

MASTERARBEIT | MASTER'S THESIS

Titel | Title

Intravenöse Eisenpräparate: Direkte Quantifizierung von labilen Eisenspezies in komplexer Matrix mittels auf Polystyren-Oberfläche immobilisiertem Eisen-Chelator

verfasst von | submitted by

Lina Hainoun BSc

angestrebter akademischer Grad | in partial fulfilment of the requirements for the degree of

Magistra pharmaciae (Mag. pharm.)

Wien | Vienna, 2025

Studienkennzahl lt. Studienblatt |
Degree programme code as it appears on the
student record sheet:

UA 066 605

Studienrichtung lt. Studienblatt | Degree
programme as it appears on the student
record sheet:

Masterstudium Pharmazie

Betreut von | Supervisor:

Mag. Dr. Barbara Scheiber-Mojdehkar

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die mich während der Erstellung dieser Masterarbeit unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt meiner Betreuerin Ao. Univ.-Prof. Dr. Barbara Scheiber-Mojdehkar, die mich mit wertvollen Ratschlägen, konstruktivem Feedback und fachlicher Expertise durch diese Arbeit begleitet hat. Ihre Unterstützung hat wesentlich zum Erfolg dieses Projekts beigetragen.

Darüber hinaus möchte ich meiner Familie und meinen Freunden meinen tiefsten Dank aussprechen. Sie haben mir nicht nur während der arbeitsintensiven Phasen der Masterarbeit mit ihrer Geduld und ihrem Zuspruch geholfen, sondern auch während meines gesamten Studiums.

Abstract

Background: Intravenous iron preparations such as Venofer and Monofer are used to treat iron deficiency when oral iron is ineffective.

The aim of this study was to optimize a method for quantification of labile iron and determine reproducibility and limits of detection and quantification. The method was used to investigate the release of labile iron from Venofer and Monofer, and to investigate, which test parameters could be optimized to obtain reproducible results.

Materials and Methods: The surface of polystyrene plates was coated with the iron chelator hydroxyethylstarch-coupled deferoxamine (HES-DFO). Different Iron calibration solutions as well as two intravenous iron preparations (Venofer and Monofer) were incubated in the coated wells for 2 hours at 37°C and washed thoroughly. Finally, HES-DFO-bound iron was detected by incubation of the wells with a reducing ferrozine reagent. The resulting ferrozine-iron complex was measured in a spectrophotometer plate reader at 540nm following different incubation periods at room temperature.

Results: The calibration curve was linear in the range of 0-250µM iron. The determination constant r^2 reached a value of 0.9925 at a 15-minutes incubation period with the ferrozine reagent and remained at this value up to one hour.

The detection limit for labile iron was 1,42µM and 1,97µM after 30 minutes and 60 minutes of incubation with the ferrozine reagent.

At the same iron concentration, Venofer released significantly more HES-DFO chelatable iron than Monofer. This points to a lower stability of Venofer and a higher iron binding stability of Monofer. Reproducibility of the method improved when the incubation with ferrozine reagent was extended from 30 to 60 minutes. Incubation for 60 minutes with ferrozine reagent, revealed intra- and inter-day CV < 5% and < 16.5% respectively.

Conclusion: The method presented allows for the quantification of labile iron in two intravenous iron preparations with good reproducibility. The observed differences in labile iron of Monofer and Venofer are in accordance with their known differences in stability. To perform the assay, a simple spectrophotometer plate reader with a filter for 540nm is required. In addition, the incubation of the samples in the coated polystyrene plates at 37°C and the quantification of the labile iron bound to HES-DFO in the wells can be staggered in time and space. However, when detecting HES-DFO-bound iron with ferrozine reagent, a strict time-based measurement protocol should be used to obtain reproducible results.

Zusammenfassung

Hintergrund: Intravenöse Eisenpräparate wie Venofer und Monofer werden eingesetzt, wenn ein Eisenmangel durch orales Eisen nicht effektiv ausgeglichen werden kann.

Ziel der Studie waren die Optimierung einer Methode zur Bestimmung von labilem Eisen sowie die Ermittlung der Reproduzierbarkeit und des Detektions- und Quantifizierungslimits der Methode. Mit dem Assay wurde untersucht, wie sich Venofer und Monofer bei der Freisetzung von labilem Eisen unterscheiden, und welche Untersuchungsparameter für eine reproduzierbare Erfassung optimiert werden sollten.

Materialien und Methoden: Polystyren-Platten wurden mit Hydroxyethylstärke-gekoppeltem Deferoxamin (HES-DFO), einem Eisenchelator, beschichtet. Eisenkalibrierlösungen sowie die beiden intravenösen Eisenpräparate Venofer und Monofer wurden in den Wells der beschichteten Platten für 2 Stunden bei 37°C inkubiert und anschließend gewaschen. HES-DFO-gebundenes Eisen wurde anschließend durch Inkubation mit reduzierend wirkendem Ferrozin-Reagenz nachgewiesen. Der entstehende Ferrozin-Eisen-Komplexe wurde nach unterschiedlichen Inkubationszeiten bei Raumtemperatur in einem Plattenphotometer bei 540nm gemessen.

Ergebnisse: Der Verlauf der Kalibrierkurve hatte im Bereich von 0-250µM Eisen einen linearen Verlauf. Die Determinationskonstante r^2 erreichte bereits nach 15 Minuten Inkubation mit dem Ferrozin-Reagenz einen Wert von 0,9925 und blieb bei Inkubationszeiten bis zu einer Stunde praktisch auf diesem Wert. Wurde die Detektionsgrenze für labiles Eisen nach 30 und 60 Minuten Inkubation mit Ferrozin-Reagenz untersucht, betrug sie 1,42µM und 1,97µM. Die Quantifizierungsgrenzen betrugen 3,63µM und 5,05µM zu den beiden Zeitpunkten. Venofer setzte bei gleicher Eisenkonzentration deutlich mehr chelatierbares Eisen frei als Monofer. Dies deutet auf eine geringere Stabilität von Venofer und eine stabilere Eisenbindung bei Monofer hin. Die Reproduzierbarkeit der Methode verbesserte sich durch die Verlängerung der Inkubationszeit mit Ferrozin-Reagenz von 30 auf 60 Minuten. So konnten nach 60 Minuten Inkubationszeit Intraday-Variationskoeffizienten unter 5% und ein Interday-Variationskoeffizient von 16,5% ermittelt werden.

Schlussfolgerung: Mit der Methode konnte das labile Eisen zweier intravenöser Eisenpräparate mit guter Reproduzierbarkeit quantifiziert werden. Der gefundene Unterschied im Gehalt an labilem Eisen kann dabei mit den aus der Literatur bekannten Stabilitätsunterschieden von Monofer und Venofer erklärt werden. Die Methode benötigt nur ein einfaches Platten-Spektralphotometer mit einem Filter für 540 nm. Die Inkubation der Proben in der beschichteten Polystyren-Platte bei 37°C und die Quantifizierung des an HES-DFO-gebundenen labilen Eisens in den Wells kann zeitlich und räumlich versetzt durchgeführt werden. Ein genaues zeitliches Messprotokoll sollte jedoch bei der Detektion mit Ferrozin-Reagenz eingehalten werden, um reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	8
1.1	Problemstellung	9
2	Literaturübersicht.....	9
2.1	Eisenfunktion.....	9
2.2	Systemische Eisenhomöostase	9
2.3	Eisenmetabolismus	11
2.4	Intravenöse Eisenpräparate	11
2.5	Vorkommen von labilem Eisen	12
2.6	Desferoxamin	12
2.7	Messung von labilem Eisen mit Desferoxamin	14
2.8	Hydroxyethylstärke-gekoppeltes Desferoxamin	14
2.9	Ferrozin.....	15
2.10	Ziel der Arbeit.....	17
3	Materialien und Methoden.....	18
3.1	Materialien.....	18
3.2	Lösungen und Puffer	18
3.2.1	Coatingpuffer	18
3.2.2	Coatinglösung mit HES-DFO:	19
3.2.3	10mM FeCl ₃ in 0,1M HCl	20
3.2.4	Entionisiertes Wasser	21
3.2.5	5mM EDTA.....	21
3.2.6	0,9% NaCl.....	21
3.2.7	HBS, pH 7,3	21
3.2.8	0,1N HCl.....	21
3.2.9	Ascorbinsäure-Lösung (AA1)	22

3.2.10	Ascorbinsäure-Ferrozine-Reagens (AA2F)	22
3.3	<i>Eisenbindungseffizienz unterschiedlicher Polystyrenplatten</i>	22
3.3.1	Beschichtung der Polystyrenplatte mit HES-DFO.....	22
3.3.2	Waschen der Platten	22
3.3.3	Aufbringen der Eisenstandardlösung:.....	23
3.3.4	Inkubation der Eisenstandardlösung:	23
3.3.5	Waschen der Platte:	23
3.3.6	Quantifizierung des DFO- gebundenen Eisens.....	23
3.4	<i>Herstellung der Kalibrierlösung mit FeCl₃</i>	25
3.5	<i>Herstellung von Messproben mit intravenösen Eisenpräparaten (I)</i>	26
3.6	<i>Herstellung der Messproben mit intravenösen Eisenpräparaten (II)</i>	27
3.7	<i>Herstellung von Qualitätskontrollproben mit Venofer und Monofer</i>	28
3.8	<i>Messung von DFO-chelatierbarem Eisen</i>	29
3.8.1	Beschichtung von Greiner-Platten mit Coatinglösung mit HES-DFO	29
3.8.2	Aufbringen der Proben:.....	29
3.8.3	Inkubation der Proben	30
3.8.4	Waschen der Platten	30
3.8.5	Quantifizierung des HES-DFO-gebundenen Eisens in den Wells	31
3.9	<i>Visualisierung der Beschichtung mittels digitaler 3-D-Mikroskopie</i>	32
3.10	<i>Statistische Auswertung</i>	32
4	Ergebnisse	33
4.1	<i>Oberflächenbeschaffenheit von Polystyren-Platten zweier Hersteller vor und nach Beschichtung mit HES-DFO</i>	33
4.2	<i>Messung von HES-DFO-gebundenem Eisen mit Ferrozine-Reagenz auf Platten zweier Hersteller</i>	35
4.3	<i>Einfluss der Inkubationszeit auf die Kalibrierkurven</i>	37
4.3.1	Platten von Greiner	37
4.3.2	Platten von NUNC.....	38

4.4	<i>Eisenstandardkurve auf HES-DFO beschichteten Platten von Greiner</i>	38
4.5	<i>Einfluss der Inkubationszeit auf Anstieg und Bestimmtheitsmaß der Standardkurve</i>	40
4.6	<i>Ermittlung von LOD und LOQ</i>	41
4.6.1	<i>Vergleich LOD und LOQ auf Polystyren-Platten unterschiedlicher Anbieter</i>	44
4.7	<i>Quantifizierung von HES-DFO-gebundenem Eisen bei intravenösen Eisenpräparaten mit niederer und hoher Stabilität</i>	44
4.8	<i>Intra- und Interday-Variation der Messung</i>	47
4.8.1	<i>Intraday-Variation</i>	47
4.8.2	<i>Interday-Variation</i>	50
5	Schlussbetrachtung	54
7	Verzeichnisse	61
7.1	<i>Abkürzungsverzeichnis</i>	61
7.2	<i>Abbildungsverzeichnis</i>	63
7.3	<i>Tabellenverzeichnis</i>	65
7.4	<i>Literaturverzeichnis</i>	66

1 Einleitung

Diese Studie befasst sich mit der Optimierung einer Methode zur Bestimmung von labilem Eisen sowie deren Reproduzierbarkeit. Mit der Methode wird labiles chelatierbares Eisen von intravenösen Eisenpräparaten gemessen, um deren Stabilität und Eisensfreisetzung zu untersuchen.

Obwohl orale Eisenpräparate unkompliziert und kostengünstig sind, wird deren Anwendung durch Nebenwirkungen, niedrige Compliance, unzureichende Absorption und eingeschränkte Wirksamkeit beeinträchtigt. Es besteht auch noch weiterer Forschungsbedarf, um Dosierung und zeitliche Abfolge der Einnahme für die einzelnen Präparate zu optimieren. (Pantopoulos 2024)

Im Gegensatz dazu bieten verschiedene intravenöse Eisenpräparate eine interessante Option für eine sichere Eisenversorgung. Sie benötigen jedoch eine intensivere klinische Überwachung, da es zu zwei Reaktionen kommen kann: einer Typ-I-IgE-vermittelten Anaphylaxie, insbesondere bei Eisen-Dextran, und einer anaphylaktoiden Reaktion mit Symptomen wie Atemnot und Hypotonie aufgrund einer Transferrin-Überlastung. (Macdougall 1999)

Die verfügbaren Präparate zeigen starke Unterschiede in ihrer Abbaukinetik, Bioverfügbarkeit, möglichen Nebenwirkungen und maximal empfohlener Einzeldosis. Die Behandlung mit intravenösem Eisen wird insbesondere für Dialysepatienten empfohlen, wenn das Serumferritin unter 100 µg/l liegt, die Transferrin-Sättigung unter 20% fällt oder mehr als 10% der roten Blutkörperchen hypochrom sind. Zudem kann i.v. Eisen vor der Therapie mit Erythropoietin (EPO) verabreicht werden, um Eisenmangelanämie zu vermeiden, Eisenmangel zu behandeln oder die Reaktion auf EPO zu unterstützen. Außer bei Dialysepatienten erfolgt die Gabe von i.v. Eisen in der Regel als einmalige Dosis. Orale Präparate müssen hingegen 2–3-mal täglich eingenommen werden. (Macdougall 1999)

1.1 Problemstellung

Intravenöse Eisenpräparate wie Venofer und Monofer werden häufig zur Behandlung von Eisenmangel eingesetzt, sie unterscheiden sich aber in ihrer Stabilität und der Freisetzung von labilem Eisen. Labiles Eisen kann eine toxische Wirkung haben und unerwünschte Nebenwirkungen verursachen. Derzeit gibt es keine standardisierte Methode, die Unterschiede in der Stabilität und der Eisenfreisetzung dieser Präparate unter verschiedenen Bedingungen zuverlässig erfassen kann. Ziel dieser Arbeit war die Optimierung einer Methode zur Quantifizierung von labilem Eisen, die Genauigkeit der Messung zu prüfen, sowie die Detektions- und Quantifizierungsgrenze zu ermitteln.

2 Literaturübersicht

2.1 Eisenfunktion

Eisen ist ein notwendiges Element für den menschlichen Körper und spielt eine zentrale Rolle beim Sauerstofftransport, der DNA-Synthese und der Energiegewinnung.

Es ist essentiell für die Produktion von Erythrozyten und ist in Hämoglobin im Häm als Zentralatom enthalten, welches reversibel Sauerstoff binden kann und für den Sauerstofftransport von der Lunge zu den Geweben benötigt wird.

Etwa 70% des Körpereisens sind in den zirkulierenden Erythrozyten als Hämoglobin enthalten. Im Blutplasma ist Eisen an das Eisentransportprotein Transferrin gebunden, in Zellen und Geweben wird Eisen im Eisenspeicherprotein Ferritin gespeichert. Gealterten Erythrozyten werden vom retikuloendothelialen System abgebaut und das Eisen wird anschließend wieder ans Plasma freigesetzt und anschließend an Transferrin gebunden und in dieser Form zum Knochenmark und anderen Organen transportiert. Weiter wird Eisen auch für die Synthese von Enzymen, Hormonen und Eisenschwefelproteinen benötigt (Gupta 2014).

2.2 Systemische Eisenhomöostase

Durch die systemische Eisenhomöostase wird die Eisenkonzentration im Blutplasma und der extrazellulären Flüssigkeit kontrolliert, ebenso die Aufnahme von Nahrungseisen über Enterozyten und die Eisenfreisetzung aus Makrophagen und Hepatozyten. Als Hauptregulator der systemischen Eisenhomöostase wurde das Peptidhormon Hepcidin, welches hauptsächlich von Hepatozyten synthetisiert wird, identifiziert. Es kontrolliert dabei die

Eisenabgabe aus duodenalen Enterozyten, Makrophagen und Hepatozyten, indem es durch Bindung an Ferroportin dessen Abbau bewirkt. Dadurch findet eine verringerte Eisenaufnahme über Ferroportin aus den Zellen statt. Ferroportin (ein Membrantransport-Protein) kommt in den meisten Zelltypen in sehr niedrigen Konzentrationen vor. Enterozyten und Makrophagen haben eine höhere Ferroportin-Expression, während Hepatozyten den Eisenexporter Ferroportin in mittleren Konzentrationen exprimieren. (Ganz und Nemeth 2012)

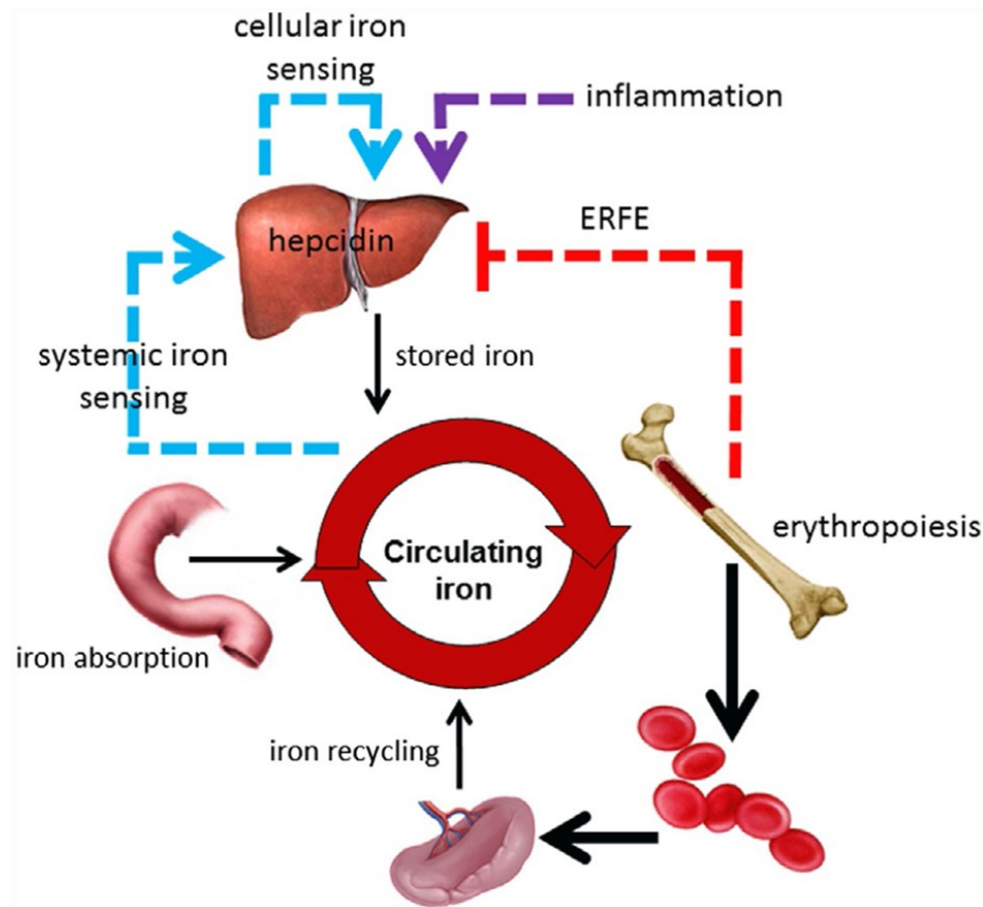


Abbildung 1: Eisenmetabolismus und Regulation der Hepcidin-Expression

Hepcidin reguliert die Eisenabsorption im Duodenum, das Rezyklieren des Eisens von gealterten Erythrozyten über die Makrophagen des retikuloendothelialen Systems und die Speicherung von Eisen in der Leber. Blauen Pfeile deuten die Regulation der Hepcidin-Expression durch eisenregulierte Faktoren an, der violette Pfeil weist auf die Rolle von inflammatorischen Zytokinen hin und der rote Pfeil weist auf die Verminderung der Expression durch die Erythropoese hin. Erythroferron (ERFE) dürfte an einer Erleichterung der Eisenaufnahme bei Anämie beteiligt sein. Quelle: Abbildung entnommen mit Erlaubnis des Verlags aus: Ginzburg, Y. Z. (2019). Hepcidin-ferroportin axis in health and disease. *Vitamins and hormones*, 110, 17–45, Figure 1, page 21 (19. 12.2024)

2.3 Eisenmetabolismus

Transferrin-gebundenes Eisen versorgt auch das Knochenmark mit diesem Metall für die Erythropoese. Im Knochenmark werden die Erythrozyten-Vorläufer fast ausschließlich durch Transferrin mit Eisen versorgt. Die Aufnahme erfolgt dabei über Transferrinrezeptorvermittelte Endozytose. Im Gegensatz dazu können Hepatozyten und andere nicht-erythroide Zellen Eisen auch von nicht-transferringebundenem Eisen (NTBI) aufnehmen. Dies spielt vor allem bei einer Eisenüberladung eine Rolle. (Brissot u. a. 2012)

Chronisch niedrige Eisenkonzentrationen können zu einer schlechten Versorgung der Erythropoese mit Eisen und in weiterer Folge zu einer Eisenmangelanämie führen. Hohe Eisenkonzentrationen können zu erhöhter Transferrinsättigung und weiter zum Auftreten von NTBI führen. Nicht-Transferrin-gebundenes Eisen (NTBI, non-transferrin-bound iron) bildet sich, wenn die Transferrinbindungskapazität überschritten wird, und kann von Hepatozyten und Kardiomyozyten aufgenommen werden, wobei die genauen Mechanismen noch unklar sind. Dadurch kann es in weiterer Folge zu einer Eisenablagerung in Organen wie der Leber und dem Herzen kommen. (Brissot u. a. 2012)

Holotransferrin bindet an den Transferrinrezeptor und wird endozytiert. In den sauren Endosomen wird Transferrin-gebundenes Eisen von Transferrin freigesetzt, während das weiterhin an den Transferrin-Rezeptor gebundene, eisenfreie Apo-Transferrin wieder zur Plasmamembran zurückkehrt. Im Endosom wird dreiwertiges Eisen durch eine Eisenreduktase in seine zweiwertige Form umgewandelt und dann ins Zytoplasma oder die Mitochondrien transportiert. In den Mitochondrien wird Eisen auch für den letzten Schritt der Häm-Synthese benötigt. Im Zytoplasma wird es für die Synthese von eisenhaltigen Proteinen verwendet oder in Ferritin, einem Eisenspeicherprotein, gespeichert. (Brissot u. a. 2012; Ganz und Nemeth 2012)

2.4 Intravenöse Eisenpräparate

Intravenöse Eisenpräparate werden zur Eisensupplementierung eingesetzt, wenn orale Präparate nicht vertragen werden oder der Eisenbedarf zu hoch ist, um das Eisendefizit durch orales Eisen auszugleichen. Auch wenn ein rasches Auffüllen von Eisenspeichern nötig ist, kann eine Therapie mit intravenösem Eisen indiziert sein. (Macdougall 1999)

Die klinisch eingesetzten intravenösen Eisenpräparate sind kolloidale Eisennanopartikel. Bei diesen Präparaten wird ein Eisen(III)-Kern durch eine Kohlenhydrathülle stabilisiert. (Geisser, Baer, und Schaub 1993; Macdougall 1999)

Es sind verschiedene intravenöse Eisenpräparate erhältlich, wie zum Beispiel Eisen-Dextran, Eisen-Saccharat, Eisen-Dextrin (Polymaltose), Eisen-Gluconat oder Eisen-Isomaltosid. Die verschiedenen Eisenpräparate unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Abbaukinetik bzw. Stabilität. Die Stabilität des Komplexes beeinflusst dabei die Geschwindigkeit, mit der Eisen freigesetzt wird. Daneben hat auch die Molekülgröße Einfluss auf diese Parameter. (Macdougall 1999)

Venofer besteht aus einem Eisensaccharat-Komplex und bildet einen weniger stabilen Komplex als Monofer, welches aus einem Eisenisomaltosid-Komplex besteht. (Schaefer u. a. 2020)

2.5 Vorkommen von labilem Eisen

In lebenden Systemen ist Eisen überwiegend an Proteine gebunden, es kann aber auch labiles Eisen (LCI, labile cell iron) nachgewiesen werden. LCI umfasst chelatierbare Komplexe von zwei und dreiwertigem Eisen und wird durch die Metallkonzentration, pH-Wert und das Redoxpotential beeinflusst. Es spielt eine Schlüsselrolle in der zellulären Eisenhomöostase und wird durch das Iron-Regulatory-Element - Iron Regulatory-Protein System (IRE-IRP-System) kontrolliert, das die Aufnahme und Speicherung von Eisen in die Zelle ausbalanciert. LCI fungiert als Indikator für den Eisengehalt und wird durch das Gleichgewicht zwischen Eisenaufnahme und -speicherung reguliert. Eine erhöhte Konzentration an Transferrin-gebundenem Eisen führt zu einem Anstieg des LCI, während pathologisch hohe LCI-Spiegel die Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) katalysieren können, die in der Folge Zellschäden verursachen können. (Cabantchik 2014)

2.6 Desferoxamin

Desferoxamin (DFO) ist ein Eisenchelator (Abbildung 2). (PubChem o. J.)

DFO ist ein hydrophiles Molekül, das Eisen im Verhältnis von 1:1 komplexiert und natürlich im Bakterium *Streptomyces pilosus* vorkommt. Therapeutisch wird DFO eingesetzt, um sekundäre Eisenüberladungskrankheiten zu therapieren. Es kann Eisen in der Leber Eisen

komplexieren und chelatiert beim Hämoglobinabbau freigesetztes Eisen. DFO bildet mit Eisen einen sehr stabilen Komplex und wird über den Urin ausgeschieden. DFO ist ein sehr spezifischer Chelatbildner für Eisen und kann Eisen effektiv aus Geweben und Zellen entfernen, indem es Eisen aus Ferritin und Hämosiderin mobilisiert. Im Gegensatz dazu erfolgt praktisch keine Mobilisierung von Eisen aus Transferrin und Lactoferrin.

DFO wird rascher aus dem Plasma entfernt als der Eisen-DFO Komplex und wird klinisch zur Verbesserung der Symptome einer Eisenüberladung eingesetzt. (Dayani u. a. 2004)

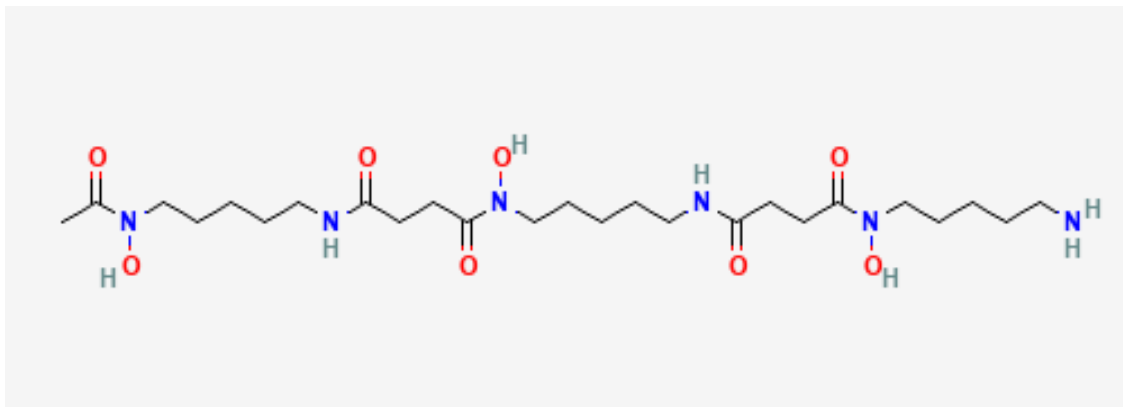


Abbildung 2: Chemische Struktur von Deferoxamin (DFO)

Die Abbildung stammt aus PubChem und ist veröffentlicht unter PubChem Identifier: CID 2973, URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Deferoxamine#section=2D-Structure>, Seite besucht am 16.12.2024. (PubChem, o. J.-a)

2.7 Messung von labilem Eisen mit Deferoxamin

Nicht-Transferrin-gebundenes Eisen (NTBI) wird auch als labiles Eisen bezeichnet und kann im Plasma im Zusammenhang mit einer Eisenüberladungserkrankung, sowie anderen pathologischen Zuständen auftreten (Breuer u. a. 2000).

DFO kann labiles Eisen effektiv komplexieren, während Eisen aus Ferritin oder Hämosiderin durch den Chelator nur langsam freigesetzt wird. Transferrin-gebundenes Eisen wird hingegen von Desferoxamin praktisch nicht mobilisiert. (Dayani u. a. 2004)

Breuer und Kollegen haben zur quantitativen Bestimmung von NTBI eine Methode entwickelt, bei der durch Oxalsäure mobilisiertes NTBI durch ein in einer Platte fixiertes Deferoxamin (DFO) gebunden wird. Anschließend wurde von Breuer et al die Menge des an DFO gebundenen Eisens durch Zugabe eines nicht-fluoreszierenden Calcein-Komplexes mit Eisen detektiert. Dabei wurde Eisen aus dem weniger stabilen Eisen-Calcein-Chelat von DFO komplexiert, wodurch fluoreszierendes Calcein gebildet wurde. Proben mit wenig Eisen hatten dadurch eine höhere Fluoreszenzintensität, da noch eisenfreies DFO in den Wells der Platte vorhanden war. Die Fluoreszenz wurde bei dieser Methode mit einem Fluoreszenzplattenlesegerät gemessen (Breuer u. a. 2000). In der hier vorliegenden Arbeit wurde anstelle von Calcein der Eisenchelator Ferrozin eingesetzt, wodurch die fluorimetrische Messung durch eine photometrische Messung ersetzt werden konnte.

2.8 Hydroxyethylstärke-gekoppeltes Deferoxamin

Eine Weiterentwicklung von DFO stellt Hydroxyethylstärke-gekoppeltes-Deferoxamin (HES-DFO) dar (Abbildung 3). HES-DFO entsteht durch die kovalente Bindung von DFO an HES und stellt eine hochmolekulare Form von DFO dar. (Dragsten u. a. 2000)

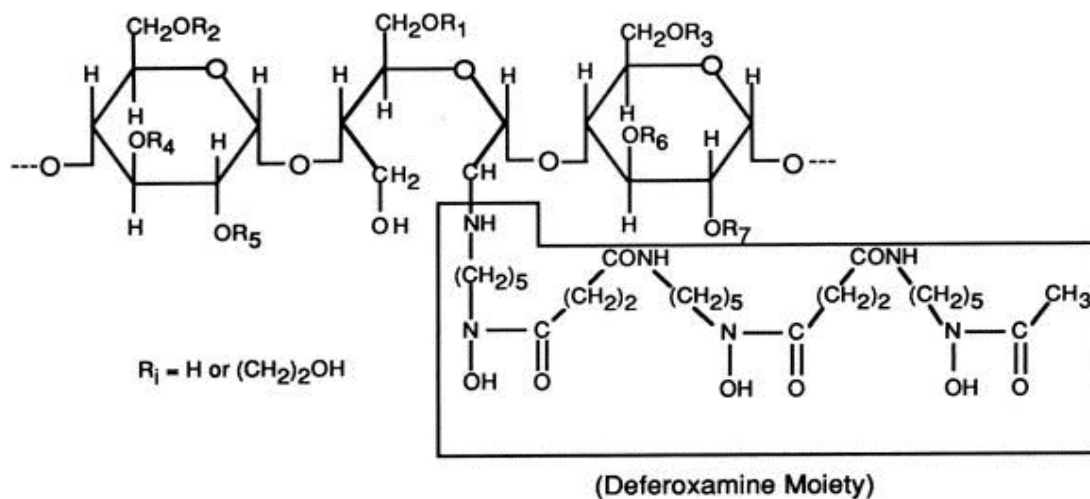


Abbildung 3: Molekulare Struktur von Hydroxyethylstärke-gekoppeltem Deferoxamin

Abbildung entnommen aus Dragsten, P. R., Hallaway, P. E., Hanson, G. J., Berger, A. E., Bernard, B., & Hedlund, B. E. (2000). First human studies with a high-molecular-weight iron chelator. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 135(1), 57–65. [https://doi.org/10.1016/S0022-2143\(00\)70021-7](https://doi.org/10.1016/S0022-2143(00)70021-7), figure 1, page 58; Erlaubnis eingeholt beim Copyright Clearance Center's RightsLink Service am 19.12.2024. (Dragsten u. a. 2000)

Klinische Untersuchungen mit HES-DFO zeigten eine höhere Sicherheit unter Erhalt der Eisenbindungsfähigkeit von DFO. Desferoxamin selber ist aufgrund seiner Toxizität bei hohen intravenösen Dosen und dem Auftreten einer Hypotonie und seiner geringen Halbwertszeit im Plasma weniger geeignet. DFO hat eine Halbwertszeit im niedrigen ein-bis zweistelligen Bereich, während durch die Kopplung an Hydroxyethylstärke die Halbwertszeit stark erhöht mit etwa 20 bis 30 Stunden angegeben wird. (Dragsten u. a. 2000a)

Eine Modifikation von HES-DFO, Stärke-konjugiertes DFO (S-DFO; 40SD02), wurde in einer klinischen Studie getestet und könnte auch bei nur wöchentlicher Verabreichung wirksam sein. (Harmatz u. a. 2007)

2.9 Ferrozin

Zur Bestimmung von Eisen in biologischen Proben können unterschiedliche Methoden, wie Ionenchromatographie, Fluorimetrie, Atomabsorptionsspektrometrie (AAS) oder Photometrie verwendet werden. Die spektroskopischen Methoden basieren auf der Bildung von gefärbten Eisenkomplexen und werden, da sie schnell durchführbar sind und auch automatisiert werden können, am häufigsten eingesetzt. (Malik u. a. 2020)

Der Eisenchelator Ferrozin wird zur spektroskopischen Bestimmung von Fe(II) eingesetzt (Abbildung 4). Um Eisen (d.h. zwei- und dreiwertiges Eisen) durch Ferrozin vollständig zu erfassen müssen Reduktionsmittel eingesetzt werden. Durch Einsatz von Ascorbinsäure als Reduktionsmittel wird in der Probe vorhandenes Fe(III) zu Fe(II) zu reduzieren. Ferrozin wird vor allem deswegen zur Messung von Eisen verwendet, da die Nachweisgrenze und die Blindwerten dieser Methode niedrig sind. (Giokas, Paleologos, und Karayannis 2002)

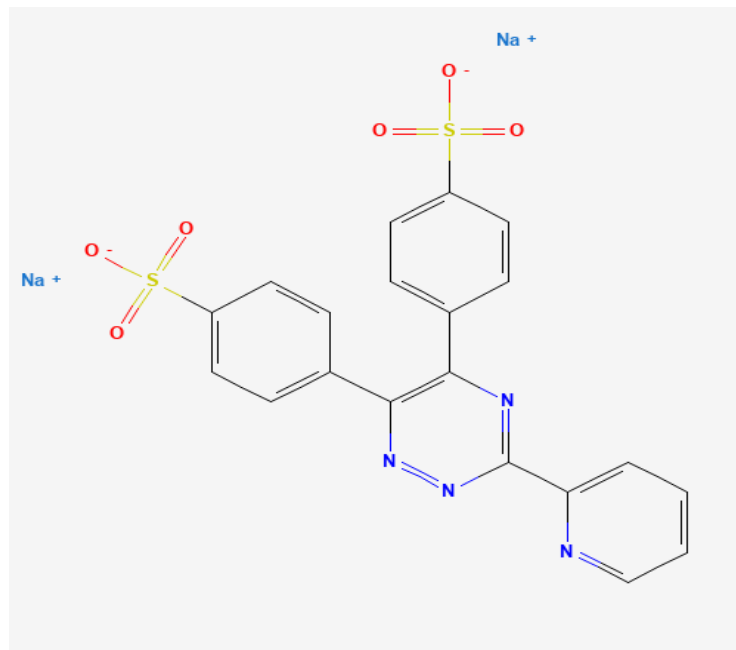


Abbildung 4: Chemische Struktur von Ferrozine

Die Abbildung stammt aus PubChem und ist veröffentlicht unter PubChem Identifier: CID 34127, URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Ferrozine#section=2D-Structure>, Seite besucht am 16.12.2024.

2.10 Ziel der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, eine Methode zur quantitativen Bestimmung von labilem chelatierbarem Eisen in intravenösen Eisenpräparaten zu optimieren und deren Reproduzierbarkeit zu validieren. Untersucht wurde, ob sich die intravenösen Eisenpräparate Venofer und Monofer, welche unterschiedliche Stabilität besitzen, mit dieser Methode hinsichtlich der Freisetzung von labilem Eisen unterscheiden lassen. Zudem sollten Einflüsse von Messparametern, wie der Inkubationszeit mit Ferrozin-Reagenz, auf die Ergebnisse untersucht werden, um optimale Bedingungen für die Durchführung der Messung zu ermitteln.

3 Materialien und Methoden

3.1 Materialien

Polystyrenplatten:

Für die Bindung des Hydroxyethylstärke-gekoppelten Deferoxamin (HES-DFO) wurden Polystyrenplatten mit herausnehmbaren Strips von zwei verschiedenen Herstellern verwendet:

- Greiner:

Bestellnummer: 07090143.

Hersteller: Greiner, BioOne, Austria

- NUNC:

Bestellnummer: unbekannt.

Hersteller: NUNC-Immuno Module MAXISORP, Inter Med, Austria

Hydroxyethylstärke gekoppeltes Deferoxamin:

Hydroxyethylstärke gekoppeltes Deferoxamin (HES-DFO)

Hersteller: Biomedical Frontiers, Inc., USA

3.2 Lösungen und Puffer

3.2.1 Coatingpuffer

Zur Herstellung des Coatingpuffers wurden zwei Lösungen hergestellt:

- **10mM dibasisches Natriumphosphat:** 1,791g Na_2HPO_4 (von Merck) wurden in einem Endvolumen von 500ml in destilliertem Wasser gelöst.
- **10mM monobasisches Natriumphosphat:** 0,6899 g NaH_2PO_4 (von Merck) wurden in einem Endvolumen von 500ml in destilliertem Wasser bei Raumtemperatur gelöst.

10mM dibasisches Natriumphosphat wurde unter Kontrolle des pH-Wertes mittels pH-Elektrode (Schott) unter Rühren langsam mit 10mM monobasisches Natriumphosphat versetzt, bis sich ein stabiler pH-Wert von 8,6 eingestellt hat. Der so hergestellte Coatingpuffer wurde bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert.

3.2.2 Coatinglösung mit HES-DFO:

Zur Herstellung der Coatinglösung mit HES-DFO wurden 60mg HES-DFO in 120ml Endvolumen Coatingpuffer in einem Becherglas gelöst.

Da auch längeres Rühren unter Verwendung eines Magnetrührers zu keiner vollständigen Lösung von HES-DFO im Coatingpuffer führte, wurde die Lösung in weiterer Folge in einem Ultraschallbad (Sonorex Super RK 255 H, Bandelin, Deutschland) bei 25 °C für insgesamt sechs Minuten beschallt (Abbildung 5).



Abbildung 5: Sonorex Ultraschallbad

(Quelle: eigene Aufnahme)

Da dies ebenfalls noch zu keiner homogenen Lösung von HES-DFO in Coatingpuffer führte, wurde die Lösung noch weiter für sieben Minuten in einem Branson Sonifier 450 (Duty Cycle: 30 %, Output: zwischen 15 und 20W) beschallt (Abbildung 6). Dabei wurde das Becherglas mit der Lösung in einer Sicherheits-Sonikationskammer platziert (Abbildung 7) und mittels eingetauchter Ultraschallsonde beschallt (Abbildung 8).

Danach wurde die Lösung weitere 5 Minuten in dem zuvor verwendeten Ultraschallbad (Sonorex Super RK 255 H) behandelt. Die Lösung wurde bis zum Auftragen auf die Platte weiter mittels Magnetrührer gerührt. Mit dieser Kombination von Behandlungsmaßnahmen konnte eine homogene Lösung von HES-DFO in Coatingpuffer für die Beschichtung der Polystyrenplatten erzielt werden.



Abbildung 6: Branson Sonifier 450 Ultraschall
(Quelle: eigene Aufnahme)



Abbildung 7: Sicherheits-Sonifikationskammer
(Quelle: eigene Aufnahme)



Abbildung 8: Lösung mit eingetauchter
Ultraschallsonde in der Sicherheits-
Sonifikationskammer
(Quelle: eigene Aufnahme)

3.2.3 10mM FeCl₃ in 0,1M HCl

Für die Herstellung von Eisenstandardlösungen mit unterschiedlichen Konzentrationen wurde eine Stocklösung mit 10mM Eisenchlorid in 0,1M Salzsäure hergestellt.

Dafür wurden 27mg Eisen (III)-chlorid x 6 H₂O (FeCl₃·6H₂O, MG= 270,30 g/Mol, MERCK) in 10 ml 0,1M Salzsäure (HCl) gelöst. Die Lösung wurde im Kühlschrank bei 4°C gelagert

3.2.4 Entionisiertes Wasser

Mit Hilfe des GFL-Wasserdestillierapparates mit Vorratsgefäß wurde hochreines, keim- und pyrogenfreies destilliertes Wasser mit sehr niedrigem Leitwert (ca. 2,3µS/cm bei 20°C) vorbereitet. Das Destillat entspricht den DAB-Vorschriften und den Bestimmungen internationaler Pharmakopöen.

3.2.5 5mM EDTA

Zur Herstellung von 5mM EDTA wurden 0,5g EDTA-Natriumsalz (Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA-Natriumsalz, MG=372,24g/Mol, Schmelzpunkt = 248°C, Sigma-Aldrich) in einem Becherglas mit ca. 400ml destilliertem Wasser bei Raumtemperatur gelöst und anschließend in einem Messkolben mit dest. Wasser auf 500ml Endvolumen aufgefüllt. Die Lösung wurde im Kühlschrank bei 4°C gelagert.

3.2.6 0,9% NaCl

Hierbei wurde 4,5g NaCl (MG= 58,44 g/Mol, Dichte= 2,17, CARL ROTH) eingewogen, und in ca. 400ml Wasser bei Raumtemperatur gelöst. Die Lösung wurde dann in einem Messkolben mit dest. Wasser auf 500ml Endvolumen aufgefüllt. Die Lösung wurde im Kühlschrank bei 4°C gelagert.

3.2.7 HBS, pH 7,3

Eine HEPES-gepufferte Salzlösung mit 500ml Endvolumen wurde hergestellt, indem 2,383 g HEPES (MG= 238,31g/Mol, CARL ROTH) und 4,383g NaCl in ca. 400ml destilliertem Wasser bei Raumtemperatur vollständig gelöst wurde. Anschließend wurde der pH-Wert mit 5M NaOH und 1M NaOH auf pH 7,3 eingestellt und anschließend in einem Messkolben mit destilliertem Wasser auf 500ml Endvolumen aufgefüllt. Die Lösung wurde im Kühlschrank bei 4°C gelagert.

3.2.8 0,1N HCl

Zur Herstellung von 50ml 0,1N HCl-Lösung wurden 5ml 1M HCl mit destilliertem Wasser verdünnt und auf ein Endvolumen von 50 ml in einem Messzylinder eingestellt. Die Lösung wurde im Kühlschrank bei 4°C gelagert.

3.2.9 Ascorbinsäure-Lösung (AA1)

4,4g Ascorbinsäure (Vitamin C, Apotheke zur Austria, Wien) wurden in einem Endvolumen von 25ml in 0,9%iger NaCl bei Raumtemperatur gelöst. Anschließend wurde die Lösung (AA1) aliquotiert zu je 2ml und bei -20°C gelagert.

3.2.10 Ascorbinsäure-Ferrozin-Reagens (AA2F)

Zur Herstellung des Ascorbinsäure-Ferrozin-Reagens AA2F wurde ein Eppendorf-Gefäß der Ascorbinsäure-Lösung AA1 (enthält 2 ml der Lösung AA1), aus dem Gefrierschrank entnommen und aufgetaut. Anschließend wurde 2 ml AA1 mit 10 ml 0,9 % NaCl versetzt und gut gemischt.

Zu dieser Lösung wurden 20mg Ferrozin (entspricht dem Trivialnamen für: 3-(2-Pyridyl)-5,6-Diphenyl-1,2,4-Triazin-4',4''-Disulfonsäure, MG= 492,46g/Mol, Sigma-Aldrich) zugesetzt und bis zur vollständigen Lösung gevortext.

3.3 Eisenbindungseffizienz unterschiedlicher Polystyrenplatten

Um geeignete Polystyrenplatten für die nachfolgende Studie zu finden, wurden Polystyrenplatten von zwei Herstellern (NUNC und Greiner) verglichen.

3.3.1 Beschichtung der Polystyrenplatte mit HES-DFO

Sowohl Greiner als auch NUNC-Platten wurden, mit der in 3.2.1 beschriebenen Coatinglösung mit HES-DFO beschichtet wobei 100µl/Well mittels 8-Kanalpipette (Rainin, Pipet-Lite™ XLS, Mettler-Toledo, Österreich) aufgetragen wurden. Die Platten wurden anschließend mit einer transparenten Selbstklebefolie (Libro, Österreich) verschlossen und für 72h bei 3°C inkubiert. Zur direkten Vergleichbarkeit der Eisenbindungsfähigkeit wurden für den Versuch Strips von NUNC und Greiner-Platten in die gleiche Rahmenhalterung eingespannt, um die Wells und Strips der verschiedenen Hersteller in einem Arbeitsschritt zu behandeln und möglichst zeitgleich zu untersuchen (*Abbildung 10*).

3.3.2 Waschen der Platten

Nach der Inkubation wurde die Coatinglösung mit HES-DFO durch Ausleeren der Platte entfernt und die restliche Flüssigkeit auf einem Papierhandtuch ausgeklopft und anschließend jedes Well zweimal mit je 200µl destilliertem Wasser gewaschen.

3.3.3 Aufbringen der Eisenstandardlösung:

Danach wurden 100µl der Eisenstandardlösungen pro Well auf die mit HES-DFO beschichtete Platte aufgetragen

3.3.4 Inkubation der Eisenstandardlösung:

Anschließend wurden die Platten mit einer transparenten Selbstklebefolie (LIBRO, Österreich) verschlossen und in einem Inkubator (Memmert, Linder Labortechnik, Österreich) mit Wasserdampfsättigung bei 36,6°C, für 120 Minuten inkubiert.

3.3.5 Waschen der Platte:

Nach der Inkubation wurden die Eisenstandardlösungen durch Ausleeren entfernt. Anschließend wurde jedes Well zweimal mit 150µl destilliertem Wasser und einmal mit 150µl 5mM EDTA-Lösung gewaschen. Anschließend wurden noch zwei weitere Waschschrte mit je 150µl destilliertem Wasser. Durchgeführt. Bis zur weiteren Bearbeitung wurden die Platten mit transparenter Folie (LIBRO, Österreich) abgedeckt und bei 4°C gelagert.

3.3.6 Quantifizierung des DFO- gebundenen Eisens

Zur Quantifizierung des DFO-gebundenen Eisens wurden pro Well 120µl Ferrozin-Ascorbinsäure-Reagenz (AA2F) zugesetzt und entweder sofort in einem temperierten Plattenlesegerät Victor2 (HVD, Österreich) bei 540nm bei 25°C gemessen (*Abbildung 9*) oder bis zur Messung bei Raumtemperatur lichtgeschützt (mit Alufolie abgedeckt) inkubiert.

Die photometrische Messung erfolgte nach unterschiedlichen Inkubationszeiten mit Ferrozin-Ascorbinsäure-Reagenz.

Messungen erfolgten je nach Ansatz zu folgenden Zeitpunkten: 0, 5, 10, 15 und 20 Minuten und dann in 5-Minuten-Intervallen. Im Platenphotometer wurden die Platten jeweils vor der Messung mit folgenden Parametern geschüttelt:

Dauer: 3,0 Sekunden

Typ: linear, wiederholt, schnelle Geschwindigkeit

Die Messparameter am Gerät waren wie folgt eingestellt:

Messzyklen: 12

Intervall: 300 Sekunden



Abbildung 9: Das temperierte Plattenlesegerät Victor2 von HVD
(Quelle: eigene Aufnahme)

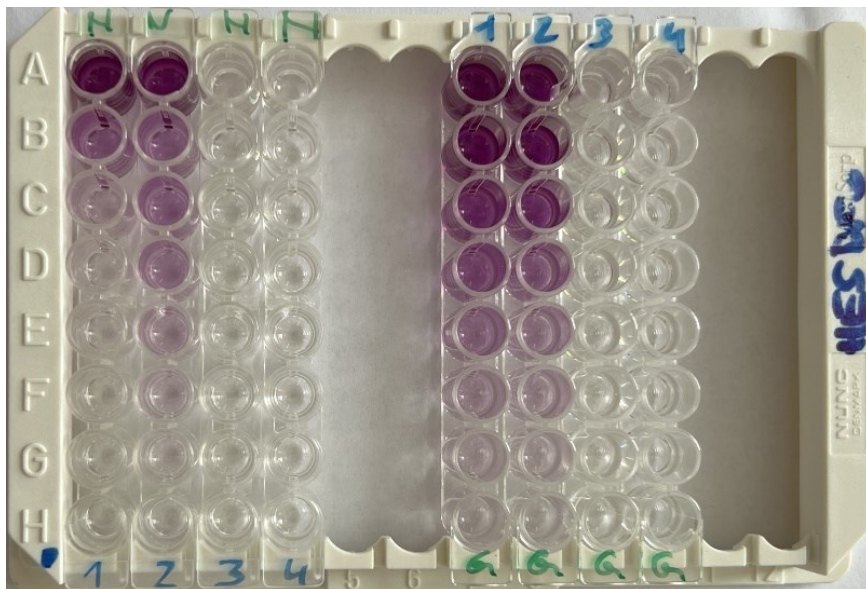


Abbildung 10: 96-Well Platte mit Strips von NUNC (links) und von Greiner (rechts)
(Quelle: eigene Aufnahme)

3.4 Herstellung der Kalibrierlösung mit FeCl_3

Zur Herstellung von Kalibrierlösungen wurde zuerst eine Stocklösung mit Eisenchlorid in verdünnter Salzsäure zubereitet:

Eisen-Stocklösung: 10mM Eisen (III)-chlorid in 0,1M Salzsäure (HCl):

Dafür wurden 27mg $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Merck) exakt abgewogen und in einem Becherglas in 10mL 0,1 M HCl gelöst. Nach der Herstellung wurde die Lösung in Zentrifugenröhrchen mit rotem Schraubverschluss (Falcon-Röhrchen) abgefüllt und beschriftet. Die Lösung wurde im Kühlschrank bei 4°C gelagert, um die chemische Stabilität der Lösung sicherzustellen und einem Abbau durch Licht oder Wärme vorzubeugen. Diese Lösung diente als Ausgangspunkt für eine Verdünnungsreihe (Tabelle 1), die in 12 Eppendorfgefäßen hergestellt wurde.

Tabelle 1: Herstellung der Eisen-Kalibrierlösungen mittels Verdünnungsreihe

#	Lösung	HBS (pH 7,3)	Fe-Konzentration (μM)
S 1	100 μl FeCl ₃ -Stock	900 μl	1000
S 2	500 μl S1	500 μl	500
S 3	500 μl S2	500 μl	250
S 4	500 μl S3	500 μl	125
S 5	500 μl S4	500 μl	62,5
S 6	500 μl S5	500 μl	31,25
S 7	500 μl S6	500 μl	15,625
S 8	500 μl S7	500 μl	7,8125
S 9	500 μl S8	500 μl	3,9062
S 10	500 μl S9	500 μl	1,9531
S 11	500 μl S10	500 μl	0,9766
S 12	500 μl S11	500 μl	0,4882
LW	-	500 μl	0
H ₂ O dest.	500 μl H ₂ O dest.	-	0
H ₂ O dest.	500 μl H ₂ O dest.	-	0
H ₂ O dest.	500 μl H ₂ O dest.	-	0

3.5 Herstellung von Messproben mit intravenösen Eisenpräparaten (I)

Zur Herstellung der Messproben wurde Venofer® (Eisen (III)-Hydroxid-Saccharose-Komplex, Vifor, Schweiz) mit einer Eisen-Konzentration von 20mg/ml, verwendet. 10 μl Venofer (aus der Ampulle, Eisenkonzentration: 20mg Fe/ml) wurden mit 90 μl 0,9%iger NaCl-Lösung gemischt. Die Mischung wurde zur Homogenisierung gut gevortext. Diese Lösung (Venofer 2mg Fe/ml) diente als Ausgangspunkt für eine Verdünnungsreihe (Tabelle 2), die in 12 Eppendorfgefäßen zubereitet wurde.

Tabelle 2: Herstellung von Messproben mit Venofer mittels Verdünnungsreihe

#	Lösung	0,9 % NaCl-Lösung	Eisenkonzentration Venofer (µg/ml)
V 1	50µl Venofer (2mg Fe/ml)	950µl	100
V 2	500µl V1	500µl	50
V 3	500µl V2	500µl	25
V 4	500µl V3	500µl	12,5
V 5	500µl V4	500µl	6,25
V 6	500µl V5	500µl	3,125
V 7	500µl V6	500µl	1,5623
V 8	500µl V7	500µl	0,7813
V 9	500µl V8	500µl	0,3906
V 10	500µl V9	500µl	0,1953
V 11	500µl V10	500µl	0,0977
V 12	500µl V11	500µl	0,0488
0,9% NaCl	-	500µl	0
0,9% NaCl	-	500µl	0
0,9% NaCl	-	500µl	0
0,9% NaCl	-	500µl	0

3.6 Herstellung der Messproben mit intravenösen Eisenpräparaten (II)

Zur Herstellung von weiteren Messproben wurde das intravenöse Eisenpräparat Monofer (Pharmacosmos A/S, Dänemark), ein Eisen(III)-Isomaltosid-Komplex, mit einer Konzentration von 100mg Fe/ml, verwendet. Dabei wurden 5µl Monofer aus der Ampulle mit 45µl 0,9% NaCl-Lösung versetzt. Die Mischung wurde zur Homogenisierung gut gevortext. Diese Lösung (Monofer mit 10mg Fe/ml) diente als Ausgangspunkt für eine Verdünnungsreihe (Tabelle 3), die in 12 Eppendorfgefäßen zubereitet wurde.

Tabelle 3: Herstellung von Messproben mit Monofer mittels Verdünnungsreihe

#	Lösung	0,9 % NaCl-Lösung	Eisenkonzentration Monofer (µg Fe/ml)
M1	10µl Monofer (10mg Fe/ml)	990µl	100
M 2	500µl M 1	500µl	50
M 3	500µl M 2	500µl	25
M 4	500µl M 3	500µl	12,5
M 5	500µl M 4	500µl	6,25
M 6	500µl M 5	500µl	3,125
M 7	500µl M 6	500µl	1,5623
M 8	500µl M 7	500µl	0,7813
M 9	500µl M 8	500µl	0,3906
M 10	500µl M 9	500µl	0,1953
M 11	500µl M 10	500µl	0,0977
M 12	500µl M 11	500µl	0,0488
0,9% NaCl	--	500µl	0
0,9% NaCl	--	500µl	0
0,9% NaCl	--	500µl	0
0,9% NaCl	--	500µl	0

3.7 Herstellung von Qualitätskontrollproben mit Venofer und Monofer

Zur Herstellung von Qualitätskontrollproben (Quality Control Samples, QCS) mit Venofer und Monofer wurden zunächst 1:10 Verdünnungen beider Präparate in 0,9% NaCl hergestellt. Dazu wurden 40µl Venofer (20mg Fe/ml) mit 360µl 0,9% NaCl und 10µl Monofer (100mg Fe/ml) mit 90µl 0,9% NaCl gut gemischt.

Anschließend wurden für die Lösung V1 200µl Venofer (1:10) mit 3800µl 0,9% NaCl gut gemischt und anschließend für die Lösung V2 2ml Lösung V1 mit 2ml 0,9% NaCl gemischt. V3 wurde hergestellt durch Mischen von 2ml V2 mit 2ml 0,9 % NaCl.

Für die Lösung M1 wurden 40µl Monofer (1:10) mit 3960µl 0,9% NaCl gut gemischt und anschließend mittels serieller 1:1 Verdünnung analog zu Venofer die Lösungen M2 und M3 hergestellt.

3.8 Messung von DFO-chelatierbarem Eisen

3.8.1 Beschichtung von Greiner-Platten mit Coatinglösung mit HES-DFO

Aufgrund der besseren Ergebnisse beim Plattenvergleich (siehe Ergebnisse) wurden Polystyrenplatten von Greiner für die weiteren Versuche vorbereitet.

Für die Versuche wurden 12 Platten mit der in 3.2.2 beschriebenen Coatinglösung mit HES-DFO beschichtet (100µl/Well) und anschließend mit einer transparenten Selbstklebefolie (LIBRO, Österreich) verschlossen und für 72 h bei 3°C inkubiert.

Anschließend wurde die Inkubationslösung ausgeleert und jedes Well zweimal mit je 200µl destilliertem Wasser gewaschen, wie in 3.3.2 beschrieben. Die leeren gewaschenen Platten wurden entweder gleich verwendet oder mit Selbstklebefolie verschlossen und bis zur weiteren Verwendung bei 3°C gelagert.

3.8.2 Aufbringen der Proben:

Auf die mit HES-DFO beschichteten Platten wurden Eisen-Kalibrierlösungen, Proben mit intravenösem Eisen (Venofer und Monofer) sowie alle Puffer und Lösungsmittel (LM) alleine in Replikaten aufgetragen (je 100µl/Well) (Abbildung 11)

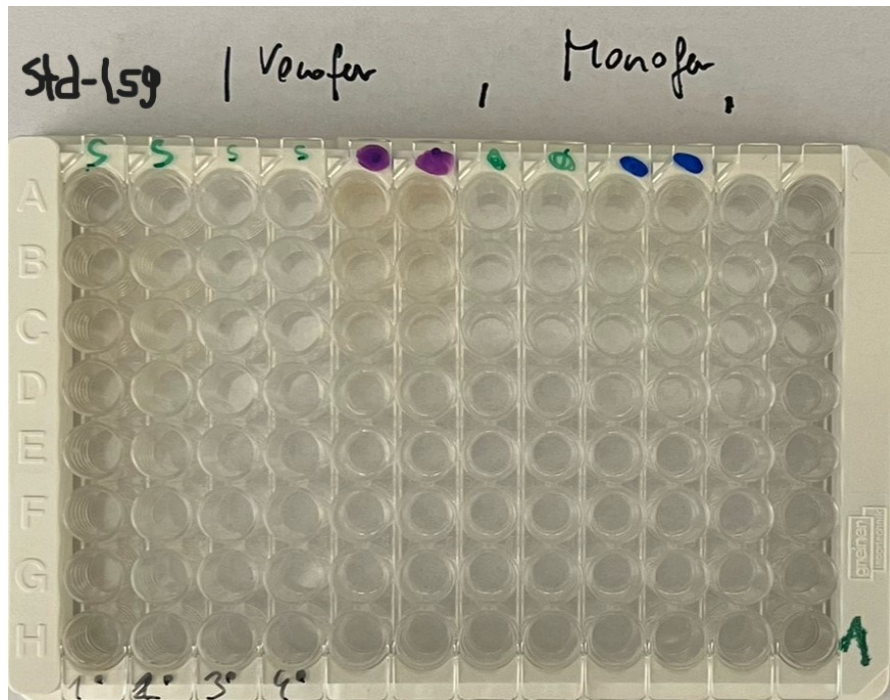


Abbildung 11: 96-Well-Platte nach dem Auftragen von Eisen-Kalibrierlösungen, Venofer, Monofer, Puffer und LM in Replikaten
(Quelle: eigene Aufnahme)

3.8.3 Inkubation der Proben

Wie in Abschnitt 3.3.4 beschrieben wurden die Platten für 2 Stunden bei 37°C in einem Inkubator mit feuchter Atmosphäre inkubiert.

3.8.4 Waschen der Platten

Anschließend wurden die Wells ausgeleert und gewaschen:

- 2 x mit je 150µl/ Well destilliertes Wasser
- 1 x mit je 150µl / Well 5mM EDTA
- 2 x mit je 150µl/ Well destilliertes Wasser

Restliche Flüssigkeit wurde über Papierhandtüchern gründlich ausgeklopft. Die Platten wurden anschließend wieder mit Selbstklebefolie verschlossen und bis zur Quantifizierung des gebundenen Eisens mittels Ferrozin-Ascorbinsäure-Reagenz bei 4°C gelagert.

3.8.5 Quantifizierung des HES-DFO-gebundenen Eisens in den Wells

Zur Quantifizierung des HES-DFO-gebundenen Eisens in den Wells wurden pro Well 120µl Ferrozin-Ascorbinsäure-Reagenz (AA2F) zugesetzt (Abbildung 12) und bei Raumtemperatur (lichtgeschützt mit Alufolie abgedeckt) inkubiert und nach 30 und 60 Minuten photometrisch bei 540nm gemessen (Abbildung 13)

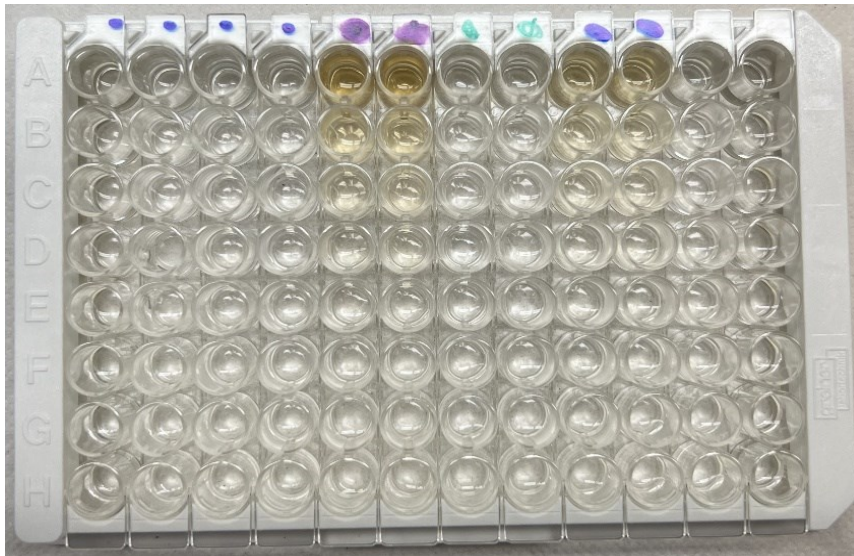


Abbildung 12: 96-Well-Platte sofort nach dem Auftragen von AA2F-Reagenz
(Quelle: eigene Aufnahme)

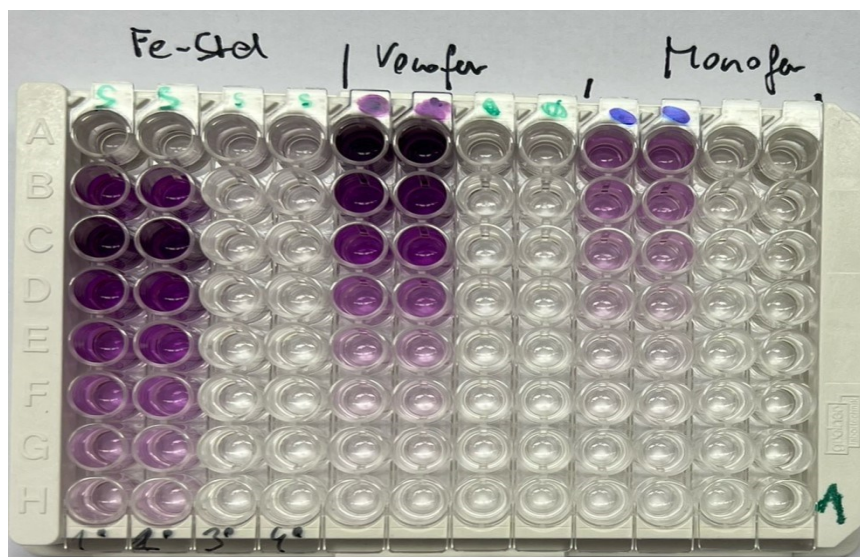


Abbildung 13: 96-Well-Platte nach einer Stunde Inkubation mit Reagenz AA2F
(Quelle: eigene Aufnahme)

3.9 Visualisierung der Beschichtung mittels digitaler 3-D-Mikroskopie

Polystyrenplatten zweier Fabrikate wurden gleichzeitig mit HES-DFO Coatinglösung (100µl/Well) beschichtet und wie in 3.8.4 beschrieben gewaschen.

Die Beschichtung in der Platten wurde in einem Digitalmikroskop (Modellreihe VHX-X1) der Firma Keyence, Österreich mit konstanten Messeinstellungen aufgenommen. Das Mikroskop bietet einen Vergrößerungsbereich von 0,1 x bis 5000 x und eine Auflösung von bis zu 54 Megapixel.

Mittels 3-D-Mikroskopie wurde die Oberflächenbeschaffenheit der Platten ohne Beschichtung und mit HES-DFO-Beschichtung untersucht (*Abbildung 14* und *Abbildung 15*). Mittels im Mikroskop eingebauter Kamera wurden die Oberflächenbeschaffenheiten dokumentiert.

3.10 Statistische Auswertung

Der Originaldaten-Output vom Plattenphotometer Victor2 erfolgte in MS-Excel. In Excel wurden Templates-Sheets für die Auswertung programmiert, wodurch die Messwerte in den Tabellen der einzelnen Messung halbautomatisch sortiert wurden.

Die weitere Auswertung und graphische Darstellung der Ergebnisse wurde mittels der Software GraphPad Prism 5 von GrapPad Software Inc., USA durchgeführt.

4 Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit war es, einen direkten quantitativen Test für labile Eisenspezies mithilfe eines auf Polystyren-Oberflächen immobilisierten Eisenchelators zu optimieren und die Reproduzierbarkeit zu überprüfen. Zunächst wurden Polystyren-Oberflächen von Platten zweier Hersteller mit HES-DFO beschichtet, gewaschen und mit Eisenchlorid-Kalibrierlösungen inkubiert und erneut gewaschen. Das an DFO in den Wells gebundene Eisen wurde durch reduzierendes Ferrozin-Reagenz (AA2F) freigesetzt, reduziert und durch Ferrozin komplexiert. Der sich bildende pinke Ferrozin-Eisen-Komplex wurde bei 540nm nach unterschiedlichen Inkubationszeiten mit dem Ferrozin-Reagenz im Plattenphotometer gemessen.

4.1 Oberflächenbeschaffenheit von Polystyren-Platten zweier Hersteller vor und nach Beschichtung mit HES-DFO

Polystyrenplatten von zwei Herstellern wurden, wie in Abschnitt 3.8 erklärt, vor und nach Beschichtung mit HES-DFO mithilfe 3-D-Digitalmikroskopie analysiert.

Die Analyse zeigte, dass die Wells der NUNC-Platten ohne Beschichtung eine wenig strukturierte Oberfläche aufweisen. Nach der Beschichtung mit HES-DFO war eine raue, unregelmäßige, klumpigere Beschichtung der Oberfläche der Wells zu beobachten (*Abbildung 14*).

Die Oberfläche der Wells der Platte von Greiner hatte hingegen vor der Beschichtung eine erkennbar stärkere, feine Struktur. Nach Beschichtung mit HES-DFO wies die Oberfläche eine gleichmäßigere, aber weniger dichte Beschichtung auf und es war keine Klumpenbildung zu erkennen (*Abbildung 15*).



Abbildung 14: Oberfläche der NUNC- Platte vor und nach der Beschichtung mit HES-DFO
(Quelle: eigene Aufnahme)



Abbildung 15: Oberfläche der Greiner-Platte vor und nach der Beschichtung mit HES-DFO
(Quelle: eigene Aufnahme)

4.2 Messung von HES-DFO-gebundenem Eisen mit Ferrozin-Reagenz auf Platten zweier Hersteller

Mit HES-DFO beschichtete Platten der Hersteller Greiner und NUNC wurden mit verschiedenen Konzentrationen von Eisenchlorid zwei Stunden bei 37°C inkubiert. Danach wurden gemäß Abschnitt 3.8.4 mit destilliertem Wasser und 5mM EDTA gewaschen. Um das HES-DFO-gebundene Eisen in den Wells zu quantifizieren wurde Ferrozin-Reagenz (AA2F) zugesetzt und bei Raumtemperatur inkubiert. Die im Ferrozin-Reagenz AA2F enthaltene Ascorbinsäure wirkt reduzierend auf dreiwertiges Eisen. Das dabei gebildete zweiwertige Eisen bildet mit Ferrozin einen pinken Ferrozin-Eisen-Komplex. Die Bildung dieses Komplexes wurde bei 540nm in einem Plattenphotometer alle 5 Minuten während 13 Messzyklen aufgenommen.

Abbildung 16 zeigt, dass die Länge der Inkubationszeit mit dem Ferrozin-Reagenz die Absorptionswerte bei 540nm stark beeinflusst. Kürzere Zeiten führen nur zu geringer Bildung von Ferrozin-Eisen und dadurch zu geringem Anstieg der Absorption bei 540nm. Nach längeren Inkubationszeiten stiegen die Absorptionswerte, besonders bei höheren Eisenkonzentrationen.

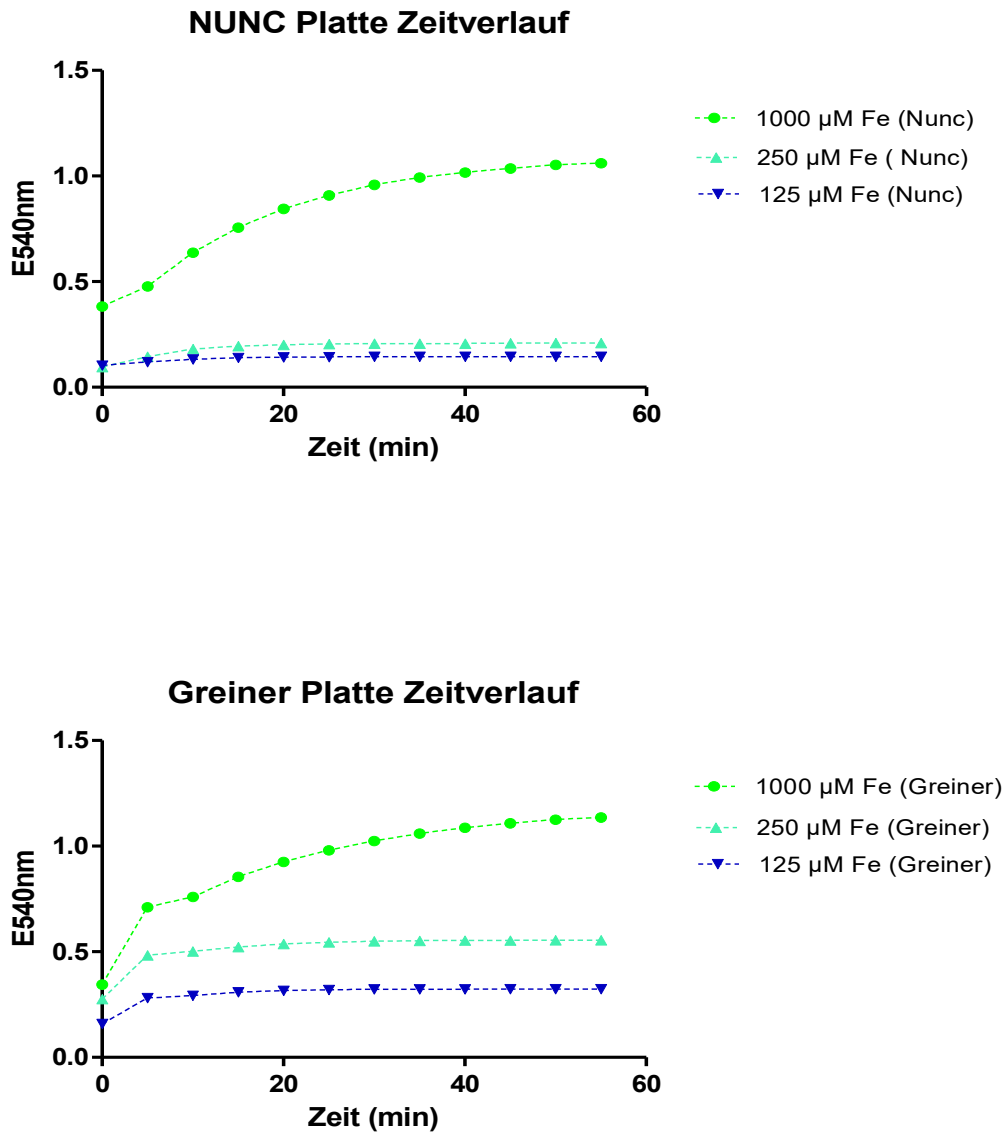


Abbildung 16: Zeitlicher Verlauf der Bildung des Ferrozin-Eisen-Komplexes bei 540nm mit verschiedenen Eisen-Kalibrierlösungen auf Polystyren-Platten von NUNC und Greiner

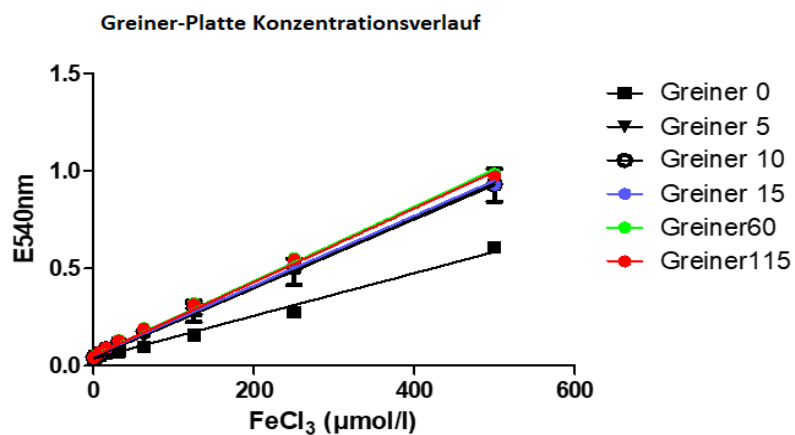
Zur besseren Lesbarkeit sind jeweils nur die Mittelwerte der Absorptionen zu den einzelnen Zeitpunkten aufgetragen. Um die Ergebnisse, die mit Platten von NUNC und Greiner erhalten wurden besser vergleichen zu können, wurden die Ergebnisse jeweils mit dem gleichen Achsenbereich dargestellt.

4.3 Einfluss der Inkubationszeit auf die Kalibrierkurven

Die Graphen in *Abbildung 16* zeigen, dass sich der Eisen-Ferrozin-Komplex erst nach längerer Inkubationszeit mit Ferrozin-Reagenz (AA2F) bildete. Dies wurde bei Platten beider Hersteller beobachtet. Daher wurden nun Kalibrierkurven mit Eisenstandards auf beiden Platten aufgenommen, wobei die Platten unterschiedlich lang mit dem Ferrozin-Reagenz inkubiert wurden.

4.3.1 Platten von Greiner

Mit HES-DFO-beschichtete Well von Greiner-Platten wurden mit verschiedenen Eisen-Konzentrationen für 2 Stunden bei 37°C inkubiert, anschließend wurden die Lösungen entfernt und die Platte gewaschen. Das DFO-gebundene Eisen in den Wells wurde anschließend mit Ferrozin-Reagenz (AA2F) inkubiert und der gebildete Fe-Ferrozin-Komplex bei 540nm alle 5 Minuten im Plattenphotometer gemessen. Es zeigte sich, dass die Standardgerade auf Greiner Platten bereits nach 5 Minuten die maximale Steigung erreichte und es im weiteren Zeitverlauf zu keiner nennenswerten weiteren Absorptionszunahme kam (*Abbildung 17*).



	NUNC 0	Greiner 0	NUNC 5	Greiner 5	NUNC 10	Greiner 10	NUNC 15	Greiner 15	NUNC 60	Greiner60	NUNC 115	Greiner115
r ²	0.8833	0.9892	0.9396	0.9808	0.9518	0.9956	0.9514	0.9946	0.9327	0.9950	0.9307	0.9953

Abbildung 17: Absorptionsverlauf der Standardkurven bei 540nm bei Messung auf Greiner-Platte in Abhängigkeit der Inkubationszeit

4.3.2 Platten von NUNC

Ebenso wurden HES-DFO-beschichtete NUNC-Platte mit verschiedenen Eisen-Konzentrationen für 2 Stunden bei 37°C inkubiert, die Platte gewaschen und mit Ferrozin-Reagenz (AA2F) inkubiert, um das HES-DFO-gebundene Eisen in den Wells zu quantifizieren. Dafür wurden die Messungen bei 540nm alle 5 Minuten wiederholt. Es zeigte sich, dass bei NUNC-Platten die maximale Steigung der Standardgeraden erst nach 60 Minuten erreicht wurde (*Abbildung 18*).

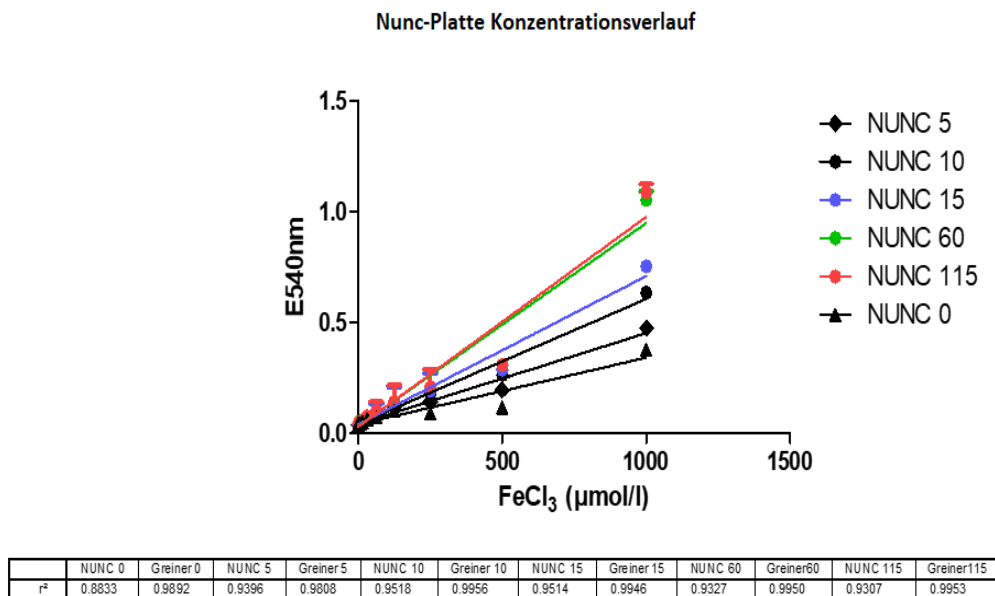


Abbildung 18: Absorptionsverlauf der Standardkurven bei 540nm bei Messung auf NUNC-Platte in Abhängigkeit der Inkubationszeit

In weiterer Folge wurden hauptsächlich die Platten von Greiner eingesetzt.

4.4 Eisenstandardkurve auf HES-DFO beschichteten Platten von Greiner

Kalibrierlösungen mit verschiedenen FeCl_3 -Konzentrationen wurden auf HES-DFO beschichtete Polystyren-Platten der Firma Greiner aufgetragen, 2 Stunden bei 37°C inkubiert, gewaschen und anschließend mit Ferrozin-Reagenz (AA2F) versetzt und inkubiert. Die Absorption des Ferrozin-Eisen-Komplexes wurde dabei direkt nach Reagenz-Zugabe bei 540nm, sowie alle 5 Minuten (Intervall 300 Sekunden) bei Raumtemperatur (26°C) im Victor 2 Plattenphotometer gemessen.

Abbildung 19 (obere Graph) zeigt, dass sich die Absorptionswerte nach 5 - 10 Minuten bereits stabilisieren und die Absorption mit steigender Eisenkonzentration direkt proportional ansteigt bis zu einer Eisenkonzentration von 250 μM . Bei 500 μM Eisen gab es keinen weiteren Anstieg der Absorption bei 540nm, vielmehr kam es bei der höchsten untersuchten Konzentration zu einem Absinken der Absorptionswerte auf Leerwertniveau (kein Eisen). In Abbildung 19 (untere Graph) ist der lineare Bereich der Standardkurve (bis 250 μM Eisen) gezeigt.

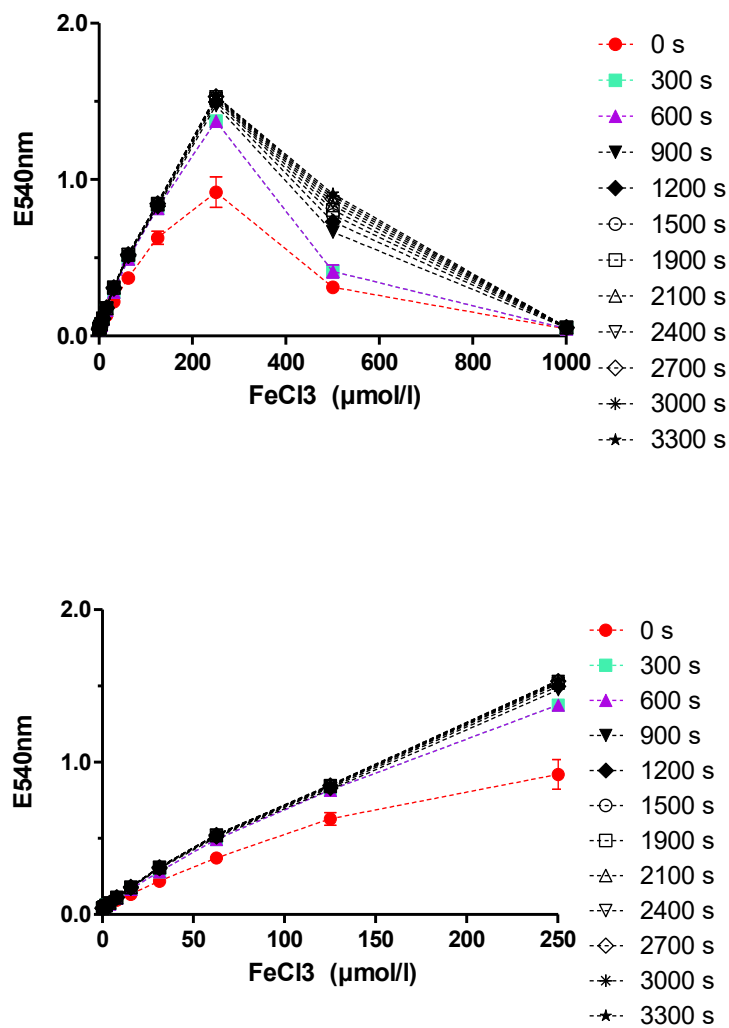


Abbildung 19: Verlauf der Kalibrierkurven mit Eisenchlorid nach unterschiedlichen Inkubationszeiten mit reduzierendem Ferrozin-Reagenz

4.5 Einfluss der Inkubationszeit auf Anstieg und Bestimmtheitsmaß der Standardkurve

Die Standardkurven im Bereich von 0 bis 250 μM Eisen aus Abbildung 19 (unten) wurden in weiterer Folge genauer untersucht, um den Einfluss der Inkubationszeit mit reduzierendem Ferrozin-Reagenz näher zu untersuchen. Dabei wurden die nach verschiedenen Inkubationszeiten gemessenen Standardkurven mittels linearer Regression unter Verwendung der Software Graph Pad Prism 5 analysiert. Die mittels linearer Regression ermittelten Steigungen der Standardkurven zu den einzelnen Inkubationszeiten sind in Abbildung 20 für die verschiedenen Zeitpunkte dargestellt und in

Tabelle 4 zusammengefasst. Der Anstieg direkt nach Zugabe von reduzierendem Ferrozin-Reagenz ($t = 0 \text{ s}$) beträgt 0.003660 ± 0.0001708 und steigt kontinuierlich auf 0.005773 ± 0.0001119 nach $t = 900$ Sekunden und erreicht nach $t = 3300$ Sekunden einen Wert von 0.006010 ± 0.0001178 .

Die Genauigkeit der Regressionsgerade wird durch das Bestimmtheitsmaß bzw. die Determinationskonstante r^2 angegeben. Diese betrug bei Beginn der Messung ($t=0$ Sekunden) 0,9583 und stieg nach längeren Inkubationszeiten kontinuierlich an und erreichte bei $t = 900$ Sekunden Inkubationszeit einen Wert von 0,9925, der dann bis zum Zeitpunkt $t = 3300$ Sekunden praktisch konstant blieb.

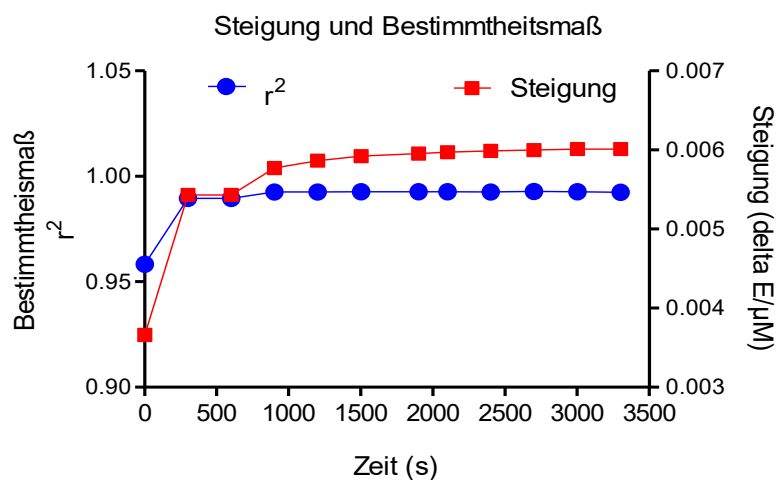


Abbildung 20: Einfluss der Inkubationszeit mit Ferrozin-Reagenz auf Steigung und Bestimmtheitsmaß der Standardkurve

Tabelle 4: Einfluss der Inkubationszeit auf Steigung und Linearität der Standardkurve bis zu einer Konzentration von 250µM Eisen

Inkubationszeit	Anstieg ($\Delta E/\mu M$)	r^2	Anzahl x- Werte	Gesamtzahl
0 s	0.003660 ± 0.0001708	0,9583	11	22
300 s	0.005433 ± 0.0001252	0,9895	11	22
600 s	0.005433 ± 0.0001252	0,9895	11	22
900 s	0.005773 ± 0.0001119	0,9925	11	22
1200 s	0.005865 ± 0.0001133	0,9926	11	22
1500 s	0.005922 ± 0.0001134	0,9927	11	22
1900 s	0.005955 ± 0.0001138	0,9927	11	22
2100 s	0.005973 ± 0.0001146	0,9927	11	22
2400 s	0.005987 ± 0.0001155	0,9926	11	22
2700 s	0.005997 ± 0.0001146	0,9928	11	22
3000 s	0.006010 ± 0.0001149	0,9927	11	22
3300 s	0.006010 ± 0.0001178	0,9924	11	22

Die Änderung der Parameter Steigung und Bestimmtheitsmaß in Abhängigkeit der Inkubationszeiten ist in

Tabelle 4 zusammengefasst, wobei hier sehr deutlich zu erkennen ist, dass sich das Bestimmtheitsmaß bereits nach 15 Minuten ($t = 900$ Sekunden) praktisch nicht mehr verbessert, die Steigung jedoch noch länger leicht zunimmt.

4.6 Ermittlung von LOD und LOQ

Die Nachweisgrenze (englisch: „Limit of Detection“ (LOD) und die Quantifizierungsgrenze (englisch: „Limit of Quantification“ (LOQ) einer Analysenmethode sind wichtige Parameter, um eine Analysemethode zu charakterisieren. Die Nachweisgrenze (LOD) gibt dabei an bis zu welcher Konzentration eine Substanz mit der gewählten Methode nachgewiesen werden kann, ob diese in einer Probe vorhanden ist.

Die Quantifizierungsgrenze (LOQ) gibt an, bis zu welcher Grenze eine Konzentrationsangabe mit der gewählten Methode zuverlässig abgegeben werden kann. Bei darunterliegenden Werten ist eine Konzentrationsangabe unzulässig. Es kann nur noch die Aussage getroffen werden, ob

die Substanz vorhanden ist oder nicht. Die erhaltenen Zahlenwerte sind unter dieser Grenze als Konzentrationsangabe unzuverlässig.

Für die Ermittlung von LOD und LOQ werden die Steigungen (S_y) der Standardgeraden sowie die Standardabweichung eines Leerwertes (Blank) ermittelt, indem der Blank wiederholt gemessen wird und Mittelwert und Standardabweichung (S) ermittelt werden (European Commission. Joint Research Centre. 2016).

LOD wurde unter Verwendung folgender Formel ermittelt:

$$\text{LOD} = 3,9 \cdot (S_y/S) \quad (\text{Formel I})$$

LOQ wurde gemäß folgender Formel ermittelt:

$$\text{LOQ} = 10 \cdot (S_y/S) \quad (\text{Formel II})$$

Zur Ermittlung von LOD und LOQ wurden drei mit HES-DFO beschichtete Polystyren-Platten der Firma Greiner mit Eisenstandard-Lösungen sowie Blanks (destilliertes Wasser) 2 Stunden bei 37°C inkubiert und anschließend gewaschen. Das DFO-gebundene Eisen in den Wells wurde durch Zugabe von reduzierendem Ferrozin-Reagenz in den pinken Eisen-Ferrozin-Komplex umgewandelt und dessen Absorption bei 540nm im Plattenphotometer gemessen. Die Steigung S_y der Standardkurve wurde im Konzentrationsbereich von 0-250µM Eisen mittels linearer Regression in GraphPad Prism 5 berechnet.

Von den in Replikaten gemessenen Blanks (enthalten destilliertes Wasser) wurden Mittelwerte der Absorptionen sowie Standardabweichungen S ermittelt. In den folgenden Tabellen sind Standardabweichungen (S) der Blanks und die Steigungen (S_y) der Standardgeraden aufgelistet. Tabelle 5 enthält die Werte, die nach 30-minütiger Inkubation mit Ferrozin-Reagenz erhalten wurden, während Tabelle 6 die Werte enthält, die nach 60-minütiger Inkubation auftraten. Die Inkubation erfolgte dabei bei Raumtemperatur (26°C). Die Messungen erfolgten auf verschiedenen Platten zu den angegebenen Zeitpunkten. Die Messungen auf einer Platte entsprechen einem „Run“. Die beiden Tabellen enthalten neben den Standardabweichungen und den Steigungen der einzelnen Runs auch Mittelwerte von S und S_y aller Runs gemeinsam.

Tabelle 5 : Standardabweichung (Sy) und Steigung (S) nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten

	Run 1 (t=30 min)	Run 2 (t= 30 min)	Run 3 (t=30 min)	Mittelwert
Std. Deviation (Sy)	0,00208	0,00090	0,00141	0,00147
n	12	12	12	
Slope (S)	0,004932	0,003335	0,003562	0,003943

Anmerkung: S (in $\Delta E/\mu M$)

Tabelle 6: Standardabweichung (Sy) und Steigung (S) nach einer Inkubationszeit von 60 Minuten

	Run 1(t= 60 min)	Run 2 (t= 60 min)	Run 3 (t= 60 min)	Mittelwert
Std. Deviation (Sy)	0,00166	0,00100	0,00180	0,00149
n	12	12	12	
Slope (S)	0,00333	0,00243	0,00296	0,00291

Anmerkung: S (in $\Delta E/\mu M$)

Die Nachweisgrenzen (LOD) und die Quantifizierungsgrenzen (LOQ) aus Tabelle 7 und Tabelle 8 wurden nach Formel I und Formel II aus den in Tabelle 5 und Tabelle 6 aufgelisteten Daten berechnet. Diese Daten stammen aus jeweils 3 Messreihen (Run 1, 2 und 3) bei denen die Blanks in Replikaten (n = 12) gemessen wurden.

Mittelwerte für LOD betrugen $1,42\mu M$ nach 30 Minuten und $1,97\mu M$ nach 60 Minuten Inkubationszeit. Die mittleren LOQ-Werte betrugen nach 30 Minuten Inkubation $3,63\mu M$ und nach 60 Minuten $5,05\mu M$.

Tabelle 7: LOD und LOQ nach 30 Minuten Inkubation mit reduzierendem Ferrozin-Reagenz (in μM)

	Run 1 (t= 30 min)	Run 2 (t= 30 min)	Run 3 (t= 30 min)	Mittelwert
LOD	1,65	1,05	1,55	1,42
LOQ	4,22	2,70	3,97	3,63

Tabelle 8: LOD und LOQ nach 60 Minuten Inkubation mit reduzierendem Ferrozin-Reagenz (in μM)

	Run 1(t= 60 min)	Run 2 (t= 60 min)	Run 3 (t= 60 min)	Mittelwert
LOD	1,94	1,60	2,37	1,97
LOQ	4,98	4,10	6,08	5,05

4.6.1 Vergleich LOD und LOQ auf Polystyren-Platten unterschiedlicher Anbieter

In weiterer Folge wurden noch die Nachweisgrenzen (LOD) und Quantifizierungsgrenzen (LOQ) bei Verwendung von Polystyren-Platten der Firma NUNC und Greiner zur Quantifizierung von HES-DFO-gebundenem Eisen ermittelt. Dabei wurden LOD und LOQ nach 30-minütiger (Tabelle 9) und 60-minütiger (Tabelle 10) Inkubation mit Ferrozin-Reagenz untersucht. Beide Parameter hatten mit beiden Platten vergleichbare Werte.

Tabelle 9: LOD und LOQ nach 30-minütiger Inkubation in Polystyren-Platten von Greiner und NUNC

	Greiner (30 min)	Nunc (30 min)
LOD	1,42	1,08
LOQ	3,63	2,77

Tabelle 10: LOD und LOQ nach 60-minütiger Inkubation in Polystyren-Platten von Greiner und NUNC (in μM)

	Greiner (60 min)	Nunc (60 min)
LOD	1,97	1,25
LOQ	5,05	3,19

4.7 Quantifizierung von HES-DFO-gebundenem Eisen bei intravenösen Eisenpräparaten mit niederer und hoher Stabilität

Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob mit dieser Methode der Gehalt an HES-DFO-chelatierbarem Eisen intravenöser Eisenpräparate mit unterschiedlicher Stabilität unterschieden und quantifiziert werden kann. Zunächst wurden von zwei intravenösen Präparaten Verdünnungen mit dem gleichen Eisengehalt in 0,9% NaCl hergestellt. Anschließend wurden mit diesen Lösungen Proben mit unterschiedlichen

Eisenkonzentrationen mittels serieller Verdünnung hergestellt (siehe Abschnitt 3.5 und 3.6.). Diese Lösungen wurden anschließend auf Polystyren-Platten mit HES-DFO-Beschichtung der Firma Greiner aufgetragen und für zwei Stunden bei 37°C inkubiert. Parallel wurden auch Eisenstandardlösungen (siehe Abschnitt 3.4) aufgetragen und ebenfalls 2 Stunden bei 37°C inkubiert, um Kalibriergeraden zu erhalten.

Nach der Inkubation wurden die Platten gewaschen und HES-DFO-gebundenes Eisen in den Wells durch Zugabe von Ferrozin-Reagenz (AA2F) in den rosa gefärbten Ferrozin-Eisen-Komplex umgewandelt. Dabei wurde die Absorption bei 540nm direkt nach Zugabe des Ferrozin-Reagenzes gemessen ($t = 0$ Sekunden) sowie alle 5 Minuten (Messintervall 300 Sekunden). Die Inkubation mit dem Ferrozin-Reagenz erfolgte dabei direkt im temperierten Plattenphotometer bei 25°C.

In Abbildung 21 (oberer Graph) ist die Konzentration des HES-DFO-chelatierbaren Eisens für Venofer dargestellt. Hier zeigt sich eine deutliche Abhängigkeit der Absorption bei 540nm von der Inkubationszeit mit dem Ferrozin-Reagenz. Insbesondere bei den weniger verdünnten Venofer-Proben (Venofer 1 (mit 100µg Fe/ml) bis Venofer 6 (mit 3,125µg Fe/ml)) hatte die Inkubationszeit einen großen Einfluss auf die Bildung des Ferrozin-Eisen-Komplexes. Durch die Verlängerung der Inkubationszeit kam es zu einer starken Steigerung der Absorption bei 540nm, was auf eine Zunahme der Bildung von Ferrozin-Eisen-Komplex hindeutet. Bei den stärker verdünnten Venofer-Lösungen, (ab etwa Venofer 7 bis Venofer 12) sind bereits nach 5 Minuten (300 Sekunden) keine nennenswerten Änderungen der Absorptionswerte bei 540nm mehr zu erkennen. Dies deutet darauf hin, dass die Bildung von Ferrozin-Eisen auch nach längeren Inkubationszeiten nicht weiter ansteigt.

Auch bei Monofer (Abbildung 21, unterer Graph) zeigt sich eine Abhängigkeit der Bildung des Ferrozin-Eisenkomplexes von der Länge der Inkubation mit dem Ferrozin-Reagenz. Auch hier sind die Unterschiede der Absorption bei längeren Inkubationszeiten bei den am wenigsten verdünnten Monofer-Lösungen am ausgeprägtesten (Monofer 1 bis Monofer 6). Bei den höher verdünnten Monofer-Proben ist ebenfalls bereits nach 5 Minuten ($t = 300s$) der Ferrozin-Eisen-Komplex ausgebildet und längere Inkubationszeiten verändern die Absorption bei 540nm praktisch nicht mehr.

Vergleicht man die Konzentrationen an HES-DFO-gebundenem Eisen bei Monofer und Venofer, fällt auf, dass die Proben mit Venofer etwa um das Zehnfache höhere Konzentrationen an HES-DFO-chelatierbarem Eisen enthalten als das stabilere Monofer.

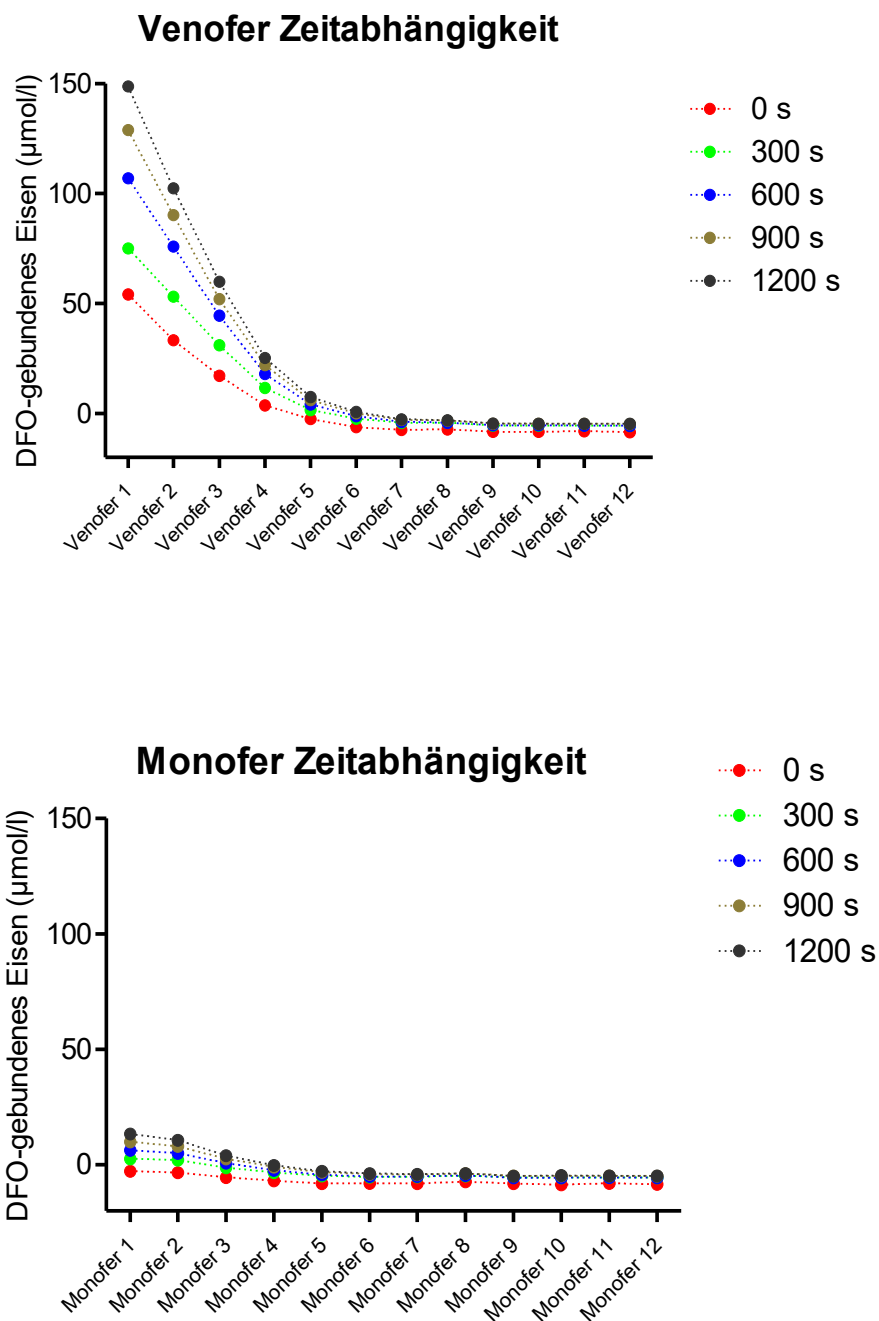


Abbildung 21: Vergleich HES-DFO-gebundenes Eisen in Abhängigkeit der Eisenkonzentration mit Venofer und Monofer nach unterschiedlichen Inkubationszeiten.

4.8 Intra- und Interday-Variation der Messung

Um die Methode noch weiter zu charakterisieren, wurden sogenannte Qualitätskontroll-Proben (Quality Control Samples; QCS) mit Venofer (V) und mit Monofer (M) hergestellt (Proben: V1, V2 und V3 und M1, M2 und M3) (siehe 3.7).

Die Proben wurden an einem Tag auf HES-DFO beschichtete Greiner Platten aufgetragen und für zwei Stunden bei 37°C inkubiert. Parallel zu den Proben wurden auch Eisenstandardlösungen (3.4) aufgetragen und auf den Platten inkubiert. Anschließend wurden die Platten laut 3.3.5 gewaschen.

Die Quantifizierung des HES-DFO-gebundenen Eisens erfolgte an unterschiedlichen Tagen, wobei das Ferrozin-Reagenz jeweils frisch hergestellt wurde.

4.8.1 Intraday-Variation

Bei der Intraday-Variation wurden drei Platten von Greiner (mit HES-DFO-Beschichtung), die zuvor mit Eisenstandards und Replikaten der Proben mit Venofer (V1, V3 und V3) und Monofer (M1, M2 und M3) (siehe Abschnitt 3.7) zwei Stunden bei 37°C inkubiert und gewaschen wurden, an zwei verschiedenen Tagen mit Ferrozin-Reagenz versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 30 min und 60 min wurden die Absorptionen bei 540nm in einem Plattenphotometer gemessen. Die Inkubation der Platten zwischen den Messungen erfolgte bei Raumtemperatur (zwischen 24 und 26 °C) im Dunkeln in einem Labor ohne Klimatisierung. In Tabelle 13 und Tabelle 14 sind die Ergebnisse der Messungen der verschiedenen Messreihen (Runs) zusammengefasst. Die mittleren Intraday-Variationskoeffizienten verringern sich leicht bei Verlängerung der Inkubationszeit. Ebenso stiegen die Mittelwerte aller Proben, wenn vor der photometrischen Messung eine längere Inkubationszeit abgewartet wurde.

Tabelle 11: Intraday-Variation der photometrischen Messung von HES-DFO-chelatierbarem Eisen (nach 30 min Inkubation mit Ferrozin-Reagenz)

Greiner-Platte

Intraday Variation (30 min)											
	QCS	Replikat 1	Replikat 2	Replikat 3	Mean	SD	SEM	CV (%)	n	Mittlerer CV (%) pro Run	Mittlerer CV (%) für alle Runs
Run 1	V1	85,0	81,8	81,6	82,8	1,93	1,12	2,3	3	4,7	6,0
	V2	67,0	66,0	71,4	68,1	2,91	1,68	4,3	3		
	V3	68,8	66,4	68,0	67,7	1,24	0,72	1,8	3		
	M1	18,5	16,5	17,9	17,6	1,04	0,60	5,9	3		
	M2	16,3	15,3	14,5	15,3	0,91	0,53	6,0	3		
	M3	15,5	13,2	14,5	14,4	1,12	0,64	7,8	3		
Run 2	V1	111,8	128,9	129,8	123,5	10,14	5,85	8,2	3	8,1	
	V2	101,6	100,1	101,3	101,0	0,79	0,46	0,8	3		
	V3	97,4	95,0	92,6	95,0	2,40	1,39	2,5	3		
	M1	34,1	38,6	26,6	33,1	6,06	3,50	18,3	3		
	M2	26,9	28,1	21,8	25,6	3,34	1,93	13,1	3		
	M3	18,8	20,0	17,9	18,9	1,05	0,61	5,6	3		
Run 3	V1	158,8	150,7	148,1	152,5	5,57	3,22	3,7	3	5,1	
	V2	117,8	117,5	113,9	116,4	2,19	1,27	1,9	3		
	V3	105,8	103,2	104,6	104,5	1,27	0,73	1,2	3		
	M1	36,7	40,1	36,7	37,8	1,95	1,12	5,1	3		
	M2	30,8	29,1	24,4	28,1	3,35	1,93	11,9	3		
	M3	22,1	23,8	25,5	23,8	1,68	0,97	7,1	3		

Anmerkung: Werte für chelatierbares Eisen in μM

Tabelle 12: Intraday-Variation der photometrischen Messung von HES-DFO-chelatierbarem Eisen (nach 60 min Inkubation mit Ferrozin-Reagenz)

Greiner-Platte

Intraday Variation (60 min)	QCS									Mittlerer CV (%) pro Run	Mittlerer CV (%) für alle Runs
		Replik 1	Replik 2	Replik 3	Mean	SD	SEM	CV (%)	n		
Run 1	V1	169,7	171,8	170,9	170,8	1,05	0,61	0,6	3	4,1	4,8
	V2	142,9	145,6	150,5	146,3	3,80	2,20	2,6	3		
	V3	144,4	145,6	145,3	145,1	0,63	0,36	0,4	3		
	M1	40,3	38,5	43,6	40,8	2,59	1,50	6,4	3		
	M2	34,3	31,5	32,7	32,9	1,35	0,78	4,1	3		
	M3	27,9	25,2	31,2	28,2	3,01	1,74	10,7	3		
Run 2	V1	220,7	234,6	251,5	235,6	15,45	8,92	6,6	3	4,9	
	V2	202,1	207,5	207,9	205,8	3,21	1,86	1,6	3		
	V3	196,4	198,0	195,1	196,5	1,45	0,83	0,7	3		
	M1	60,6	71,3	57,3	63,0	7,32	4,22	11,6	3		
	M2	47,4	51,9	50,7	50,0	2,34	1,35	4,7	3		
	M3	32,6	35,5	34,2	34,1	1,45	0,83	4,2	3		
Run 3	V1	248,1	224,5	232,3	235,0	12,05	6,96	5,1	3	5,3	
	V2	198,2	191,4	192,4	194,0	3,64	2,10	1,9	3		
	V3	174,2	173,2	173,2	173,5	0,58	0,34	0,3	3		
	M1	55,7	59,0	62,1	58,9	3,21	1,85	5,5	3		
	M2	44,9	45,2	40,1	43,4	2,83	1,64	6,5	3		
	M3	33,0	40,1	42,5	38,6	4,92	2,84	12,8	3		

Anmerkung: Werte für chelatierbares Eisen in μM

4.8.1.1 Vergleich der Messergebnisse (mit Greiner-Platten) mit einem Run auf NUNC-Wells

Um die Performance einer NUNC-Platte weiter zu untersuchen, wurden in einem parallelen Ansatz auf einer HES-DFO beschichteten NUNC-Platte Eisen-Standards und Qualitätskontrollproben aufgetragen, inkubiert (zwei Stunden bei 37°C), gewaschen. Um HES-DFO-gebundenes Eisen zu quantifizieren, wurden die Wells dann mit Ferrozin-Reagenz inkubiert.

In Tabelle 13 und in Tabelle 14 sind die Ergebnisse eines Messdurchgangs (Run) gezeigt.

Während die Werte für DFO-chelatierbares Eisen nach 30 Minuten Inkubation mit Ferrozin-Reagenz noch bei beiden Platten vergleichbare Werte hatten, waren sie nach 60-minütiger Inkubation mit Ferrozin-Reagenz bei Verwendung der NUNC-Platten mit allen Proben niedriger.

Diese Untersuchung zeigt aber auch, dass auch NUNC-Platten für die Erfassung von HES-DFO-gebundenem Eisen eingesetzt werden können, die Ergebnisse aber durch die spezifischen Platteneigenschaften beeinflusst werden.

Tabelle 13: Messergebnis eines Runs mit einer NUNC-Platte unter gleichen Bedingungen (nach 30 Minuten Inkubationszeit mit Ferrozin-Reagenz)

Nunc-Platte										
Intraday Variation (30 min)	QCS	Replik 1	Replik 2	Replik 3	Mean	SD	SEM	CV (%)	n	Mittlerer CV (%) pro Run
Run 1	V1	96,1	117,0	108,1	107,1	10,51	6,07	9,8	3	13,7
	V2	77,2	94,5	80,4	84,0	9,18	5,30	10,9	3	
	V3	58,9	61,5	49,5	56,7	6,30	3,64	11,1	3	
	M1	19,9	16,0	n.b.	17,9	2,73	1,93	15,2	2	
	M2	13,4	12,5	n.b.	13,0	0,57	0,41	4,4	2	
	M3	17,2	11,1	n.b.	14,2	4,31	3,05	30,4	2	

Anmerkung: Werte für chelatierbares Eisen in µM. n.b.: nicht bestimmt

Tabelle 14: Messergebnis eines Runs mit einer NUNC-Platte unter gleichen Bedingungen (nach 60 Minuten Inkubationszeit mit Ferrozin-Reagenz)

Nunc-Platte										
Intraday Variation (60 min)										Mittlerer CV (%) pro Run
	QCS	Replik 1	Replik 2	Replik 3	Mean	SD	SEM	CV (%)	n	
Run 1	V1	156,8	187,0	187,2	177,0	17,50	10,10	9,9	3	9,5
	V2	133,1	158,9	140,3	144,1	13,36	7,71	9,3	3	
	V3	96,6	107,2	86,6	96,8	10,30	5,95	10,6	3	
	M1	35,6	32,0		33,8	2,54	1,80	7,5	2	
	M2	25,0	26,4		25,7	1,02	0,72	4,0	2	
	M3	25,3	20,2		22,7	3,56	2,52	15,7	2	

Anmerkung: Werte für chelatierbares Eisen in μM

4.8.2 Interday-Variation

Zur Bestimmung der Interday-Variation der Messergebnisse einer Methode wurden die Mittelwerte aller Messwerte für eine Probe, die an mindestens zwei Tagen bei mindestens drei Durchgängen (Runs) unabhängig voneinander gemessen wurden, berechnet. Neben dem Mittelwert wurden die Standardabweichungen (SD und SEM), sowie der prozentuelle Variationskoeffizient (CV (%)) ermittelt, und zwar getrennt nach der Probe. Hier wurden jeweils drei Proben (sogenannte Quality Control Sample; QCS) mit Venofer (V1, V2 und V3) und Monofer (M1, M2 und M3) zur Testung verwendet (siehe Abschnitt 3.7.).

In Abbildung 22 sind die Ergebnisse in Streudiagrammen dargestellt. Die Proben mit Venofer enthalten wesentlich mehr HES-DFO-chelatierbares Eisen als die Proben mit Monofer. Verlängerung der Inkubationszeit mit dem Ferrozin-Reagenz erhöht sowohl bei Venofer als auch bei Monofer die Werte für HES-DFO-chelatierbares Eisen.

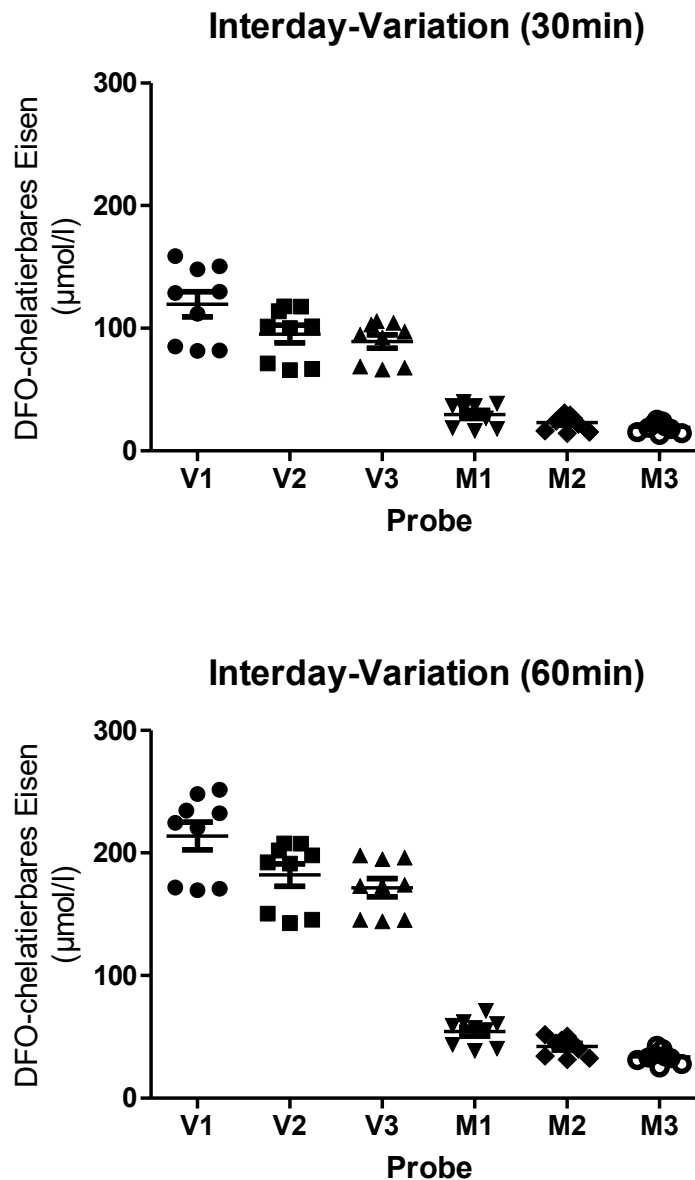


Abbildung 22: HES-DFO-chelatierbares Eisen bei Venofer (V) und Monofer (M) nach Inkubation mit Ferrozin-Reagenz (nach 30 und 60 Minuten)

Die Messergebnisse sind in Tabelle 15 und Tabelle 16 zusammengefasst. Unter Verwendung der Software GraphPad Prism 5 und MS-Excel wurden die Daten in den einzelnen Spalten der Tabelle statistisch ausgewertet, indem Mittelwerte, Standardabweichungen und Variationskoeffizienten für die einzelnen Proben ermittelt wurden. Der mittlere Variationskoeffizient lag bei 22,3% für Venofer und bei 27,5% bei Monofer (nach 30-minütiger

Inkubation mit Ferrozin-Reagenz). Für beide Präparate zusammen ergab sich zu diesem Zeitpunkt ein Variationskoeffizient von 24,9% (Tabelle 15).

Tabelle 15: Interday-Variation der Ergebnisse für HES-DFO chelatierbares Eisen bei Eisenpräparaten (30 Minuten nach Zugabe von Ferrozin-Reagenz)

Greiner Platten

Interday Variation (30 min)	Venofer			Monofer		
	V1	V2	V3	M1	M2	M3
Run 1, Tag 1	85,0	67,0	68,8	18,5	16,3	15,5
	81,8	66,0	66,4	16,5	15,3	13,2
	81,6	71,4	68,0	17,9	14,5	14,5
Run 2, Tag 1	111,8	101,6	97,4	34,1	26,9	18,8
	128,9	100,1	95,0	38,6	28,1	20,0
	129,8	101,3	92,6	26,6	21,8	17,9
Run 3, Tag 2	158,8	117,8	105,8	36,7	30,8	22,1
	150,7	117,5	103,2	40,1	29,1	23,8
	148,1	113,9	104,6	36,7	24,4	25,5
Mean	119,6	95,2	89,1	29,5	23,0	19,0
SD	30,9	21,4	16,6	9,7	6,3	4,2
SEM	10,3	7,1	5,5	3,2	2,1	1,4
n	9	9	9	9	9	9
CV (%)	25,8	22,5	18,7	32,9	27,5	22,2
Mittlerer CV (%) pro Präparat	22,3			27,5		
Mittlerer CV (%) für alle Präparate	24,9					

Anmerkung: Werte für chelatierbares Eisen in μM

Wurde die Inkubation mit Ferrozin-Reagenz auf 60 Minuten verlängert lagen die mittleren Variationskoeffizient für Venofer bei 14,6% und bei Monofer bei 18,3%. Für beide Präparate zusammen ergab sich zu diesem Zeitpunkt ein Variationskoeffizient von 16,5%.

Tabelle 16: Interday-Variation von HES-DFO-chelatierbarem Eisen bei Eisenpräparaten (nach einer 60-minütigen Inkubation mit Ferrozin-Reagenz)

Greiner Platten

Interday Variation (60 min)	Venofer			Monofer		
	V1	V2	V3	M1	M2	M3
Run 1, Tag 1	169,7	142,9	144,4	40,3	34,3	27,9
	171,8	145,6	145,6	38,5	31,5	25,2
	170,9	150,5	145,3	43,6	32,7	31,2
Run 2, Tag 1	220,7	202,1	196,4	60,6	47,4	32,6
	234,6	207,5	198,0	71,3	51,9	35,5
	251,5	207,9	195,1	57,3	50,7	34,2
Run 3, Tag 2	248,1	198,2	174,2	55,7	44,9	33,0
	224,5	191,4	173,2	59,0	45,2	40,1
	232,3	192,4	173,2	62,1	40,1	42,5
Mean	213,8	182,1	171,7	54,3	42,1	33,6
SD	33,7	27,5	22,3	11,1	7,8	5,4
SEM	11,2	9,2	7,4	3,7	2,6	1,8
n	9	9	9	9	9	9
CV (%)	15,8	15,1	13,0	20,4	18,4	16,2
Mittlerer CV (%) pro Präparat	14,6			18,3		
Mittlerer CV (%) für alle Präparate	16,5					

Anmerkung: Werte für chelatierbares Eisen in μM

Bei Verwendung von Venofer und Monofer als Qualitätskontrollproben deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass eine Verlängerung der Inkubationszeit mit Ferrozin-Reagenz, die Genauigkeit und Reproduzierbarkeit der Methode verbessert.

5 Schlussbetrachtung

Intravenöse Eisenpräparate werden zur Behandlung von Patienten mit Eisenmangel eingesetzt, wenn andere Maßnahmen wie die vermehrte Aufnahme von Nahrungsmitteln mit hohem Gehalt bioverfügbaren Eisens oder die Einnahme von oralen Eisenpräparaten, nicht oder zu langsam zur Erhöhung des Anteils an funktionellem Eisen und Auffüllen der Eisenspeicher führen (Schaefer u. a. 2020).

Für die Therapie eines Eisenmangels stehen verschiedene intravenöse Eisenpräparate zur Verfügung. Die Präparate unterscheiden sich dabei in ihrer Stabilität, die in erster Linie durch die Kohlenhydrathülle erfolgt, die den Eisenkern stabilisiert. In der Praxis werden neben sehr stabilen Präparaten, die in Einzeldosen von bis zu 1500mg verabreicht werden können (wie Eisenisomaltosid, Monofer) auch weniger stabile Präparate (wie Eisensaccharat, Venofer) verwendet. Bei Letzterem werden maximale Einzeldosen von 200mg von den Herstellern empfohlen (Fütterer u. a. 2013; Jahn u. a. 2011, O A o. J.-b).

Zur Qualitätskontrolle und bei der Fragestellung, ob ein für eine generische Zulassung produziertes Präparat mit dem Originalpräparat vergleichbar ist, wurde von den Zulassungsbehörden auch die Ermittlung des „labilen Eisengehalts“ zur Beurteilung erwogen (Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP) o. J.).

In der hier vorliegenden Arbeit wurden Polystyren-Oberflächen mit polymergebundenem Eisen-Chelator (Hydroxyethylstärke-gekoppeltes Deferoxamin, HES-DFO) beschichtet, um das labile Eisen der Probe zu komplexieren. Nach Entfernen der Probe und mehreren Waschschritten wurde HES-DFO-gebundenes Eisen in den Wells der Platte mittels Ferrozin quantifiziert. Dabei soll unter sauren, reduzierenden Bedingungen HES-DFO-gebundenes Eisen reduziert und durch Ferrozin komplexiert werden. Der gebildete pinke Ferrozin-Eisen-Komplex wurde dann bei 540nm photometrisch erfasst.

Für die Beschichtung von Polystyren-Oberfläche wurde in dieser Arbeit das DFO-Derivat „Hydroxyethylstärke-gebundenes DFO“ (HES-DFO) eingesetzt, bei welchem DFO an das polymere Kohlenhydrate Hydroxyethylstärke (HES) gebunden ist. Dabei bindet DFO über Aldehydgruppen an Hetastarch (Hespan), ein hochmolekulares kolloidales nicht-ionisches Polymer (Hallaway u. a. 1989).

Polystyren-Oberflächen können durch Behandlung der Oberfläche zwar für hydrophile, hydrophobe, ionische und geladene Bindungspartner optimiert werden, eine Austestung ist jedoch immer empfehlenswert, da die tatsächlichen Eigenschaften der Polystyren-Platten auch Chargen-abhängig sein können (Lilyanna u. a. 2018).

In dieser Arbeit wurden daher Polystyren-Platten von zwei Herstellern (NUNC und Greiner) für die Beschichtung mit HES-DFO verwendet.

Die Oberflächen der Well-Platten wurden vor der Beschichtung mittels 3D-Digitalmikroskopie untersucht. Dabei war die Oberfläche der Polystyren-Platten des ersten Herstellers (NUNC) gleichmäßig und relativ glatt (*Abbildung 14*), während die Oberflächen in den Wells des zweiten Herstellers (Greiner) eine raue und gleichmäßig verteilte Strukturierung aufwiesen (*Abbildung 15*).

Um eine Bindung von Antikörpern oder anderen Proteinen in größerem Ausmaß zu ermöglichen, ist eine Oberflächenbehandlung des Polystyrens nötig. Dies kann mittels Bestrahlung erfolgen, wodurch es zu einer Aufspaltung von Phenylgruppen und Bildung von Hydroxy- und Carboxygruppen kommt, wodurch die Bindungseigenschaften der Oberfläche verändert werden. Nach Herstellerangaben sind die Platten von beiden Produzenten sogenannten „high binding“ Platten und für die Bindung von Proteinen/Antikörpern geeignet.

Die Platten wurden auch nach der Beschichtung mit HES-DFO mittels 3-D-Digitalmikroskopie untersucht. Dabei waren auf der Oberfläche der NUNC-Platten Anhäufungen von unregelmäßigen Oberflächenstrukturen sichtbar, die ungleichmäßig auf der gesamten Oberfläche verteilt waren. Die Greiner-Platte hatte hingegen nach Beschichtung mit HES-DFO eine glatte, gleichmäßig verteilte Oberflächenstruktur (*Abbildung 14* und *Abbildung 15*).

Im weiteren Verlauf der Studie wurde untersucht, ob die im 3-D-Digitalmikroskop erkennbaren Unterschiede der Oberflächenstruktur der beiden Platten nach der HES-DFO-Beschichtung der Wells auch einen Einfluss auf deren Eisenbindungseigenschaften haben.

Dazu wurden Eisenkalibrierlösungen auf die mit HES-DFO beschichteten Platten beider Produzenten aufgetragen, zwei Stunden bei 37°C inkubiert. Danach wurde das gebundene Eisen nach Reduktion und Komplexierung mittels Ferrozin bei 540nm quantifiziert. Bei niederen Eisenkonzentrationen konnten bei Greiner-Platten konzentrationsabhängige

Absorptionsunterschiede gemessen werden. Auf NUNC-Platten traten hingegen bei diesen Eisenkonzentrationen fast die gleichen Absorptionswerte auf (*Abbildung 16*). Dies zeigt, dass die Platte von Greiner zur Messung von kleinen Unterschieden an DFO-gebundenem Eisen besser geeignet sein dürfte. Die Greiner-Platte wies bei der Untersuchung im 3-D-Digitalmikroskop eine gleichmäßigere Beschichtung mit HES-DFO auf, wodurch es möglicherweise bereits bei kleinen Konzentrationen an labilem Eisen zu einer Bindung an DFO kommen konnte.

Mikrowellplatten aus Polystyren sind in verschiedenen Qualitäten am Markt erhältlich. Sogenannte „high binding“ Platten haben dabei behandelte Oberflächen die gegenüber unbehandelten Platten eine verbesserte Proteinbindung aufweisen sollen und daher häufig für immunologische Verfahren verwendet werden. Verschiedene Hersteller bieten „high binding“ Platten für *in vitro* Versuche an, wobei eine Studie große Unterschiede zwischen den Produkten verschiedener Hersteller finden konnte, wenn die Platten systematisch ausgetestet wurden (Nowak, Watala, und Boncler 2014). Zur Optimierung der Messung von labilem Eisen mittels der in dieser Arbeit verwendeten Methode könnte zukünftig eine Austestung noch weiterer Plattenfabrikate erfolgen.

Die Quantifizierung des DFO-komplexierten Eisens in den Wells erfolgte in der vorliegenden Arbeit durch Reduktion und Bildung eines gefärbten Ferrozin-Eisen-Komplexes, der photometrisch bei 540nm gemessen wurde.

Zu Beginn der Studie war nicht klar, wie rasch DFO-gebundenes Eisen von HES-DFO freigesetzt, reduziert und durch Ferrozin komplexiert wird. Es wurden daher Variationen der Inkubationszeit mit dem reduzierenden Ferrozin-Reagenz durchgeführt und die Bildung des Ferrozin-Eisen-Komplexes über einen längeren Zeitraum bei 540nm erfasst. Alle Messungen erfolgten dabei bei Raumtemperatur. Im Konzentrationsbereich von 0 bis 250µM Eisen stieg nach Zugabe von reduzierendem Ferrozin-Reagenz die Steigung der Standardgeraden die ersten 5 Minuten ($t = 300$ Sekunden) an und stabilisierte sich danach allmählich.

Die Genauigkeit der Regressionsgerade die durch das Bestimmtheitsmaß bzw. die Determinationskonstante r^2 angegeben werden kann, hatte bereits nach 15 Minuten Inkubationszeit ($t = 900$ s) einen Wert von 0,9925 und blieb bis zum Ende der Inkubation nach 55 Minuten ($t = 3300$ s) praktisch konstant.

Daraus kann geschlossen werden, dass bei Einsatz der Methode eine Inkubation mit reduzierendem Ferrozin-Reagenz von mindestens 15 Minuten bei Raumtemperatur (26°C) nötig ist. Die Messung bei 540nm sollte dann innerhalb von 30 Minuten nach Zugabe von Ferrozin-Reagenz erfolgen.

Dieser Zeitrahmen liegt in guter Übereinstimmung mit der Inkubationszeit, die in der Literatur für die Bildung des Ferrozin-Eisenkomplexes in biologischen Proben angegeben wurde. Für die Bildung eines Ferrozin-Eisen-Komplexes nach einer von Fish und Kollegen beschriebenen Methode, wurde eine Inkubationsdauer von 30 Minuten bei Raumtemperatur zur Bildung des Ferrozin-Eisenkomplexes angegeben (Fish 1988).

Wurde der Konzentrationsbereich der Eisenkalibrierlösungen bis zu 1000µM ausgedehnt, zeigte sich, dass bei Konzentrationen über 250µM die Absorption bei 540nm nicht mehr weiter linear mit der Eisenkonzentration anstieg, sondern im Gegenteil, wieder abnahm. Verschiedene Szenarien können für dieses Verhalten bei Konzentrationen über 250µM Eisen angenommen werden: Die eingesetzte Eisen-Standard-Stocklösung bestand aus 10mM FeCl₃ (in 0,01M HCl) und wurde in HBS, pH7,4 verdünnt, um die Eisenkonzentration von 1000µM einzustellen. Anschließend wurden damit weitere Standards mittels serieller 1:2-Verdünnung im gleichen Puffer hergestellt. Bei Herstellung der Eisenlösungen mit 1000µM und 500µM könnte bereits die Pufferkapazität des zur Verdünnung der Eisen-Standard Stocklösung verwendeten Puffers (HBS, pH 7,4) nicht mehr ausreichen um alle H⁺-Ionen abzufangen. Der Schnell-Test mit Universalindikator-pH-Papier ergab bei diesen Eisenkonzentrationen einen sauren pH-Wert. Die Beschichtung der Oberfläche mit HES-DFO erfolgt in einem basischen Puffer (10mmol/l Natrium Phosphat Puffer, pH 8.6). Bei Inkubation der Eisenlösung in der beschichteten Platten könnte es bei saurem pH-Wert zur Ablösung der HES-DFO-Beschichtung von der Polystyren-Oberfläche gekommen sein.

Da die Methode jedoch bei Eisenkonzentrationen von 0 bis 250µM Eisen eine gute Linearität der Standardkurve zeigte, wurde die Ursache des Abfalls der Absorptionswerte bei höheren Eisenkonzentrationen nicht weiterverfolgt. Puffer mit höherer Pufferkapazität könnten in zukünftigen Studien ausgetestet werden. Es könnten auch Eisen-Standard-Stocklösungen mit geringerem Gehalt an HCL ausgetestet werden.

Um die Methode noch weiter zu charakterisieren, wurden die Nachweis- und die Quantifizierungsgrenze der Methode ermittelt. Dabei stellt die Nachweisgrenze jene

Konzentration einer Substanz dar, bis zu der sie mit der Methode nachgewiesen werden kann und eine Aussage getroffen werden kann, ob die Substanz vorhanden ist. Die Quantifizierungsgrenze gibt an, bis zu welcher Grenze eine Konzentrationsangabe mit der gewählten Methode zuverlässig abgeben werden kann. Bei darunterliegenden Werten ist eine Konzentrationsangabe unzulässig. Es kann nur noch die Aussage getroffen werden, ob die Substanz vorhanden ist oder nicht (European Commission. Joint Research Centre. 2016).

Die Mittelwerte der Nachweisgrenze (Limit of Detection, LOD) nach 30 Minuten Inkubation mit Ferrozin-Reagenz betrugen $1,42\mu\text{M}$ und nach 60 Minuten $1,97\mu\text{M}$. Die mittleren Quantifizierungsgrenzen (Limit of Quantification, LOQ) betrugen nach 30 Minuten Inkubation $3,63\mu\text{M}$ und $5,05\mu\text{M}$ nach 60 Minuten. Diese Werte wurden für die Platten von Greiner gefunden. Mit NUNC-Platten wurden vergleichbare Werte gefunden.

Wurde die Methode angewendet, um das labile Eisen zweier intravenöser Eisenpräparate zu quantifizieren, zeigten sich große Unterschiede zwischen den Präparaten Monofer und Venofer. Bei der Messung der Lösungen der Präparate mit den gleichen Eisenkonzentrationen wurde festgestellt, dass Venofer einen ungefähr zehnmal höheren Gehalt an labilem Eisen hat als Monofer.

Berücksichtigt man, dass Monofer in Einzeldosen bis zu 1500mg verabreicht werden kann, während für Venofer maximale Einzeldosen von nur 200mg empfohlen werden, wäre rein rechnerisch nach Verabreichung von 1500mg Monofer und 200mg Venofer unter Verwendung der Ergebnisse dieses Tests eine vergleichbare Belastung der Patienten mit labilem Eisen zu erwarten (O A o. J.-c, O A o. J.-a). Ob dies tatsächlich der Fall ist, könnte in zukünftigen klinischen Studien untersucht werden. Davor müsste die hier verwendete Methode aber noch für die Messung von HES-DFO gebundenem Eisen in Serum validiert werden.

In dieser Arbeit wurde auch die Reproduzierbarkeit der Methode untersucht indem, die Intraday- und Interday-Variabilität der Messergebnisse untersucht wurde. Zur Qualitätskontrolle wurden Proben mit den intravenösen Eisenpräparaten Venofer und Monofer hergestellt und in bereits mit HES-DFO beschichteten Platten gemeinsam mit Eisenstandards inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Platten gewaschen und das DFO-gebundene Eisen wurde in unabhängigen Experimenten nach Zugabe des reduzierenden Ferrozin-Reagenzes bei 540nm gemessen. Dabei lagen nach längerer Inkubation (60 Minuten)

mit Ferrozin-Reagenz die mittleren Intraday-Variationskoeffizienten unter 5%. Bei den Interday-Variationskoeffizienten wurde auch noch zwischen der Beschaffenheit der Kontrollproben unterschieden: Während mit Venofer der mittlere Variationskoeffizient bei 22,3% lag, betrug er bei Monofer 27,5% (nach 30-minütiger Inkubation mit Ferrozin-Reagenz). Für beide Präparate ergab sich zu diesem Zeitpunkt ein Variationskoeffizient von 24,9%. Wurde die Inkubation mit Ferrozin-Reagenz auf 60 Minuten verlängert verringerten sich die mittleren Variationskoeffizienten sowohl für Venofer (auf 14,6 %) als auch für Monofer (auf 18,3 %). Für beide Präparate gemeinsam ergab sich zu diesem Zeitpunkt ein Variationskoeffizient von 16,5%. Dies sind Werte, die unterhalb der empfohlenen maximalen 20%-Grenze für analytische Methoden liegen. (DeSilva u. a. 2003)

Diese Studie zeigt, dass HES-DFO beschichtete Platten und anschließender photometrischer Test reproduzierbare Ergebnisse bei der Erfassung von chelatierbarem Eisen liefern. Die genaue Einhaltung des Protokolls (Inkubationszeit bis zur Messung im Photometer) hat aber auch wesentlichen Einfluss auf die Messergebnisse selber und die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse.

Außerdem sollte auch die Verwendung von Polystyrenplatten unterschiedlicher Produzenten und eventuell auch wechselnder Chargen vermieden werden, falls eine größere Anzahl von Proben gemessen werden soll.

6 Conclusio

In dieser Arbeit wurden HES-DFO beschichtete Polystyren-Platten eingesetzt. Labiles Eisen wird von HES-DFO komplexiert und kann nach Reduktion und Bildung eines Ferrozin-Eisen-Komplexes photometrisch gemessen werden. Die LOD für labiles Eisen lag bei $2\mu\text{M}$, die LOQ bei $5\mu\text{M}$ Eisen. Eine Inkubationszeit mit dem Reduktionsmittel und Ferrozin von 30 Minuten wurde benötigt zur quantitativen Bildung des Ferrozin-Eisenkomplexes. Eine Messung zwischen 30 Minuten und 1 Stunde lieferte relativ stabile Absorptionswerte.

Mit der Methode konnte das labile Eisen zweier intravenöser Eisenpräparate quantifiziert werden. Der unterschiedliche Gehalt an labilem Eisen der beiden Präparate kann dabei mit den bekannten Stabilitätsunterschieden von Monofer und Venofer erklärt werden. Die Methode benötigt nur ein einfaches Platten-Spektralphotometer mit einem Filter für 540 nm. Die Inkubation der Proben in der beschichteten Platte bei 37°C und die Quantifizierung des an HES-DFO-gebundenen labilen Eisens in den Wells kann zeitlich und räumlich versetzt durchgeführt werden und hatte einen mittleren Intraday-Variationskoeffizienten unter 5%, sowie einem mittleren Interday-Variationskoeffizienten von 16,5%.

7 Verzeichnisse

7.1 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
AA1	Ascorbinsäurelösung
AA2F	Ascorbinsäure-Ferrozine-Reagens
CV	coefficient of variation
DFO	Deferoxamin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EPO	Erythropoietin
ERFE	Erythroferrin
FeCl ₃	Eisen(III)-chlorid
HBS	Hepes-buffered saline
HCl	Salzsäure
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HES-DFO	Hydroxyethylstärke-gekoppeltes Deferoxamin
I.V.	intravenös
LCI	labile cell iron
LOD	Limit of detection
LOQ	Limit of quantification
MG	Molekulargewicht
Na ₂ HPO ₄	Natriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NaH ₂ PO ₄	Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat
NaOH	Natriumhydroxid
NTBI	nontransferrin-bound iron

Abkürzung	Bedeutung
QCS	Quality control sample
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
SD	standard dsevation
S-DFO	Stärke-gekoppeltes Deferoxamin
SEM	standard error of mean
t_{1/2}	Halbwertszeit
TBI	transferrin-bound iron
TFR1	Transferrinrezeptor 1

7.2 Abbildungsverzeichnis

Ich habe mich bemüht, sämtliche Inhaber*innen der Bildrechte ausfindig zu machen und ihre Zustimmung zur Verwendung der Bilder in dieser Arbeit eingeholt. Sollte dennoch eine Urheberrechtsverletzung bekannt werden, ersuche ich um Meldung bei mir.

<i>Abbildung 1: Eisenmetabolismus und Regulation der Hecpidin-Expression</i>	<i>10</i>
<i>Abbildung 2: Chemische Struktur von Deferoxamin (DFO)</i>	<i>13</i>
<i>Abbildung 3: Molekulare Struktur von Hydroxyethylstärke-gekoppeltem Deferoxamin</i>	<i>15</i>
<i>Abbildung 4: Chemische Struktur von Ferrozin</i>	<i>16</i>
<i>Abbildung 5: Sonorex Ultraschallbad</i>	<i>19</i>
<i>Abbildung 6: Branson Sonifier 450 Ultraschall</i>	<i>20</i>
<i>Abbildung 7: Sicherheits-Sonifikationskammer</i>	<i>20</i>
<i>Abbildung 8: Lösung mit eingetauchter Ultraschallsonde in der Sicherheits-Sonifikationskammer</i>	<i>20</i>
<i>Abbildung 9: Das temperierte Plattenlesegerät Victor2 von HVD</i>	<i>24</i>
<i>Abbildung 10: 96-Well Platte mit Strips von NUNC (links) und von Greiner (rechts)</i>	<i>24</i>
<i>Abbildung 11: 96-Well-Platte nach dem Auftragen von Eisen-Kalibrierlösungen, Venofer, Monofer, Puffer und LM in Replikaten</i>	<i>30</i>
<i>Abbildung 12: 96-Well-Platte sofort nach dem Auftragen von AA2F-Reagenz</i>	<i>31</i>
<i>Abbildung 13: 96-Well-Platte nach einer Stunde Inkubation mit Reagenz AA2F</i>	<i>31</i>
<i>Abbildung 14: Oberfläche der NUNC- Platte vor und nach der Beschichtung mit HES-DFO</i>	<i>34</i>
<i>Abbildung 15: Oberfläche der Greiner-Platte vor und nach der Beschichtung mit HES-DFO ..</i>	<i>34</i>
<i>Abbildung 16: Zeitlicher Verlauf der Bildung des Ferrozin-Eisen-Komplexes bei 540nm mit verschiedenen Eisen-Kalibrierlösungen auf Polystyren-Platten von NUNC und Greiner</i>	<i>36</i>
<i>Abbildung 17: Absorptionsverlauf der Standardkurven bei 540nm bei Messung auf Greiner-Platte in Abhängigkeit der Inkubationszeit</i>	<i>37</i>
<i>Abbildung 18: Absorptionsverlauf der Standardkurven bei 540nm bei Messung auf NUNC-Platte in Abhängigkeit der Inkubationszeit</i>	<i>38</i>
<i>Abbildung 19: Verlauf der Kalibrierkurven mit Eisenchlorid nach unterschiedlichen Inkubationszeiten mit reduzierendem Ferrozin-Reagenz</i>	<i>39</i>

<i>Abbildung 20: Einfluss der Inkubationszeit mit Ferrozin-Reagenz auf Steigung und Bestimmtheitsmaß der Standardkurve</i>	<i>40</i>
<i>Abbildung 21: Vergleich HES-DFO-gebundenes Eisen in Abhängigkeit der Eisenkonzentration mit Venofer und Monofer nach unterschiedlichen Inkubationszeiten</i>	<i>46</i>
<i>Abbildung 22: HES-DFO-chelatierbares Eisen bei Venofer (V) und Monofer (M) nach Inkubation mit Ferrozin-Reagenz (nach 30 und 60 Minuten).....</i>	<i>51</i>

7.3 Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1: Herstellung der Eisen-Kalibrierlösungen mittels Verdünnungsreihe</i>	<i>26</i>
<i>Tabelle 2: Herstellung von Messproben mit Venofer mittels Verdünnungsreihe</i>	<i>27</i>
<i>Tabelle 3: Herstellung von Messproben mit Monofer mittels Verdünnungsreihe</i>	<i>28</i>
<i>Tabelle 4: Einfluss der Inkubationszeit auf Steigung und Linearität der Standardkurve bis zu einer Konzentration von 250µM Eisen</i>	<i>41</i>
<i>Tabelle 5 : Standardabweichung (Sy) und Steigung (S) nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten</i>	<i>43</i>
<i>Tabelle 6: Standardabweichung (Sy) und Steigung (S) nach einer Inkubationszeit von 60 Minuten</i>	<i>43</i>
<i>Tabelle 7: LOD und LOQ nach 30 Minuten Inkubation mit reduzierendem Ferrozin-Reagenz (in µM)</i>	<i>43</i>
<i>Tabelle 8: LOD und LOQ nach 60 Minuten Inkubation mit reduzierendem Ferrozin-Reagenz (in µM)</i>	<i>44</i>
<i>Tabelle 9: LOD und LOQ nach 30-minütiger Inkubation in Polystyren-Platten von Greiner und NUNC</i>	<i>44</i>
<i>Tabelle 10: LOD und LOQ nach 60-minütiger Inkubation in Polystyren-Platten von Greiner und NUNC (in µM)</i>	<i>44</i>
<i>Tabelle 11: Intraday-Variation der photometrischen Messung von HES-DFO-chelatierbarem Eisen (nach 30 min Inkubation mit Ferrozin-Reagenz)</i>	<i>48</i>
<i>Tabelle 12: Intraday-Variation der photometrischen Messung von HES-DFO-chelatierbarem Eisen (nach 60 min Inkubation mit Ferrozin-Reagenz)</i>	<i>48</i>
<i>Tabelle 13: Messergebnis eines Runs mit einer NUNC-Platte unter gleichen Bedingungen (nach 30 Minuten Inkubationszeit mit Ferrozin-Reagenz)</i>	<i>49</i>
<i>Tabelle 14: Messergebnis eines Runs mit einer NUNC-Platte unter gleichen Bedingungen (nach 60 Minuten Inkubationszeit mit Ferrozin-Reagenz)</i>	<i>50</i>
<i>Tabelle 15: Interday-Variation der Ergebnisse für HES-DFO chelatierbares Eisen bei Eisenpräparaten (30 Minuten nach Zugabe von Ferrozin-Reagenz)</i>	<i>52</i>
<i>Tabelle 16: Interday-Variation von HES-DFO-chelatierbarem Eisen bei Eisenpräparaten (nach einer 60-minütigen Inkubation mit Ferrozin-Reagenz)</i>	<i>53</i>

7.4 Literaturverzeichnis

Die Literaturverwaltung erfolgte mit der Open Source Software Zotero.

Breuer, W., A. Ronson, I. N. Slotki, A. Abramov, C. Hershko, und Z. I. Cabantchik. 2000. „The Assessment of Serum Nontransferrin-Bound Iron in Chelation Therapy and Iron Supplementation“. *Blood* 95(9):2975–82.

Brissot, Pierre, Martine Ropert, Caroline Le Lan, und Olivier Loréal. 2012. „Non-transferrin bound iron: A key role in iron overload and iron toxicity“. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1820(3):403–10. doi: 10.1016/j.bbagen.2011.07.014.

Cabantchik, Zvi I. 2014. „Labile Iron in Cells and Body Fluids: Physiology, Pathology, and Pharmacology“. *Frontiers in Pharmacology* 5. doi: 10.3389/fphar.2014.00045.

Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP). o. J. „Reflection Paper on the Data Requirements for Intravenous Iron-Based Nano-Colloidal Products Developed with Reference to an Innovator Medicinal Product“. 11.

Dayani, Pouya N., Maria C. Bishop, Keith Black, und Paul M. Zeltzer. 2004. „Desferoxamine (DFO) – Mediated Iron Chelation: Rationale for a Novel Approach to Therapy for Brain Cancer“. *Journal of Neuro-Oncology* 67(3):367–77. doi: 10.1023/B:NEON.0000024238.21349.37.

DeSilva, Binodh, Wendell Smith, Russell Weiner, Marian Kelley, JoMarie Smolec, Ben Lee, Masood Khan, Richard Tacey, Howard Hill, und Abbie Celniker. 2003. „Recommendations for the Bioanalytical Method Validation of Ligand-Binding Assays to Support Pharmacokinetic Assessments of Macromolecules“. *Pharmaceutical Research* 20(11):1885–1900. doi: 10.1023/b:pham.0000003390.51761.3d.

Dragsten, Paul R., Philip E. Hallaway, Gregory J. Hanson, Arthur E. Berger, Bruce Bernard, und Bo E. Hedlund. 2000. „First human studies with a high-molecular-weight iron chelator“. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 135(1):57–65. doi: 10.1016/S0022-2143(00)70021-7.

- European Commission. Joint Research Centre. 2016. *Guidance Document on the Estimation of LOD and LOQ for Measurements in the Field of Contaminants in Feed and Food*. LU: Publications Office.
- Fish, W. W. 1988. „Rapid colorimetric micromethod for the quantitation of complexed iron in biological samples“. *Methods in enzymology* 158:357–64.
- Fütterer, S., I. Andrusenko, U. Kolb, W. Hofmeister, und P. Langguth. 2013. „Structural Characterization of Iron Oxide/Hydroxide Nanoparticles in Nine Different Parenteral Drugs for the Treatment of Iron Deficiency Anaemia by Electron Diffraction (ED) and X-Ray Powder Diffraction (XRPD)“. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 86:151–60. doi: 10.1016/j.jpba.2013.08.005.
- Ganz, Tomas, und Elizabeta Nemeth. 2012. „Iron Metabolism: Interactions with Normal and Disordered Erythropoiesis“. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 2(5):a011668. doi: 10.1101/cshperspect.a011668.
- Geisser, Peter, M. Baer, und E. Schaub. 1993. „Structure/histotoxicity relationship of parenteral iron“. *Arzneimittel-Forschung* 42:1439–52.
- Giokas, Dimosthenis L., Evangelos K. Paleologos, und Miltiades I. Karayannis. 2002. „Speciation of Fe(II) and Fe(III) by the Modified Ferrozine Method, FIA–Spectrophotometry, and Flame AAS after Cloud-Point Extraction“. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 373(4):237–43. doi: 10.1007/s00216-002-1326-7.
- Gupta, Dr. C. P. 2014. „Role of Iron (Fe) in Body“. *IOSR Journal of Applied Chemistry* 7(11):38–46. doi: 10.9790/5736-071123846.
- Hallaway, P. E., J. W. Eaton, S. S. Panter, und B. E. Hedlund. 1989. „Modulation of Deferoxamine Toxicity and Clearance by Covalent Attachment to Biocompatible Polymers“. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86(24):10108–12. doi: 10.1073/pnas.86.24.10108.
- Harmatz, Paul, Robert W. Grady, Paul Dragsten, Elliott Vichinsky, Patricia Giardina, Jacqueline Madden, Michael Jeng, Becky Miller, Gregory Hanson, und Bo Hedlund.

2007. „Phase Ib Clinical Trial of Starch-Conjugated Deferoxamine (40SD02): A Novel Long-Acting Iron Chelator“. *British Journal of Haematology* 138(3):374–81. doi: 10.1111/j.1365-2141.2007.06651.x.
- Jahn, Markus R., Hans B. Andreasen, Sören Fütterer, Thomas Nawroth, Volker Schünemann, Ute Kolb, Wolfgang Hofmeister, Manuel Muñoz, Klaus Bock, Morten Meldal, und Peter Langguth. 2011. „A Comparative Study of the Physicochemical Properties of Iron Isomaltoside 1000 (Monofer), a New Intravenous Iron Preparation and Its Clinical Implications“. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics: Official Journal of Arbeitsgemeinschaft Fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V* 78(3):480–91. doi: 10.1016/j.ejpb.2011.03.016.
- Lilyanna, Shera, Enoch Ming Wei Ng, Shiho Moriguchi, Siew Pang Chan, Ryohei Kokawa, So Hung Huynh, P. C. Jenny Chong, Yan Xia Ng, A. Mark Richards, Tuck Wah Ng, und Oi Wah Liew. 2018. „Variability in Microplate Surface Properties and Its Impact on ELISA“. *The Journal of Applied Laboratory Medicine* 2(5):687–99. doi: 10.1373/jalm.2017.023952.
- Macdougall, Iain C. 1999. „Strategies for iron supplementation: Oral versus intravenous“. *Kidney International* 55:S61–66. doi: 10.1046/j.1523-1755.1999.055Suppl.69061.x.
- Malik, Aamir, Sandip D. Firke, Ravindra R. Patil, Atul A. Shirkhedkar, und Sanjay J. Surana. 2020. „Determination of Iron Chelating Agents by Analytical Methods: A Review“. *Critical Reviews in Analytical Chemistry* 50(3):254–64. doi: 10.1080/10408347.2019.1620095.
- Nowak, Joanna, Cezary Watala, und Magdalena Boncler. 2014. „Antibody Binding, Platelet Adhesion, and Protein Adsorption on Various Polymer Surfaces“. *Blood Coagulation & Fibrinolysis: An International Journal in Haemostasis and Thrombosis* 25(1):52–60. doi: 10.1097/MBC.0b013e328364a802.
- O A. o. J.-a. „Monoferric (Ferric Derisomaltose Injection): Uses, Dosage, Side Effects, Interactions, Warning“. *RxList*. Abgerufen 12. November 2021 (<https://www.rxlist.com/monoferric-drug.htm>).

O A. o. J.-b. „Venofer - Iron sucrose injection, USP“. Abgerufen 26. August 2013
(<http://www.venofer.com/HCP/Index.aspx>).

O A. o. J.-c. „Venofer (iron sucrose) 20 mg iron / ml, solution for injection or concentrate for solution for infusion - Summary of Product Characteristics (SmPC) - (emc)“.
Abgerufen 19. November 2019
(<https://www.medicines.org.uk/emc/product/5911/smpc>).

Pantopoulos, Kostas. 2024. „Oral Iron Supplementation: New Formulations, Old Questions“. *Haematologica* 109(9):2790–2801. doi: 10.3324/haematol.2024.284967.

PubChem. o. J. „Deferoxamine“. Abgerufen 16. Dezember 2024
(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2973>).

Schaefer, Benedikt, Eva Meindl, Sonja Wagner, Herbert Tilg, und Heinz Zoller. 2020.
„Intravenous Iron Supplementation Therapy“. *Molecular Aspects of Medicine*
75:100862. doi: 10.1016/j.mam.2020.100862.