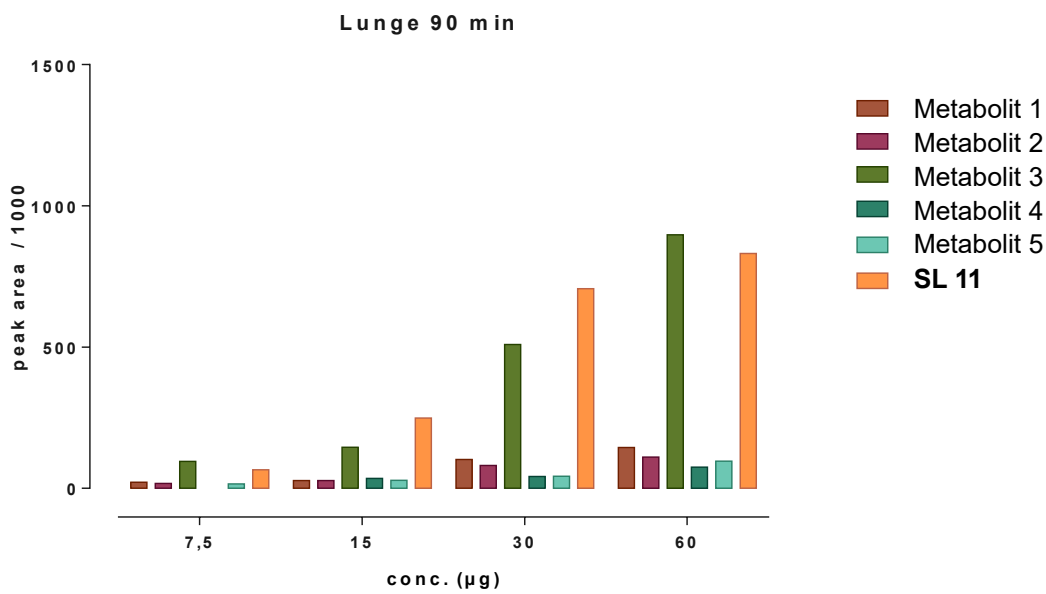
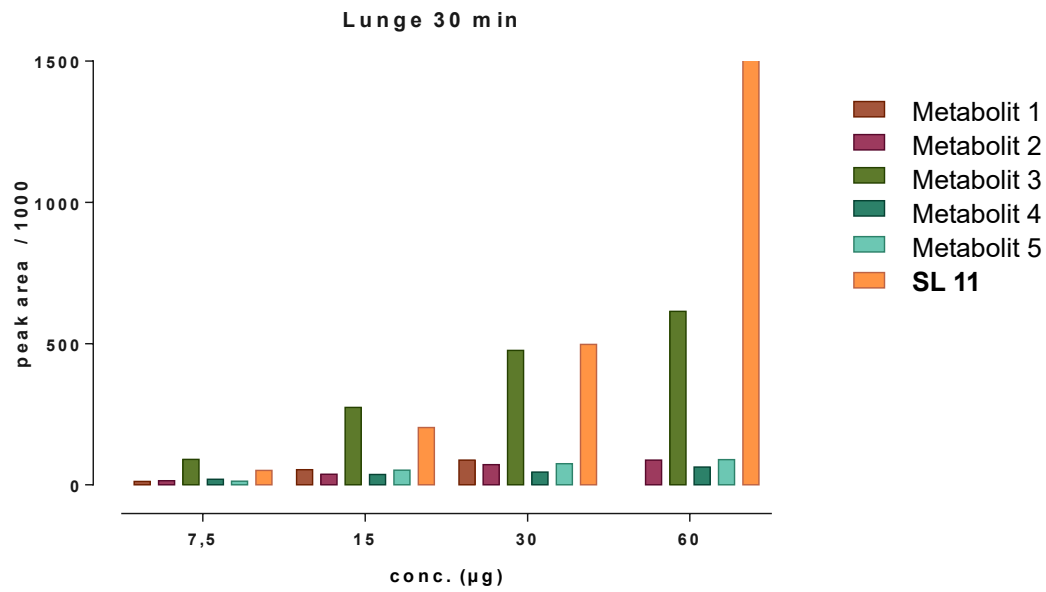


Abb. 41: Chromatogramm Peakflächen von SL11 in der Lunge zu verschiedenen Abnahmezeitpunkten bei den Konzentrationen 7,5 µg, 15 µg, 30 µg und 60 µg

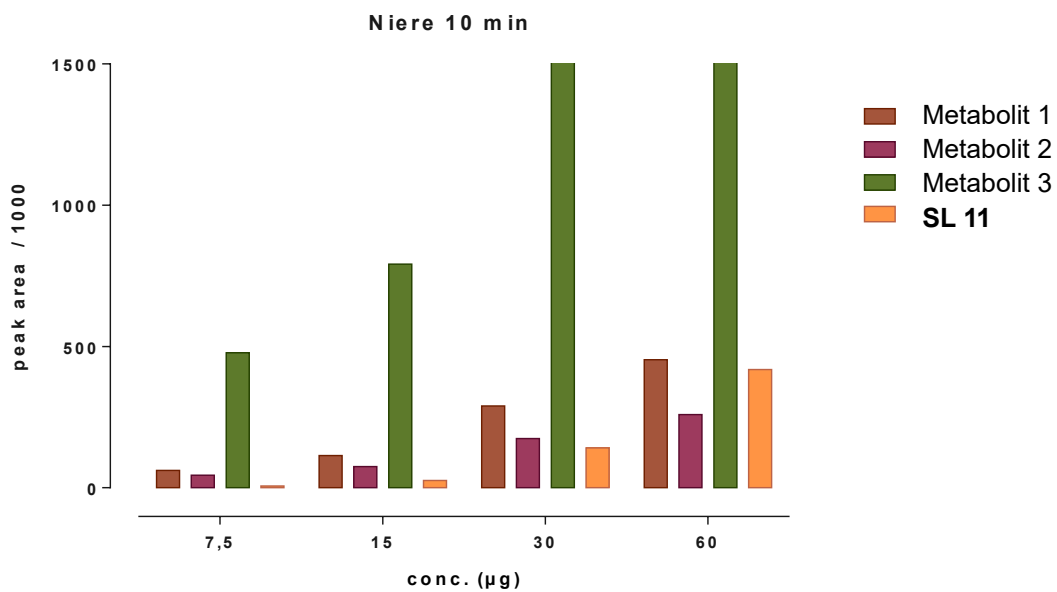
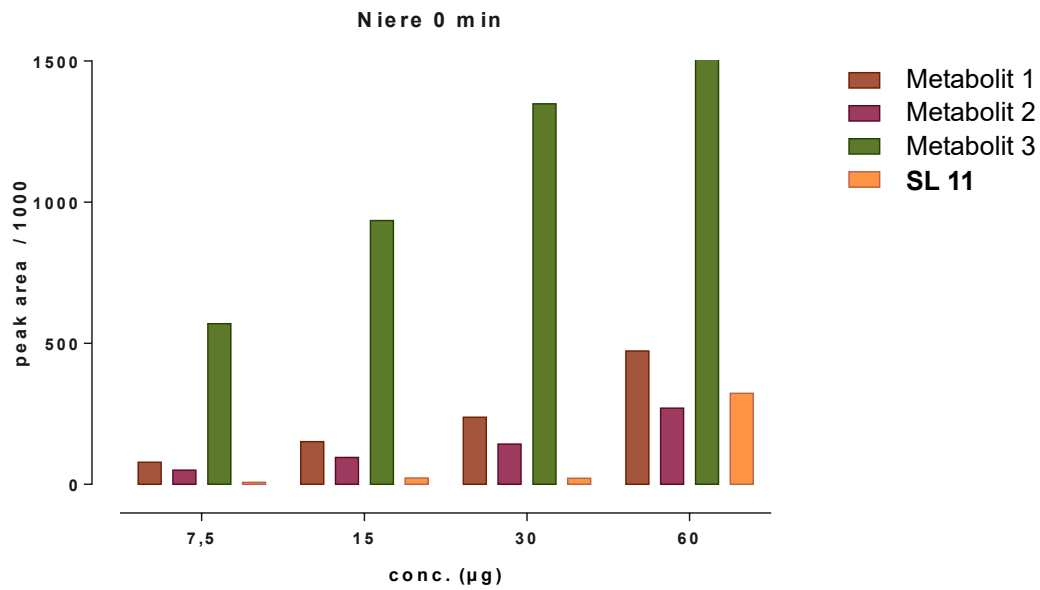


Abb. 42: Chromatogramm Peakflächen von SL11 in der Niere zu verschiedenen Abnahmezeitpunkten bei den Konzentrationen 7,5 µg, 15 µg, 30 µg und 60 µg

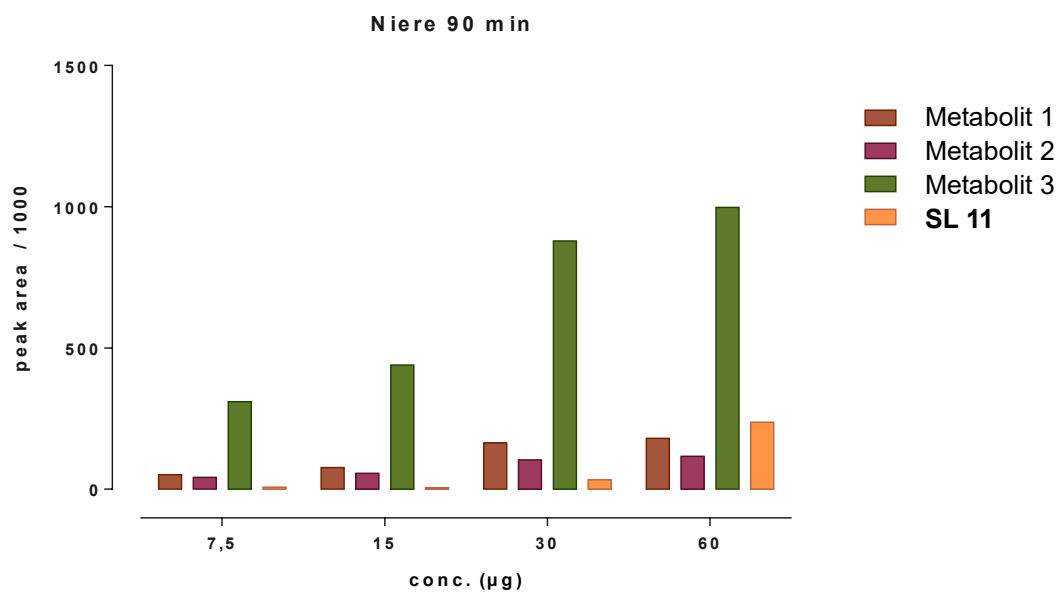
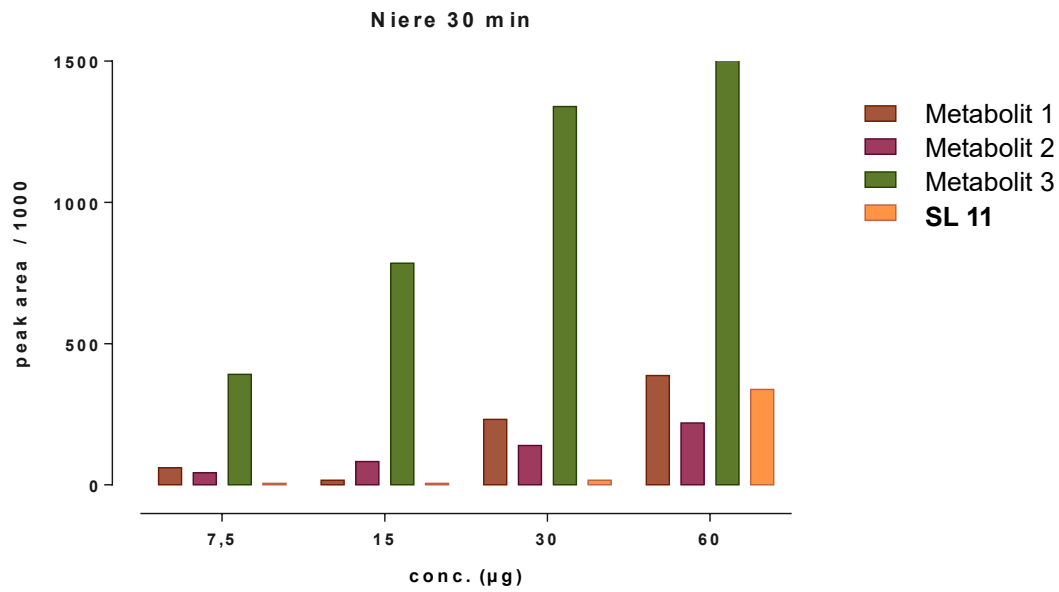


Abb. 43: Chromatogramm Peakflächen von SL11 in der Niere zu verschiedenen Abnahmezeitpunkten bei den Konzentrationen 7,5 µg, 15 µg, 30 µg und 60 µg

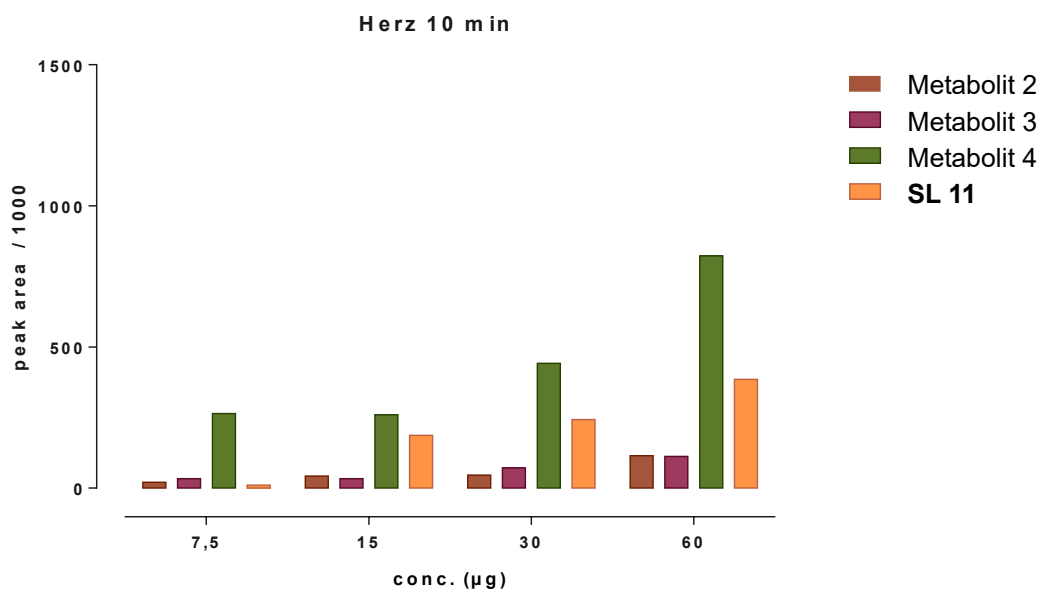
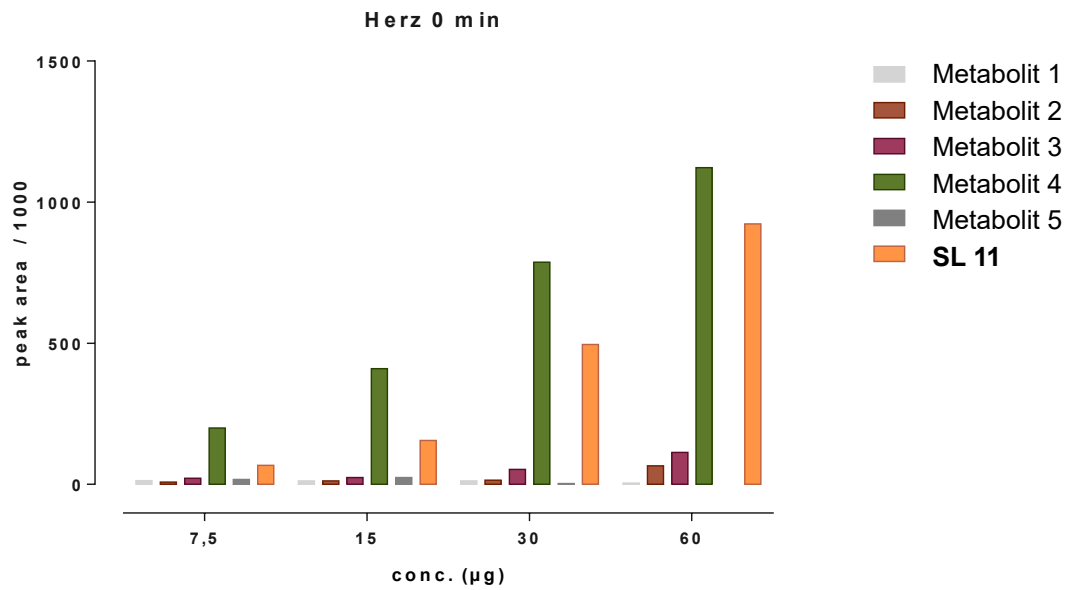


Abb. 44: Chromatogramm Peakflächen von SL11 im Herz zu verschiedenen Abnahmezeitpunkten bei den Konzentrationen 7,5 µg, 15 µg, 30 µg und 60 µg

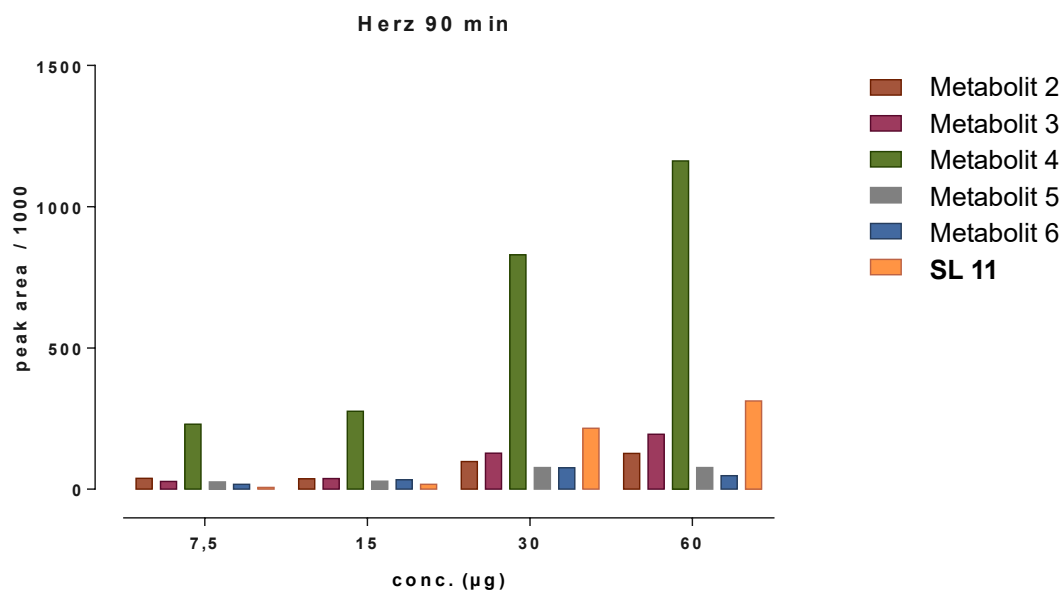
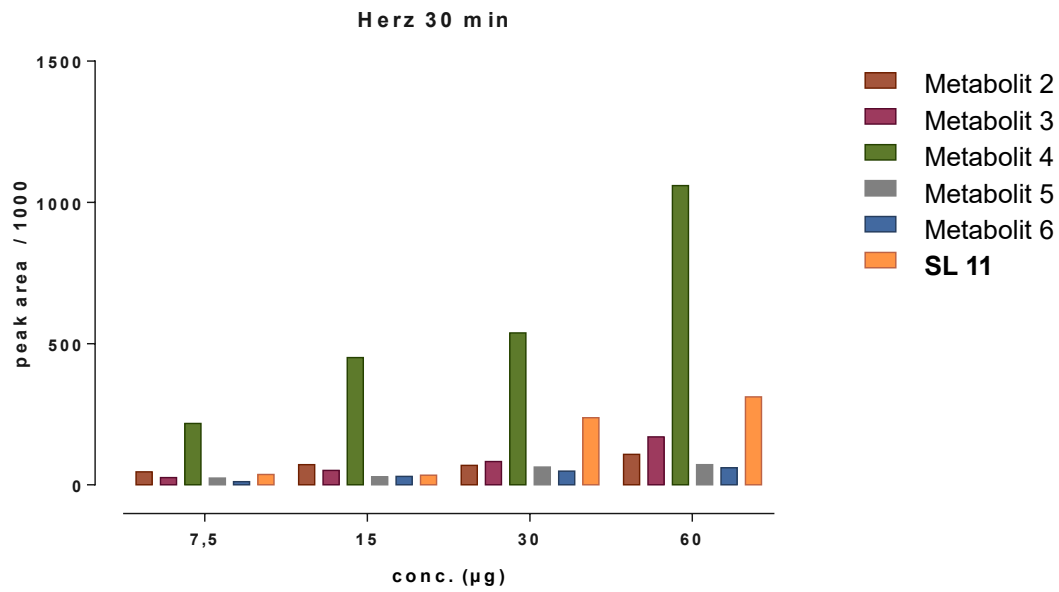


Abb. 45: Chromatogramm Peakflächen von SL11 im Herz zu verschiedenen Abnahmezeitpunkten bei den Konzentrationen 7,5 µg, 15 µg, 30 µg und 60 µg

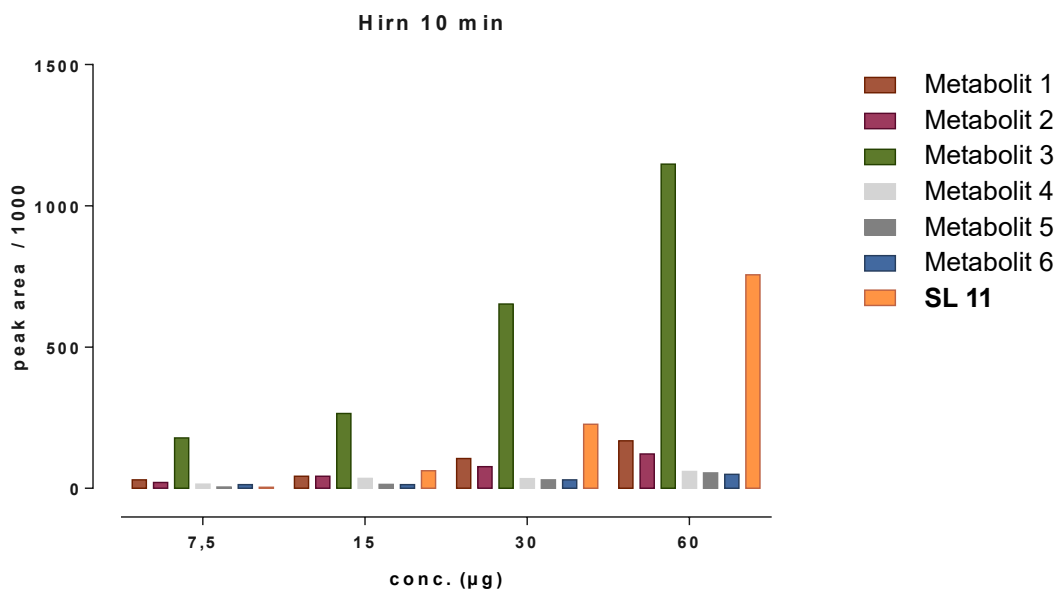
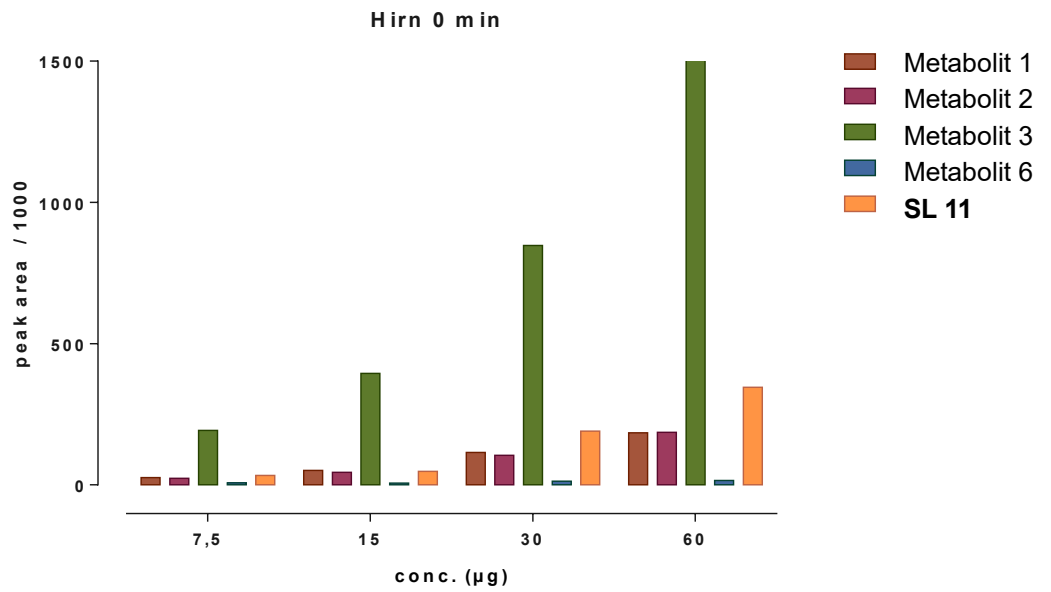


Abb. 46: Chromatogramm Peakflächen von SL11 im Hirn zu verschiedenen Abnahmezeitpunkten bei den Konzentrationen 7,5 µg, 15 µg, 30 µg und 60 µg

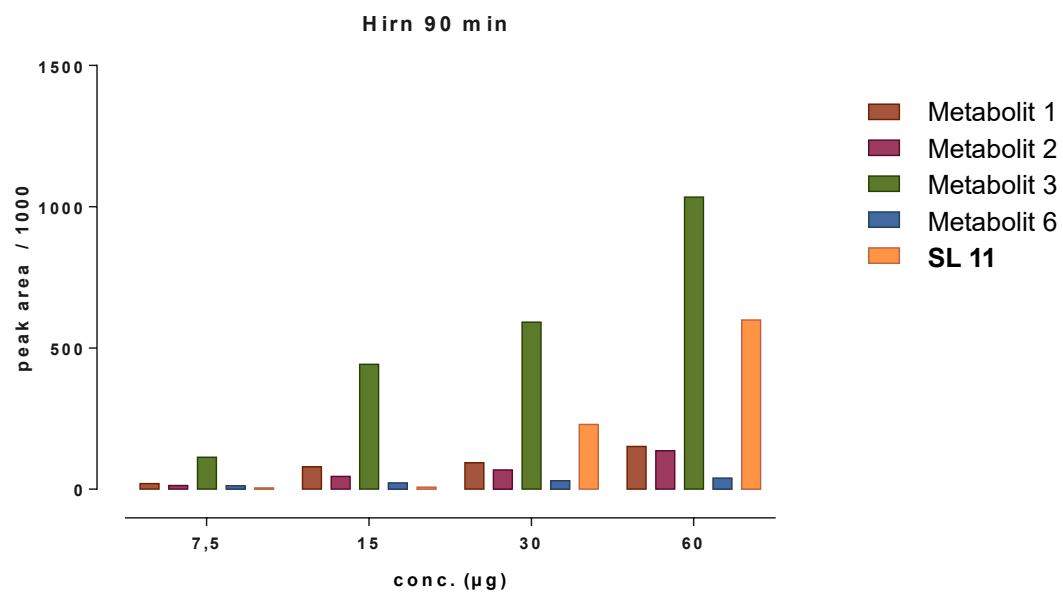
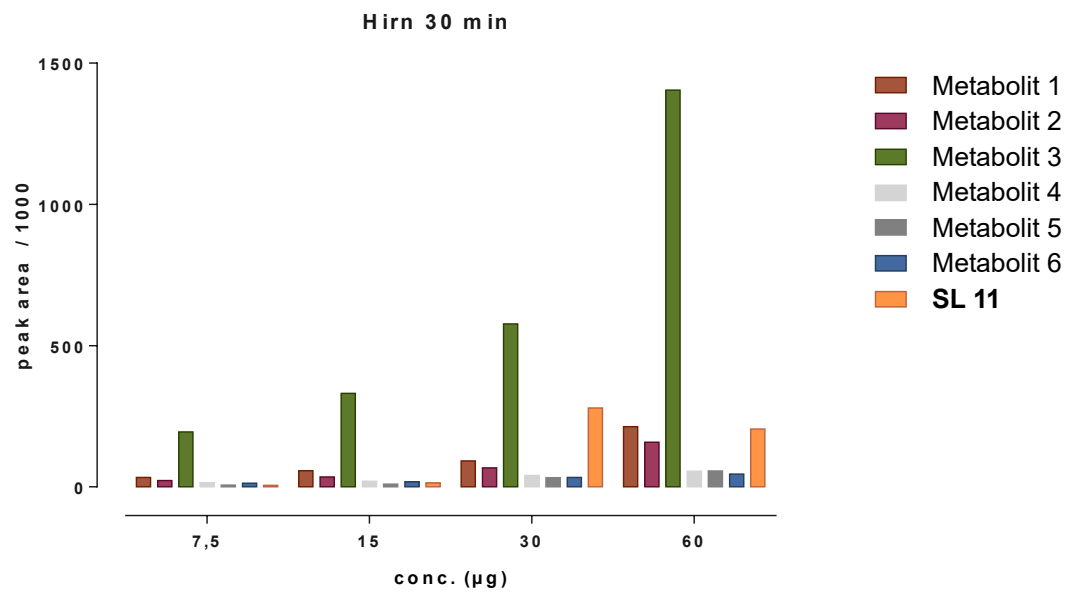


Abb. 47: Chromatogramm Peakflächen von SL11 im Hirn zu verschiedenen Abnahmezeitpunkten bei den Konzentrationen 7,5 µg, 15 µg, 30 µg und 60 µg

Die Organe werden mit verschiedenen Konzentrationen (7,5 µg, 15 µg, 30 µg und 60 µg) der Substanz SL 11 versetzt und jeweils nach 0 min, 10 min, 30 min und 90 min Proben entnommen.

Die einzelnen Farben stehen für verschiedene Peaks der unterschiedlichen Metabolite (siehe Legenden). Beim orangen Balken handelt es sich um die Substanz SL 11.

SL 11 wird in den verschiedenen Tierorganen qualitativ sehr ähnlich metabolisiert bzw. umgelagert. Wie aus den Abb. 38 – 47 ersichtlich, entstehen fünf bis sieben Metabolite bzw. Metabonate.

Metabonate sind Metabolite, die nicht enzymatisch gebildet werden z.B.: durch Säurehydrolyse.

Zwischen den einzelnen Organen sind jedoch quantitativ sehr große Unterschiede detektierbar.

Wie zu erwarten erfolgt die Umwandlung von SL 11 in der Schweineleber sehr rasch und es wird ein Hauptmetabolit gebildet, der direkt proportional zur Menge des eingesetzten SL 11 in den jeweiligen Versuchsansätzen ist. In nennenswerten Mengen kommen noch zwei weitere Metabolite vor.

In Abhängigkeit von der Zeit verschiebt sich die Verteilung der Metabolite untereinander zum Hauptmetabolit. Generell ist zu sagen, dass SL 11 sofort nach Versuchsbeginn umgesetzt wird, dies ist aus der Abb. 38 „Leber 0 min“ deutlich zu sehen.

Wie in Abb. 42 und 43 zu sehen verhält sich SL 11 im Nierengewebe ziemlich ähnlich zu den Leberhomogenisaten. Darüber hinaus entstehen mengenmäßig drei weitere Metabolite, dies in einer eindeutig höheren Konzentration als in der Leber. Anstatt sechs Metabolite bzw. Metabonate sind in der Niere jedoch nur vier Verbindungen inklusive SL 11 zu sehen.

Während also in Leber und Niere eine deutliche Biotransformation von SL 11 erfolgt, verhält sich SL 11 im Lungengewebe völlig konträr. Die Substanz selbst wird innerhalb der 90 Minuten Versuchszeitraum nur geringfügig abgebaut. Auch

ist die Bildung eines Hauptmetaboliten zu erkennen, der mengenmäßig nach 90 min in höchstem Versuchsansatz sogar dominiert (60 µg Inkubat).

Interessant ist, dass Metabolit 5 in der Lunge zu Versuchsbeginn in höherer Konzentration vorliegt als zu Versuchsende. Dies bedeutet, dass diese Verbindung zunächst gebildet und dann wieder abgebaut wird.

Als nächstes Organ wurde die Gewebsverteilung von SL 11 im Herz untersucht (Abb. 44 und 45). Es entstehen insgesamt fünf Metabolite, wobei Metabolit 4 sofort und in großen Mengen gebildet wird (vgl. Abb. 44 „Herz 0 min“) und in den Proben in deutlich höherer Konzentration als SL 11 vorliegt. Das restliche Peakmuster unterscheidet sich nicht wesentlich von den anderen Geweben.

Als letzte biologische Matrix wurde die Interaktion im Hirngewebe untersucht, indem bis zu sieben verschiedene Metabolite bzw. Metabonate erkennbar waren. Dies jedoch nur zu den Zeitpunkten 10 und 30 min nach Untersuchungsbeginn. Dies deutet auf eine „hohe“ Aktivität des Hirngewebes hin, was möglicherweise durch die extrem hohe lipophile Eigenschaft des Hirngewebes begründet ist. Als sehr lipophile Verbindung könnte SL 11 der geeignete Kandidat für diese Zersetzungsprozesse sein, denn üblicherweise besitzt Hirngewebe keine Metabolisierungsfähigkeiten.

Insgesamt kann festgehalten werden, dass SL 11 in den untersuchten Organen (mit den unterschiedlichsten Eigenschaften) eindeutig rasch umgewandelt wird, zu nicht näher definierbaren Reaktionsprodukten.

5. Zusammenfassung

Im Rahmen der Diplomarbeit wurden präklinische pharmakokinetische Informationen über drei potentiell wirksame Anthrachinone der Firma SeaLife Pharma eingeholt und die Plasma- und Gewebskonzentration von Chinonen ermittelt.

Es wurden die Sauerstoffradikale und die antioxidative Kapazität als Fort- und Ford-Werte ermittelt. Die Ergebnisse sind zufriedenstellend, da weder eine Überproduktion von freien Radikalen, noch ein Mangel an Antioxidanzien vorliegt und die Mäuse somit keinem (übermäßigen) oxidativen Stress ausgesetzt waren. Außerdem wurde die Aktivität der wichtigsten Lebertransaminasen ALP, GGT, GPT und GOT bestimmt.

Plasma und diverse Organe der Mäuse wurden auf Vorhandensein der Sea-Life Substanzen untersucht, nach intravenöser oder intraperitonealer Applikation, um einen Beweis für die Gewebsaufnahme zu gewinnen.

Die Chromatogramme (Abb. 28 – 32) zeigen die Konzentration von SL 11 und SL 22 im Plasma und in der Gewebeprobe bei Entnahme nach 30 bzw. 120 Minuten. Damit kann der zeitliche Verlauf des Abbaus dieser Substanzen aufgezeigt werden, d.h. ob sich die Substanz nach 120 Minuten noch nachweisen lässt oder ob sie bereits vollständig abgebaut worden ist.

Die Organe von diversen Tieren (z.B.: Hühnerherz) wurden mit SL 11 in verschiedenen Konzentrationen (7,5 µg, 15 µg, 30 µg und 60 µg) versetzt, jeweils nach 0 min, 10 min, 30 min und 90 min Proben entnommen und das „metabolic profiling“ durchgeführt.

6. Summary

As part of the thesis preclinical pharmacokinetic information on three potentially effective anthraquinones from the company SeaLife Pharma was collected and the plasma- and tissue concentration of quinones have been determined.

The oxygen radicals and the antioxidant capacity were detected as Fort- and Ford-values. The results are satisfying, because neither an overproduction of free radicals, nor a lack of antioxidants is present and the mice were not exposed to (excessive) oxidative stress.

In addition the activity of the main hepatic transaminases ALP, GGT, GPT and GOT were determined.

Plasma and various organs of the mice were examined for presence of the sea-life substances after intravenously or intraperitoneally application to obtain a proof of the tissue admission.

The chromatograms (figure 28 – 32) show the concentration of SL 11 and SL 22 in plasma and in the tissue sample upon removal after 30 and 120 minutes. This demonstrates the temporal degradation of these substances, i.e., whether the substance can be still detected after 120 minutes, or whether it has already been dismantled completely.

The organs of various animals (e.g.: chicken heart) were added SL 11 at various concentrations (7,5 µg, 15 µg, 30 µg und 60 µg), in each case after 0 min, 10 min, 30 min and 90 min samples have been obtained and the metabolic profiling accomplished.

7. Literaturverzeichnis

- [1] Sealife PHARMA® GMBH, Technopark 1/Obj.C/EG, 3430 Tulln, Austria
- [2] Dr. med. univ. Mag. pharm. Susanne Stejskal: Präklinische Untersuchungen mit neuen Anthrachinonderivaten, Universität Wien Diplomarbeit, Division für klinische Pharmazie und Diagnostik, Wien 2013
- [3] O. Benkert, H. Hippus, Kompendium der Psychiatrischen Pharmakotherapie, 9. Auflage, Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2013, p. 683
- [4] W. Renteln-Kruse, B. Frilling, L. Neumann, Arzneimittel im Alter, Walter de Gruyter GmbH 2014, Berlin/Boston, p. 4
- [5] E. Beubler, Kompendium der Pharmakologie, Gebräuchliche Arzneimittel in der Praxis, 3. Auflage, Springer-Verlag Wien 2011, p. 11, 12
- [6] H. Plötz, Kleine Arzneimittellehre für Fachberufe im Gesundheitswesen, 4. Auflage, Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2003, p. 15
- [7] K. Aktoris, U. Förstermann, F. Hofmann, K. Starke, Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie, 10. Auflage, Urban & Fischer, 2009, p. 36; 45-47
- [8] H. Schneemann, L.Y. Young, M. A. Koda-Kimble, Angewandte Arzneimitteltherapie: klinisch-pharmazeutische Betreuung in Fallbeispielen, Springer Verlag Berlin Heidelberg 2001, p. 29
- [9] H. Thiel, N. Roewer, Anästhesiologische Pharmakotherapie, 3. Auflage, Thieme Verlag Stuttgart 2014, p. 28; 41
- [10] E. Mutschler, G. Geisslinger, H. Kroemer, P. Ruth, M. Schäfer-Korting, Arzneimittelwirkungen kompakt, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH 2005, Stuttgart, p. 16

- [11] Arbeiter-Samariter-Bund Österreichs, Pharmakologie und allgemeine Notfallkompetenzen für den Rettungsdienst, Facultas Verlags- und Buchhandels AG 2011, Wien, p. 70,71
- [12] M. Wehling, klinische Pharmakologie, 2. Auflage, Thieme Verlag Stuttgart 2011, p. 45
- [13] N. Rietbrock, A. H. Staib, D. Loew, klinische Pharmakologie: Arzneitherapie, 4. Auflage, Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2001, p. 153
- [14] J. Achtmann, Der Schutz des Probanden bei der klinischen Arzneimittelprüfung, Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2013, p. 25
- [15] K.P. Schaps, O. Kessler, U. Fetzner, Das Zweite-kompakt: Querschnittsbereiche, Springer Medizin Verlag Heidelberg 2008, p. 241
- [16] D. Magnus, Medizinische Forschung an Kindern, Mohr Siebeck-Verlag Tübingen 2006, p. 30
- [17] V. R. Meyer, Praxis der Hochleistungs-Flüssigchromatographie, 9. Auflage, Wiley-VCH-Verlag GmbH & Co KGaA 2004, p. 160
- [18] M. Otto, Analytische Chemie, 4. Auflage, Wiley-VCH-Verlag GmbH & Co KGaA 2011, p. 420
- [19] R. Nießner, K. Höll, Wasser: Nutzung im Kreislauf: Hygiene, Analyse und Bewertung, 9. Auflage, Walter de Gruyter & Co KG 2010, Berlin/New York, p. 213
- [20] FORMplus Bedienungshandbuch – Version 1.0, Stand: 16.08.2006, © MICRO-MEDICAL Instrumente GmbH, D-61462 Königstein, p. 4; 10; 19; 20; 22; 23
- [21] Reflotron® IV Bedienungshandbuch, Böhlinger Mannheim GmbH, 1990
- [22] letzter Zugriff am 08.06.2016
http://www.cobas.at/home/products_services/reflotron_plus_system.html#sthash.0oJjFu6s.dpuf

[23] Arbeiten mit Reflotron® Plus, Kurzbedienungsanleitung, Roche Diagnostics Deutschland GmbH, 2010, p. 2

[24] FORM Informationsmappe, Stand: 01.08.2008, © MICRO-MEDICAL Instrumente GmbH, D-61462 Königstein, p. 7

[25] J. Hallbach, Klinische Chemie und Hämatologie, 3. Auflage, Thieme Verlag Stuttgart 2011, p. 149

8. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Grundstruktur Anthrachinone	1
Abb. 2: Durchblutung versch. Organe sowie Anteil dieser Organe am Körpergewicht	3
Abb. 3: Gleichgewicht zwischen gebundenen und ungebundenen Arzneistoffkonzentrationen im Plasma und Gewebe	5
Abb. 4: Weg eines Pharmakons durch den Organismus	6
Abb. 5: HPLC 2.....	18
Abb. 6: FORMPlus Gerät.....	19
Abb. 7: Küvette	19
Abb. 8: Reflotron.....	22
Abb. 9: Vortex	25
Abb. 10: Mikroeinsätze	25
Abb. 11: befüllte vials bereit zur HPLC-Analyse	25
Abb. 12: Eichgerade	26
Abb. 13: Minilys	27
Abb. 14: Probengefäße mit Keramikkügelchen	27
Abb. 15: Zentrifuge „Galaxy 16 DH“	28
Abb. 16: Kühlzentrifuge	28
Abb. 17: Entnahme der Leber.....	30
Abb. 18: waschen mit PBS	30
Abb. 19: Einwaage von ca. 200 mg in ein Homogenisationsröhrchen	30
Abb. 20: Hühnerherz	31
Abb. 21: Schweineleber.....	31
Abb. 22: Schweinehirn.....	31
Abb. 23: grafische Darstellung der Enzymaktivitätsmessungen	36
Abb. 24: Chromatogramm der Substanz SL 11 in der Niere bei Maus 3+4	37
Abb. 25: Chromatogramm der Substanz SL 11 im Urin bei Maus 3+4.....	38
Abb. 26: Chromatogramm der Substanz SL 11 in der Lunge bei Maus 3+4	38
Abb. 27: Chromatogramm der Substanz SL 19 in der Leber bei Maus 1+2.....	39
Abb. 28: Chromatogramm der Substanz SL 11 bei Maus 1 nach 30 und 120 min im Plasma nach intraperitonealer Gabe	40

Abb. 29: Chromatogramm der Substanz SL 11 bei Maus 3 nach 30 und 120 min im Plasma nach intravenöser Gabe	41
Abb. 30: Chromatogramm der Substanz SL 22 bei Maus 4 nach 30 und 120 min im Plasma nach intraperitonealer Gabe	42
Abb. 31: Chromatogramm der Substanz SL 22 bei Maus 5 nach 30 und 120 min im Plasma nach intraperitonealer Gabe	42
Abb. 32: Chromatogramm der Substanz SL 22 bei Maus 6 nach 30 und 120 min im Plasma nach intravenöser Gabe	43
Abb. 33: Chromatogramm der Substanz SL 11 in der Niere bei Maus 2 nach intraperitonealer Gabe und Maus 3 nach intravenöser Gabe	44
Abb. 34: Chromatogramm der Substanz SL 22 in der Niere bei Maus 4+5 nach intraperitonealer Gabe und Maus 6 nach intravenöser Gabe.....	45
Abb. 35: Chromatogramm der Substanz SL 22 in der Lunge bei Maus 6 nach intravenöser Gabe.....	46
Abb. 36: Chromatogramm der Substanz SL 11 im Urin bei Maus 3 nach intravenöser Gabe	46
Abb. 37: Chromatogramm der Substanz SL 22 im Urin bei Maus 6 nach intravenöser Gabe	47
Abb. 38: Chromatogramm Peakflächen von SL11 in der Leber zu versch. Abnahmezeitpunkten bei den Konzentrationen 7,5 µg, 15 µg, 30 µg und 60 µg.....	48
Abb. 39: Chromatogramm Peakflächen von SL11 in der Leber zu versch. Abnahmezeitpunkten bei den Konzentrationen 7,5 µg, 15 µg, 30 µg und 60 µg.....	49
Abb. 40: Chromatogramm Peakflächen von SL11 in der Lunge zu versch. Abnahmezeitpunkten bei den Konzentrationen 7,5 µg, 15 µg, 30 µg und 60 µg.....	50
Abb. 41: Chromatogramm Peakflächen von SL11 in der Lunge zu versch. Abnahmezeitpunkten bei den Konzentrationen 7,5 µg, 15 µg, 30 µg und 60 µg.....	51
Abb. 42: Chromatogramm Peakflächen von SL11 in der Niere zu versch. Abnahmezeitpunkten bei den Konzentrationen 7,5 µg, 15 µg, 30 µg und 60 µg.....	52

Abb. 43: Chromatogramm Peakflächen von SL11 in der Niere zu versch. Abnahmezeitpunkten bei den Konzentrationen 7,5 µg, 15 µg, 30 µg und 60 µg.....	53
Abb. 44: Chromatogramm Peakflächen von SL11 im Herz zu versch. Abnahmezeitpunkten bei den Konzentrationen 7,5 µg, 15 µg, 30 µg und 60 µg.....	54
Abb. 45: Chromatogramm Peakflächen von SL11 im Herz zu versch. Abnahmezeitpunkten bei den Konzentrationen 7,5 µg, 15 µg, 30 µg und 60 µg.....	55
Abb. 46: Chromatogramm Peakflächen von SL11 im Hirn zu versch. Abnahmezeitpunkten bei den Konzentrationen 7,5 µg, 15 µg, 30 µg und 60 µg.....	56
Abb. 47: Chromatogramm Peakflächen von SL11 im Hirn zu versch. Abnahmezeitpunkten bei den Konzentrationen 7,5 µg, 15 µg, 30 µg und 60 µg.....	57

9. Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Versuchstierdaten der Serie 1	11
Tab. 2: Versuchstierdaten der Serie 2	12/13
Tab. 3: verwendete Substanzen	14
Tab. 4: verwendete Chemikalien und Reagenzien	14
Tab. 5: verwendete Geräte und Materialien	15/16
Tab. 6: Daten der HPLC 4 – Anlage	17
Tab. 7: Daten der HPLC 2 – Anlage	18
Tab. 8: technische Daten FORMplus	19
Tab. 9: Referenzwerte der mit FORMplus messbaren Parameter (human)	21
Tab. 10: technische Daten Reflotron	22
Tab. 11: Referenzwerte ALP, GGT, GOT, GPT (human)	23
Tab. 12: statistische Parameter der Eichgerade	26
Tab. 13: Ergebnisse der Fort bzw. Ford-Messungen	33
Tab. 14: Referenzwerte der mit FORMplus messbaren Parameter (human)	33
Tab. 15: Schema der Probenentnahme für die Enzymaktivitätsbestimmung	35
Tab. 16: Ergebnisse der Enzymaktivitätsmessungen	35

10. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung(en)
ACD	Acid Citrate Dextrose
ACN	Acetonitril
ALP	Alkalische Phosphatase
bzw.	beziehungsweise
CK14	Keramikkügelchen Ø 1,4 mm
cm	Zentimeter
dest.	destilliert
d.h.	das heißt
DMSO	Dimethylsulfoxid
e.g.	lateinisch: exempli gratia, englisch: for example
FORD	free oxygen radicals defense
FORM	free oxygen radicals monitor
FORT	free oxygen radicals test
g	Gramm
GGT	Gamma-Glutamyltransferase
GOT	Glutamat-Oxalacetat-Transaminase
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase
h	Stunde(n)
HPLC	high performance liquid chromatography
Hz	Hertz
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
i.e.	lateinisch: id est, englisch: that is to say
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
KDI-Mix	= 4,5 g Kolliphor EL* + 28 ml Dimethyl-Isosorbid
kg	Kilogramm
KZI-Mix	= 13 g Kolliphor EL* + 20 ml DMSO
l	Liter
LED	Light Emitting Diode
m	männlich

mg	Milligramm
min	Minute(n)
MK28R	Stahlkügelchen Ø 2,8 mm
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mmol	Millimol
MS	Maus
nm	Nanometer
PBS	phosphate buffered saline, Phosphatpuffer
pKa	= negativer dekadischer Logarithmus der Säurekonstante Ka
RL	Ringerlösung
RP	reversed phase
sec	Sekunde(n)
SL-Substanz	Sea-Life-Substanz
Tab.	Tabelle
TROLOX	6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid
U/min	Umdrehungen pro Minute
U/l	Umdrehungen pro Liter
UV	Ultraviolett
vgl.	vergleiche
w	weiblich
z.B.	zum Beispiel
µg	Mikrogramm
µkat/l	Mikrokatal/Liter
µl	Mikroliter
°C	Grad Celsius
Ø	Durchmesser

* Kolliphor EL = Cremophor EL