

MASTERARBEIT | MASTER'S THESIS

Titel | Title

Pharmakokinetik von intravenösem Eisen: Optimierung einer Methode zur
Messung von Transferrin-gebundenem Eisen im Serum in Gegenwart von
kolloidalen Eisennanopartikeln

verfasst von | submitted by

Šejla Zejnić 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

Hiermit möchte ich herzlich mich bei meiner Betreuerin, Ao. Univ.-Prof. Dr. Barbara Scheiber-Mojdehkar, bedanken, die es mir ermöglicht hat, meine Masterarbeit am Institut für Medizinische Chemie und Pathobiochemie durchzuführen.

Ich bedanke mich für die kompetente Betreuung, die hilfreiche Unterstützung und ihre fachliche Expertise. Besonders hervorheben möchte ich die bemerkenswerte ruhige und positive Art, mit der Frau Prof. Scheiber-Mojdehkar mir zur Seite gestanden und ihr Wissen weitergegeben hat.

Ein besonderer Dank gilt meiner Mutter, die mich in allen Situationen, auch in herausfordernden Zeiten, unterstützt hat und mir immer wieder Motivation und Zuversicht gegeben hat, meine Ziele nicht aus den Augen zu verlieren und weiterzuverfolgen. Ebenso danke ich meinem Vater für seine Unterstützung, seine Geduld und seinen Glauben an mich.

Ich danke meiner gesamten Familie, die während meiner gesamten Studienzeit an meiner Seite war und stets an mich geglaubt hat, sowie meinem Partner, der mich in jeder Hinsicht unterstützt, motiviert und bestärkt hat.

Abschließend möchte ich mich bei allen Menschen bedanken, die mich während meiner Studienjahre unterstützt und zum Entstehen dieser Arbeit beigetragen haben.

Danke von Herzen!

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	8
1.1	<i>Eisenmetabolismus</i>	8
1.1.1	Bedeutung von Eisen	8
1.1.2	Eisenaufnahme und -verwertung im Körper	9
1.1.3	Regulation des Eisenstoffwechsels und klinische Relevanz	10
1.2	<i>Die Bedeutung von Transferrin</i>	13
1.3	<i>Verwendung von Eisenpräparaten</i>	15
1.3.1	Orales Eisen	15
1.3.2	Intravenöse Eisenpräparate	16
1.3.3	Venofer	16
1.4	<i>Hintergrund zur Wahl der experimentellen Methode</i>	17
1.4.1	Proteinfällung mit Rivanol	17
1.4.2	Transferrin in Harnstoffgelen	18
1.5	<i>Ziel der Arbeit</i>	19
2	Materialien und Methoden	20
2.1	<i>Harnstoff-Gelelektrophorese</i>	20
2.1.1	Materialien und Lösungen	20
2.1.2	Gießen der Gele	21
2.1.3	Elektrophorese	23
2.1.4	Färben der Gele	25
2.1.5	Fotodokumentation	27
2.1.6	Densitometrische Auswertung	28
2.2	<i>Vorversuch Spiken des Serums mit Apo-Transferrin</i>	29
2.2.1	Materialien	29
2.2.2	Ansatz	30
2.2.3	Durchführung	31

2.3	<i>Vergleichsproben für die Harnstoff-Gelelektrophorese</i>	31
2.3.1	Materialien	31
2.3.2	Durchführung	32
2.3.3	Harnstoff-Gelelektrophorese	32
2.4	<i>Gewinnung der Proben zur Bestimmung der Zeit und Temperaturabhängigkeit der Eisenbeladung von Transferrin</i>	35
2.4.1	Materialien	35
2.4.2	Ansätze	37
2.4.3	Durchführung	37
2.4.4	Durchführung der Harnstoff-Gelelektrophorese	39
2.4.5	Fotodokumentation	44
2.4.6	Densitometrische Auswertung	45
2.5	<i>Statistische Auswertung</i>	46
2.5.1	Materialien	46
2.5.2	Durchführung	46
3	Ergebnisse	47
3.1	<i>Einfluss von Apo-Transferrin-Spike auf die Verteilung der Transferrinspezies in Normalserum</i>	47
3.2	<i>Einfluss der Aufarbeitungszeit bis zur Rivanolfällung auf die Verteilung der Transferrinspezies in gepooltem humanem Serum gesunder Probanden (von Sigma)</i>	52
3.3	<i>Einfluss der Temperatur bis zur Rivanolfällung auf die Verteilung der Transferrinspezies in unbehandeltem Serum</i>	54
3.4	<i>Einfluss der Aufarbeitungszeit bis zur Rivanolfällung auf die Verteilung der Transferrinspezies in Serum nach Inkubation mit Venofer</i>	57
3.5	<i>Vergleich der Stabilität der Transferrin-Beladung im Serum ohne Zusatz von Venofer und in Gegenwart von Venofer</i>	62
4	Schlussbetrachtung	66
5	Conclusio	70

6	Verzeichnisse.....	71
6.1	<i>Abkürzungsverzeichnis.....</i>	<i>71</i>
6.2	<i>Abbildungsverzeichnis.....</i>	<i>73</i>
6.3	<i>Tabellenverzeichnis.....</i>	<i>75</i>
6.4	<i>Hilfsmittelverzeichnis.....</i>	<i>76</i>
6.5	<i>Literaturverzeichnis</i>	<i>77</i>

Abstract

Background: Intravenous iron preparations are used specifically to treat patients with iron deficiency, that cannot be compensated by oral iron administration. These include patients requiring dialysis with chronic renal anemia, patients with inflammatory bowel disease and patients with heart failure. Intravenous iron supplements are colloidal nanoparticles consisting of an iron core and a stabilizing carbohydrate shell. They contain only traces of labile iron, which binds directly to transferrin, the iron transport protein in plasma.

The iron nanoparticles must be absorbed by the reticuloendothelial system, metabolized and then released into the plasma to bind to transferrin. In addition to nanoparticle-bound iron, transferrin-bound iron and labile iron are also important parameters in pharmacokinetic studies for comparing original and generic preparations in bioequivalence studies.

Aim of the study: In this work, a method for measuring transferrin-bound iron was investigated regarding its practical implementation and an optimization of the protocol was sought.

Material and methods: Transferrin-bound iron was analyzed using urea gel electrophoresis, whereby the transferrin species loaded with different amounts of iron showed different migration distances in the gel, thereby enabling a densitometric evaluation of the transferrin loading. Serum was incubated with an iron saccharate (Venofer) for 15 minutes at 37 °C and then it was checked how the iron loading of transferrin changed depending on temperature and time.

Results: Serum without the addition of Venofer shows a largely constant distribution of the transferrin species (apotransferrin, monoferric transferrin and holotransferrin) for a period of 0 to 4 hours at 4 °C (on ice) as well as at 25 °C and 37 °C (in a water bath), the distribution of the transferrin species in serum with Venofer changed after just 30 minutes at 37 °C, after 1 hour at 25 °C and after 2 hours at 4 °C, with increasing proportions of monoferric and holotransferrin.

Conclusion: When measuring transferrin-bound iron as part of a pharmacokinetic study with iron sucrose, a strict protocol must be followed, both in terms of timing of sample collection and processing, as well as temperature conditions, to obtain meaningful results.

Zusammenfassung

Hintergrund: Intravenöse Eisenpräparate werden gezielt eingesetzt, um Patienten mit Eisenmangel, der durch orale Eisengabe nicht ausgeglichen werden kann, zu behandeln. Dazu zählen unter anderem dialysepflichtige Patienten mit chronischer renaler Anämie, Patienten mit entzündlichen Darmerkrankungen sowie Patienten mit Herzinsuffizienz. Intravenöse Eisenpräparate sind kolloidale Nanopartikel, die aus einem Eisenkern und einer stabilisierenden Kohlenhydrathülle bestehen. Sie enthalten nur Spuren von labilem Eisen, welches direkt an Transferrin, das Eisentransportprotein im Plasma, bindet. Die Eisennanopartikel müssen vom retikuloendothelialen System aufgenommen, metabolisiert und anschließend an das Plasma abgegeben werden, um an Transferrin zu binden. Neben Nanopartikel-gebundenem Eisen sind daher auch Transferrin-gebundenes Eisen sowie labiles Eisen wichtige Parameter in pharmakokinetischen Studien, um bei Bioäquivalenzstudien das Original mit generischen Präparaten zu vergleichen.

Ziel der Studie: In dieser Arbeit wurde eine Methode zur Messung von Transferrin-gebundenem Eisen hinsichtlich ihrer praktischen Durchführung untersucht und eine Optimierung des Protokolls angestrebt.

Material und Methoden: Transferrin-gebundenes Eisen wurde mittels Harnstoff-Gelelektrophorese analysiert, wobei die unterschiedlich mit Eisen beladenen Transferrinspezies unterschiedliche Wanderungsweite im Gel zeigten und dadurch eine densitometrische Auswertung der Transferrin-Beladung im gefärbten Gel ermöglichten. Serum wurde mit Eisensaccharat (Venofer) für 15 Minuten bei 37 °C inkubiert und anschließend erfolgte die Überprüfung, wie sich die Eisenbeladung von Transferrin, temperatur- und zeitabhängig, veränderte.

Ergebnisse: Während Serum ohne Zusatz von Venofer eine weitgehend konstante Verteilung der Transferrinspezies (Apo-Transferrin, monoferrisches Transferrin und Holo-Transferrin) über einen Zeitraum von 0 - 4 Stunden bei Umgebungstemperaturen von etwa 4 °C (auf Eis), 25 °C und 37 °C (im Wasserbad) zeigt, änderte sich die Verteilung bei Serum mit Venofer bereits nach 30 Minuten bei 37 °C, nach 1 Stunde bei 25 °C und nach 2 Stunden bei 4 °C, wobei der Anteil an monoferrischem Transferrin und Holo-Transferrin anstieg.

Schlussfolgerung: Bei der Messung von Transferrin-gebundenem Eisen im Rahmen einer pharmakokinetischen Studie mit Eisensaccharat muss ein striktes Protokoll, sowohl in Bezug auf das Timing der Probennahme und Verarbeitung als auch in Bezug auf die Temperaturbedingungen, eingehalten werden, um aussagekräftige Ergebnisse erzielen zu können.

1 Einleitung

1.1 Eisenmetabolismus

Eisen zählt zu den wichtigsten Spurenelementen der Erde, da es eine essenzielle Rolle bei lebenswichtigen Prozessen spielt. Neben seiner zentralen Bedeutung für den Sauerstofftransport und die Sauerstoffversorgung, als Hauptbestandteil von Hämoglobin, erfüllt Eisen auch bei vielen grundlegenden biologischen Abläufen wichtige Funktionen. Es ist vor allem auf zellulärer Ebene für die DNA-Synthese, die Zellatmung, das Zellwachstum und den Zelltod verantwortlich (Vogt *et al.*, 2021).

Eisen liegt im physiologischen Milieu in verschiedenen Oxidationszuständen vor (Fe^{2+} und Fe^{3+}), zwischen denen es mühelos wechseln kann (Roemhild *et al.*, 2021). Die Aufnahme erfolgt überwiegend im Darm, wo Eisen in seiner reduzierten, zweiwertigen Form über spezielle Metalltransporter aufgenommen wird. Nach der Aufnahme wird Eisen entweder in Form von Ferritin gespeichert oder an Transferrin gebunden, zu den Zielzellen transportiert (Vogt *et al.*, 2021).

Da Eisen auch toxisch wirken kann, ist ein ausgewogener Eisenhaushalt sehr wichtig, sowie eine strenge Überwachung durch zentrale Regulatoren des Eisenstoffwechsels (Roemhild *et al.*, 2021).

1.1.1 Bedeutung von Eisen

Eisen ist ein lebenswichtiger Bestandteil vieler Lebewesen und sowohl für deren Existenz als auch deren Wachstum von zentraler Bedeutung. Als Elektronendonator, sowie als Elektronenakzeptor, ist Eisen als Cofaktor an vielen Enzymreaktionen beteiligt (Nemeth and Ganz, 2021). Der Eisenbestand des menschlichen Körpers beträgt im Durchschnitt 3–4 g. Den größten Anteil enthält das Hämoglobin der Erythrozyten, wo Eisen für die Bindung und den Transport von Sauerstoff verantwortlich ist (Roemhild *et al.*, 2021).

Die Leber stellt das zweitgrößte Eisenkompartiment dar. Hepatozyten können bis zu 1 g Eisen, vorwiegend in Form von Ferritin, speichern. Die Höhe dieses Eisenspeichers ist variabel und kann, bedingt durch Menstruationsblutungen, bei Frauen im gebärfähigen Alter bei geringer Zufuhr von Nahrungseisen auch stark reduziert sein (Nemeth and Ganz, 2021).

Neben dieser zentralen Funktion ist Eisen an zahlreichen weiteren physiologischen Prozessen beteiligt, wie der DNA-Synthese, der Zellatmung, dem Zellwachstum, der Nukleinsäure-Reparatur, sowie dem programmierten Zelltod (Vogt *et al.*, 2021).

Zur Aufrechterhaltung des Eisenhaushalts muss der Körper täglich 1-2 mg Eisen aufnehmen. Die Zufuhr erfolgt hauptsächlich über die Nahrung, in der Eisen in zweiwertiger (Fe^{2+}) und dreiwertiger Form (Fe^{3+}) vorliegt (Ru *et al.*, 2024). Im Körper gilt Eisen im gebundenen Zustand als sicher und funktional. Es liegt an Proteine gebunden, im Hämoglobin oder in Clusterverbindungen, vor. In freier Form wirkt Eisen hingegen überwiegend zellschädigend und toxisch (Nemeth and Ganz, 2021). Vor allem die zweiwertige Form kann durch Bildung reaktiver Sauerstoffspezies Zell- und Organschäden verursachen (Roemhild *et al.*, 2021).

Da die Eisenausscheidung im Organismus eingeschränkt ist, ist es wichtig den Eisenhaushalt streng zu regulieren, was durch die Wechselwirkung von Ferroportin und Hepcidin geschieht. Genetische Veränderungen dieser Schlüsselfaktoren können zu einem Ungleichgewicht im Eisenhaushalt und in der Folge zu schweren pathologischen Zuständen führen (Roemhild *et al.*, 2021).

1.1.2 Eisenaufnahme und -verwertung im Körper

Es werden zwei Arten von Eisen aus der Nahrung unterschieden: Häm-Eisen und Nicht-Häm-Eisen. Häm-Eisen kommt vor allem in Fleisch vor, während Nicht-Häm-Eisen aus pflanzlichen Quellen stammt (Vogt *et al.*, 2021).

Für die intestinale Absorption spielt der Oxidationsgrad eine entscheidende Rolle, da Eisen ausschließlich in seiner zweiwertigen Form über das Duodenum oder das proximale Jejunum aufgenommen werden kann (Ru *et al.*, 2024). Daher muss Nicht-Häm-Eisen (Fe^{3+}) vor der Absorption zu Fe^{2+} reduziert werden (Vogt *et al.*, 2021). Häm-Eisen kann hingegen direkt über ein Häm-Trägerprotein aufgenommen werden (Ru *et al.*, 2024).

Im menschlichen Körper kann Eisen in seiner hydrophoben dreiwertigen Form (Fe^{3+}) oder in seinem zweiwertigen, wasserlöslichen Zustand (Fe^{2+}), zwischen denen es auch mühelos wechseln kann, vorliegen (Roemhild *et al.*, 2021).

Die Eisenaufnahme erfolgt über den DMT1-Transporter in die Enterozyten (Vogt *et al.*, 2021). Dort wird das Eisen entweder intrazellulär in Form von Ferritin gespeichert oder über Ferroportin in den Blutkreislauf abgegeben (Roemhild *et al.*, 2021).

Nach dem Export des zweiwertigen Eisens aus den Enterozyten ins Blut erfolgt eine Oxidation von Fe^{2+} zu Fe^{3+} , vermittelt durch Hephaestin oder Ceruloplasmin (Vogt *et al.*, 2021). Anschließend erfolgt die Bindung an Transferrin, über das Fe^{3+} zu den Zielorganen transportiert wird. Der Eisen-Transferrin-Komplex wird über den Transferrin-Rezep-

tor 1 (TfR1) in die Zelle aufgenommen. Intrazellulär wird das Eisen vom Transferrin abgespalten und wieder zu Fe^{2+} reduziert. Danach erfolgt eine Aufnahme über DMT1 in das Zytoplasma, wo es für wichtige physiologische Aufgaben verwendet wird (Ru *et al.*, 2024).

Eine weitere wichtige Rolle zur Aufrechterhaltung des Eisenhaushalts spielt das Recycling von Eisen aus alten Erythrozyten. Makrophagen in Milz, Leber und Knochenmark bauen gealterte Erythrozyten ab und stellen das enthaltene Eisen erneut für die Erythropoese zur Verfügung (Roemhild *et al.*, 2021).

Das Hormon Hepcidin, welches in der Leber gebildet wird, reguliert den Eisenhaushalt. Hepcidin bindet an das Protein Ferroportin, das für den Transport von Eisen aus den Zellen ins Blut verantwortlich ist (Nemeth and Ganz, 2021).

Bei Eisenüberladung oder Entzündungen steigt der Hepcidin-Spiegel und dessen Bindung an Ferroportin führt zum Abbau von Ferroportin. Dadurch wird weniger Eisen ins Blut abgegeben. Wenn der Körper hingegen unter Sauerstoffmangel (Hypoxie) leidet, sinkt die Hepcidin-Produktion und in der Folge wird weniger Ferroportin internalisiert und abgebaut. Dadurch wird die Eisenaufnahme über Ferroportin gestärkt (Ru *et al.*, 2024).

1.1.3 Regulation des Eisenstoffwechsels und klinische Relevanz

Das aus 25 Aminosäuren bestehende Peptidhormon Hepcidin spielt eine zentrale Rolle bei der Steuerung des Eisenhaushalts. Es wird in den Hepatozyten der Leber gebildet und reguliert drei wichtige Prozesse: die Absorption von Eisen aus der Nahrung im Dünndarm, die Freisetzung von Eisen aus Makrophagen, sowie die Freisetzung von Eisen, das in der Leber gespeichert ist (Nemeth and Ganz, 2023).

Der Transport des Eisens aus Zellen erfolgt durch Ferroportin. Es handelt sich dabei um ein Transmembranprotein mit zwölf Domänen und den zentralen Transporter von Eisen aus den Zellen ins Blutplasma. Ferroportin ist nicht nur in der Leber, den Makrophagen und den Enterozyten im Dünndarm vorhanden, sondern auch im Knochenmark. Hier vor allem in den Erythrozyten-Vorläuferzellen und auch reifen Erythrozyten, wo es überschüssiges Eisen ins Plasma zurückführt und vor Zellschäden schützt (Nemeth and Ganz, 2023).

Die Aktivität von Ferroportin wird direkt durch Hepcidin reguliert. Die Regulation erfolgt auf zwei Wegen: Zum einen blockiert Hepcidin den Transporter, indem es seine offene Struktur verschließt. Zum anderen wird durch die Bindung der Komplex mittels Endozytose in die Zelle aufgenommen und dort Ferroportin abgebaut (Nemeth and Ganz, 2021).

Diese Mechanismen sind wichtig für die Aufrechterhaltung der systemischen Eisenhomöostase. Bei Eisenüberschuss wird mehr Hepcidin in der Leber produziert, wodurch die Eisenaufnahme über Ferroportin vermindert ist. Ein Eisenmangel führt zu einer verringerten Hepcidinbildung und damit zu einer gesteigerten Eisenaufnahme ins Blutplasma (Nemeth and Ganz, 2023).

Hepcidin wird aber nicht nur durch den Eisenspiegel reguliert, sondern auch durch den gesteigerten Eisenbedarf während der Blutbildung und in der Schwangerschaft. Während der Erythropoese sinkt die Hepcidinproduktion, damit mehr Eisen für die Häoglobinsynthese zur Verfügung steht. In der Schwangerschaft, vor allem im zweiten und dritten Trimester, wird ebenfalls weniger Hepcidin produziert, um den gesteigerten Eisenbedarf der Mutter und des Kindes zu decken (Nemeth and Ganz, 2023).

Weiters spielt Hepcidin auch eine wichtige Rolle bei der angeborenen Immunantwort. Bei Infektionen und anderen entzündlichen Zuständen wird die Bildung von Hepcidin durch Interleukin-6 und andere Zytokine verstärkt. Dadurch wird Eisen in den Zellen zurückgehalten und steht Krankheitserregern nicht mehr für ihr Wachstum zur Verfügung (Nemeth and Ganz, 2023). In Abbildung 1 wird die Regulation des Eisenstoffwechsels durch Hepcidin dargestellt.

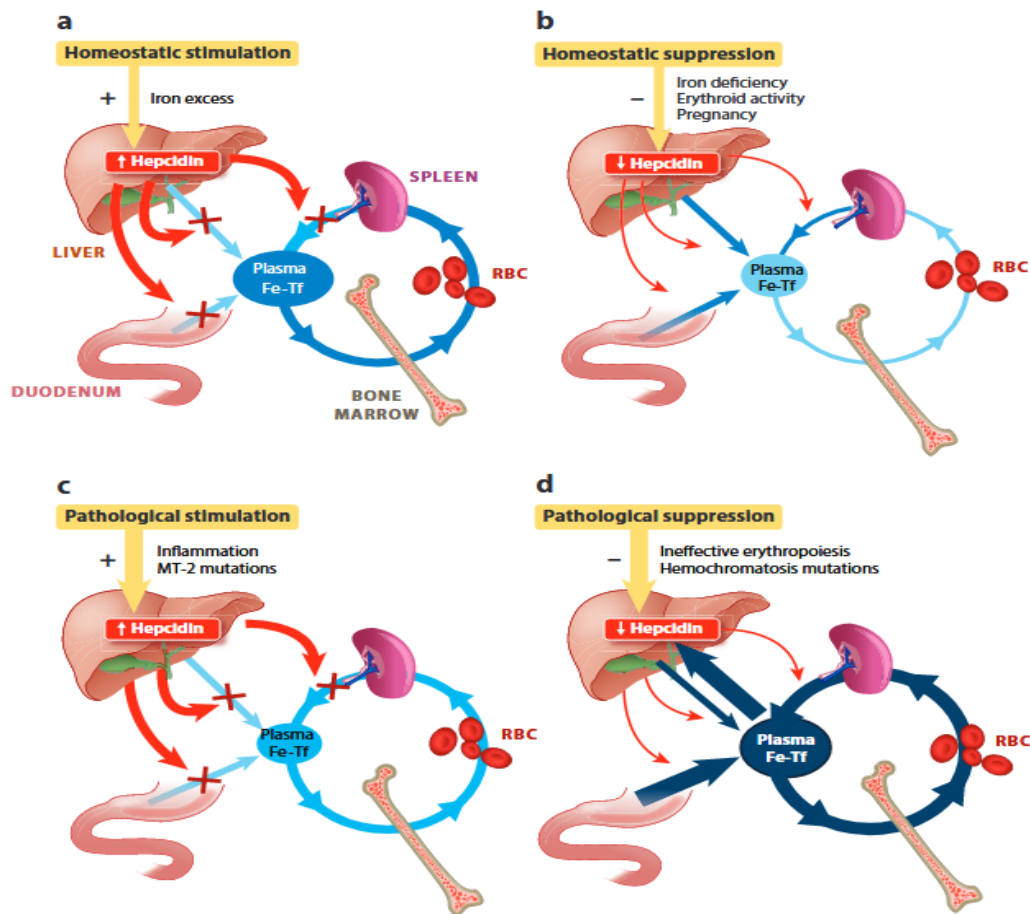


Abbildung 1: Mechanismen der Hepcidin vermittelten Eisenregulation

Hepcidin spielt eine homöostatische Rolle bei Erkrankungen, die mit physiologischer Hepcidinstimulation (a) oder -suppression (b) einhergehen, sowie eine pathologische Rolle bei eisenrestriktiven Erkrankungen (c) und Eisenüberladungserkrankungen (d). Die Eisenflüsse sind in Blautönen dargestellt, die die Intensität anzeigen. Hepcidin und seine Wirkungen sind in Rot dargestellt; normale und pathologische Hepcidinmodulatoren sind in Gold dargestellt. Abkürzungen: Fe-Tf, Eisen-Transferrin; MT-2, Matriptase-2; RBC, rote Blutkörperchen. Quelle: Abbildung aus Nemeth E, Ganz T. Hepcidin and Iron in Health and Disease. *Annu Rev Med.* 2023;74:261–277. doi:10.1146/annurev-med-043021-032816. Abbildung 1, Seite 263. Die Abbildung steht unter der Creative Commons Lizenz CC BY 4.0 (Attribution 4.0 International) und ist frei zugänglich gemäß den Lizenzbedingungen unter <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/> (abgerufen am 11.06.2025).

1.2 Die Bedeutung von Transferrin

Humanes Transferrin (hTF), ein 80 kDa Glykoprotein mit einer zwei-lappigen Struktur, wird zum Großteil in der Leber produziert. Es wird ins Blut sezerniert und bindet Eisen (Fe^{3+}) mit hoher, jedoch reversibler Affinität (Luck and Mason, 2012). Das Protein besteht aus einer Polypeptidkette von etwa 700 Aminosäuren, die in einen N-Lobus und einen C-Lobus unterteilt ist. (Ajayi *et al.*, 2024).

Transferrin kann an beiden der homologen Domänen (N- und C-Lobus) Eisen (Fe^{3+}) mit hoher Affinität binden, wobei die Bindungsstärke von den umgebenden pH-Bedingungen abhängt. Bei physiologischem pH (ca. 7,4) bindet Transferrin Eisen sehr stark, während bei pH-Werten $\leq 4,5$ kaum eine Bindung stattfindet. Durch die Eisenbindung verändert Transferrin seine Konformation, sodass sich die beiden Domänen annähern und das Protein eine geschlossene Form annimmt. (Ponka, 1999). In Abbildung 2 wird die Apo- und Holo-Transferrin-Struktur auf Einzelmolekülebene dargestellt.

Je nach Eisengehalt werden vier Formen des humanen Transferrins unterschieden (Luck and Mason, 2012):

- eisenfreies Transferrin (Apo-Transferrin)
- monoferrisches N-Lobus-Transferrin
- monoferrisches C-Lobus-Transferrin
- diferrisches Transferrin (Holo-Transferrin)

Im Blut ist nur ein Teil des Transferrins mit Eisen beladen, sodass das Protein eine wichtige Funktion als Eisenpuffer erfüllt und überschüssiges Eisen binden kann (Luck and Mason, 2012).

Die Konzentration von humanem Transferrin (hTF) im Serum liegt bei etwa 2,5 mg/ml, wobei der größte Anteil auf das eisenfreie Apo-Transferrin entfällt. Nachweislich besitzt der C-Lobus bei neutralem pH eine höhere Affinität zu Eisen als der N-Lobus, dennoch ist im Blut mehr monoferrisches N-Lobus-Transferrin vorhanden. Das diferrische Holo-Transferrin bindet Eisen aufgrund seiner stärkeren Affinität bevorzugt und stellt somit die wichtigste Form im Eisentransport dar, während die monoferrischen Varianten eine geringere funktionelle Bedeutung haben (Luck and Mason, 2012).

Im Blut bindet Transferrin bei physiologischem pH ($\sim 7,4$) mit hoher Affinität an den Transferrinrezeptor (TfR) auf der Oberfläche aller eisenhaltigen Zellen. Das diferrische Holo-Transferrin zeigt dabei die stärkste Bindung, doch auch die monoferrischen Formen binden noch stabil an den Rezeptor, während Apo-Transferrin nur schwach bindet. Nach

der Bindung wird der Komplex über clathrinabhängige Endozytose in die Zelle aufgenommen. Im Endosom sinkt der pH-Wert, wodurch das Eisen aus Transferrin freigesetzt und durch das Enzym Steap3 reduziert wird. Das eisenfreie Apo-Transferrin bleibt fest am Rezeptor gebunden und wird zusammen mit ihm zurück an die Zelloberfläche transportiert, wo es wieder ins Blut freigesetzt wird, um erneut Eisen aufzunehmen (Luck and Mason, 2012).

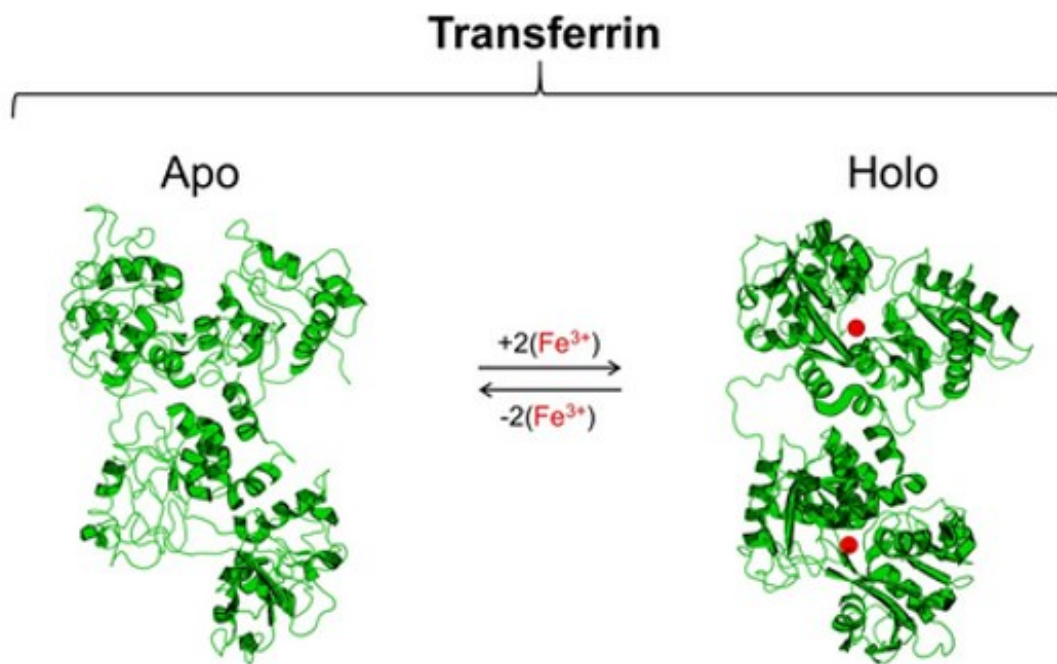


Abbildung 2: Darstellung der Holo- und Apo-Transferrin-Struktur auf Einzelmolekülebene

Abbildung der Apo- und Holo-Transferrin-Konformationen. (a) PDB-Modelle von Apo (PDB: 1RYX15) und Holo-Transferrin (PDB: 1JNF16). Transferrinmoleküle wechseln zwischen der Apo- und Holo-Form durch die Bindung und Freisetzung von Eisenionen (im Holo-Transferrin-Modell als rote Kugeln dargestellt). Die damit verbundene Konformationsänderung manifestiert sich durch das Auftreten von Spalten in den Lappen der Apo-Transferrinmoleküle. Quelle: Abbildung aus Ochner et al. (2023). „Imaging conformations of holo- and apo-transferrin on the single-molecule level by low-energy electron holography“. *Sci Rep.* 2023;13(1):10241. doi:10.1038/s41598-023-37116-x. Abbildung 1a, Seite 2. Die Abbildung steht unter der Creative Commons Lizenz CC BY 4.0 (Attribution 4.0 International) und ist frei zugänglich gemäß den Lizenzbedingungen unter <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/> (abgerufen am 16.06.2025).

1.3 Verwendung von Eisenpräparaten

Eisenmangel ist häufig die Folge von schweren chronischen Erkrankungen wie Herzinsuffizienz, Niereninsuffizienz, entzündlichen Darmerkrankungen, Blutungen im Magen-Darm-Bereich oder Krebs (Macdougall *et al.*, 2020). Er ist nach wie vor weit verbreitet und zählt zu den häufigsten Krankheiten der Weltbevölkerung. Besonders häufig tritt die Eisenmangelanämie beim weiblichen Geschlecht im fortpflanzungsfähigen Alter auf, vor allem während Schwangerschaften oder infolge von Blutverlusten durch den Menstruationszyklus. Auch in ärmeren Bevölkerungsschichten mit unzureichender Ernährung kommt es häufig zu Eisenmangelzuständen (Alleyne, Horne and Miller, 2008).

Eine gezielte Therapie ist wichtig, um Symptome wie Müdigkeit und Abgeschlagenheit zu minimieren und das Wohlbefinden des Patienten zu verbessern. Ein verminderter Eisenstatus kann den Verlauf chronischer Erkrankungen verschlimmern und sogar zu einer erhöhten Sterblichkeit führen. Daher ist es wichtig, einen Eisenmangel rechtzeitig zu therapieren (Macdougall *et al.*, 2020).

1.3.1 Orales Eisen

Die orale Route stellt nach wie vor die wichtigste Behandlungsform bei Eisenmangelanämie dar. Insbesondere wird Eisensulfat aufgrund seiner ausreichenden Bioverfügbarkeit und seiner nachweislichen Wirkungen, den Eisenbestand aufzufüllen, als bevorzugtes Mittel (Erstlinientherapie) verwendet (Elstrott *et al.*, 2020).

Orale Eisenpräparate enthalten im Allgemeinen eines von drei Eisensalzen: Eisensulfat, Eisengluconat oder Eisenfumarat. Eine Tablette Eisensulfat enthält dabei doppelt so viel Eisen wie die anderen beiden Formen, daher benötigt man bei Eisengluconat oder Eisenfumarat etwa doppelt so viele Tabletten. Es gibt nicht-magensaftresistente, magensaftresistente und Retardformulierungen. Magensaftresistente und Retardtabletten werden aufgrund ihrer besseren Verträglichkeit empfohlen, können aber weniger wirksam sein. Sie setzen das Eisen häufig nicht im Duodenum frei, wo die Aufnahme idealerweise stattfindet (Alleyne, Horne and Miller, 2008).

Für eine optimale Eisenabsorption ist ein saurer pH-Wert im Magen-Darm-Trakt erforderlich, da Eisen nur unter sauren Bedingungen gut löslich und resorbierbar ist. Daher sollte Eisen mit zeitlichem Abstand zu Antazida oder H₂-Blocker, die die Magensäure reduzieren, eingenommen werden. Auch bestimmte Lebensmittel wie Milch und säurehaltige Getränke (z.B. Softdrinks) können die Eisenaufnahme beeinträchtigen. Deshalb

sollten Eisentabletten idealerweise zwischen den Mahlzeiten oder vor dem Schlafengehen eingenommen werden, um die Aufnahme zu verbessern und die nachts besonders hohe Magensäure optimal zu nutzen (Alleyne, Horne and Miller, 2008).

Dennoch sind mit der oralen Therapie häufig Nebenwirkungen verbunden, die vor allem den Magen-Darm-Trakt betreffen. Verstopfungen und Durchfälle zählen dabei zu den häufigsten Beschwerden, die dazu führen, dass Patienten die Behandlung unregelmäßig einnehmen oder sogar abbrechen, was die Wirksamkeit der Therapie beeinträchtigen kann (Kumar *et al.*, 2022).

1.3.2 Intravenöse Eisenpräparate

Eine alternative Behandlungsmöglichkeit ist die intravenöse Gabe, die bei manchen Patienten bevorzugt wird. Sie führt zu einer schnelleren Verbesserung der Hämoglobinwerte und verursacht insgesamt weniger Nebenwirkungen. Insbesondere werden die unerwünschten Wirkungen im Magen-Darm-Bereich minimiert, da das Eisen direkt ins Blut verabreicht wird. Ein weiterer wichtiger Vorteil ist die Patienten-Compliance, da die Gabe direkt vom Arzt durchgeführt wird (Kumar *et al.*, 2022).

Intravenöses Eisen soll vor allem bei Patienten mit entzündlichen Darmerkrankungen, starkem Blutverlust, fortgeschrittener Nierenerkrankung oder bei Unverträglichkeit gegenüber oralen Präparaten verwendet werden (Elstrott *et al.*, 2020).

Für die intravenöse Behandlung stehen verschiedene Präparate zur Verfügung, die sich vor allem in ihrer Infusionsdauer unterscheiden. Dabei wird Monofer (Ferric-Derisolmatose) besonders aufgrund seiner einmaligen und kurzen Infusion bevorzugt. Ferinject (Ferric-Carboxymaltose) kann als Einzeldosis innerhalb kurzer Zeit verabreicht werden, jedoch können bei manchen Patienten zwei Infusionen notwendig sein. Venofer (Eisensaccharose) erfordert mehrere Infusionen pro Woche, was für Patienten belastender sein kann (Kumar *et al.*, 2022).

1.3.3 Venofer

Die Gabe von intravenösen Eisenpräparaten hat zur Folge, dass die Schutzmechanismen des Körpers umgangen werden. Dabei kann freies Eisen entstehen, das toxische Eigenschaften besitzt. Ungebundenes Eisen begünstigt die Entstehung von Sauerstoffradikalen (Hydroxylradikalen) und führt zu einer sogenannten Sauerstofftoxizität. Dadurch kann das Wachstum krankhafter Zellen gefördert werden. Weiters kann es die Durchlässigkeit der Zellmembran beeinträchtigen und zur Zerstörung von Zellen führen. Daher ist es wichtig, vor Beginn einer intravenösen Eisentherapie den Eisenstatus des Patienten

genau zu bestimmen und nicht nur auf den Hämoglobinwert zu achten. Darüber hinaus sollte das anzuwendende Präparat langsam verabreicht werden, um hohe Spiegel von freiem Eisen zu vermeiden (Perewusnyk *et al.*, 2002).

Eine mögliche Behandlung stellt die intravenöse Gabe des Eisensaccharats Venofer dar. Venofer hat eine relativ kurze Halbwertszeit (5.3 ± 1.6 h) und auch die Gesamtkörperclearance zeigt, dass es rasch aus dem Blut entfernt wird (1.23 ± 0.22 L/h). Das Eisen verteilt sich hauptsächlich in Leber, Milz und Knochenmark und wird vorwiegend für die Bildung roter Blutkörperchen genutzt (Macdougall *et al.*, 2020).

Eisensaccharose (Venofer) führt zu einer Korrektur des Eisenmangels, indem es den Eisenstatus verbessert. Sie verbessert den Ferritinwert und die Transferrinsättigung (TSAT) und trägt zu einer Erhöhung der Hämoglobinwerte bei. Venofer kann sowohl allein als auch in Kombination mit Erythropoese-stimulierenden Substanzen (ESA) angewendet werden. Bei gemeinsamer Gabe von Venofer und ESA kann die Dosis von ESA reduziert werden (Macdougall *et al.*, 2020).

1.4 Hintergrund zur Wahl der experimentellen Methode

In diese Arbeit wurden für die Untersuchung der Eisenbindung an Transferrin zwei grundlegende Methoden verwendet. Für die Analyse kam eine Harnstoff-Gelelektrophorese zum Einsatz, um die Transferrin-Formen je nach Eisenbeladung zu trennen. Zusätzlich wurde bei der Probenvorbereitung vor der Harnstoffelektrophorese eine Rivanolfällung angewendet, um mögliche störende Proteine zu entfernen.

1.4.1 Proteinfällung mit Rivanol

Erste Studien von Davy und Kollegen (Davy *et al.*, 1982) zeigten, dass Transferrin durch Elektrophorese aufgetrennt werden kann. Bei den ersten Untersuchungen von Probandenserum zeigten sich jedoch bei der Trennung von Transferrin mittels Harnstoff-Gelelektrophorese zahlreiche störende Banden, die die Auswertung erschwerten. Zur Reduzierung dieser störenden Faktoren wurde eine Rivanolfällung durchgeführt, wodurch die meisten Serumproteine, mit Ausnahme von Transferrin, ausgefällt wurden. Im Überstand befand sich das Transferrin, das anschließend mittels Harnstoff-Gelelektrophorese eindeutiger aufgetrennt werden konnte. Durch die anschließende Färbung und densitometrische Auswertung konnten die verschiedenen Transferrin-Formen gut quantifiziert werden (Davy *et al.*, 1982).

Bei der Auswertung der Gele konnten sechs Banden erfasst werden. Eine davon war breiter und befand sich nahe der Auftragsstelle am Gel. Diese Bande konnte dem Immunglobulin (IgG) zugeordnet werden. Mit einer geeigneten Nachweismethode konnten vier Banden eindeutig, als Transferrin identifiziert werden. Die sechste Bande sowie zusätzlich schwach auftretende Banden konnten nicht bestimmt werden. Die Untersuchungen von Davy und Kollegen zeigten, dass die Kombination aus Rivanolfällung und Harnstoff-Gelelektrophorese eine geeignete Methode zur Trennung der Transferrin-Formen aus Serumproben darstellt (Davy *et al.*, 1982).

1.4.2 Transferrin in Harnstoffgelen

In ihrem wissenschaftlichen Artikel berichten Evans und Williams, dass Makey & Seal bereits 1976 zeigen konnten, dass unterschiedlich stark mit Eisen beladene humane Transferrine in 6 M Harnstoff-Gelen in vier Banden aufgetrennt werden können. Die bei der Elektrophorese im Gel am wenigsten weit gelaufene Bande entspricht Apo-Transferrin (ohne Eisen), die am weitesten migrierende Bande entspricht Holo-Transferrin und dazwischen liegen zwei Banden, die den monoferrischen Formen entsprechen (Evans and Williams, 1980). In dem Artikel berichten Evans & Williams weiter, dass sie bereits 1978 nachweisen konnten, dass die langsamere monoferrische Bande dem C-terminalen Transferrin und die schnellere Bande dem N-terminalen Transferrin entspricht (Evans and Williams, 1980).

Die Elektrophorese in Polyacrylamid-Gelen mit Harnstoff wird verwendet, um verschiedene Transferrin-Formen mit unterschiedlichem Eisengehalt zu trennen. Die Auftrennung von Transferrin in Harnstoffgelen beruht auf zwei Effekten: Erstens sind die Komplexe aus Eisen und Transferrin relativ stabil gegenüber Harnstoff. Zweitens entfalten sich die beiden Proteinbereiche (C- und N-Domäne) von Transferrin nicht gleich schnell, was die Geschwindigkeit beeinflusst, mit der sie im Gel wandern (Evans and Williams, 1980).

1.5 Ziel der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit war die Optimierung einer zuverlässigen Methode zur Bestimmung von Transferrin-gebundenem Eisen, insbesondere unter Berücksichtigung der Einflüsse kolloidaler Eisennanopartikel. Dabei wurde ein Serum erstellt, das einem Eisenmangelzustand beim Patienten entspricht, indem normales humanes Serum mit Apo-Transferrin (eisenfreie Form von Transferrin) versetzt wurde. Zusätzlich wurde der Einfluss von Zeit und Temperatur auf die Beladung von Transferrin mit Eisen analysiert, um optimale Bedingungen für eine präzise Messung zu definieren.

Die Ergebnisse dieser Arbeit sollen zur Verbesserung der Messgenauigkeit in der klinischen Diagnostik beitragen und somit eine verlässlichere Bewertung des Eisenstatus bei Patienten während einer intravenösen Eisengabe ermöglichen.

2 Materialien und Methoden

2.1 Harnstoff-Gelelektrophorese

2.1.1 Materialien und Lösungen

20x Tris-Borat-Puffer, pH 8,4

Zur Herstellung eines Elektrophorese Puffers (2 M Tris, 0,2 M Borsäure, pH 8,4) wurden folgende Substanzen eingewogen und in 200ml destilliertem Wasser gelöst:

- 60,57 g Tris (Tris(hydroxymethyl)aminomethane) (MW 121,14) (Merck)
- 3,09 g Borsäure (Merck)

Der pH wurde zuerst grob mit 6 M HCl und anschließend mit 1 M HCl auf genau 8,4 eingestellt. Anschließend wurde auf ein Endvolumen von 250 ml mit destilliertem Wasser aufgefüllt. Die Lagerung erfolgte bei 4 °C (Küleeq 0/15 °).

1x Tris-Borat-Puffer, pH 8,4

Die Herstellung des 1x Tris-Borat-Puffer erfolgte durch Verdünnen des 20x Tris-Borat-Puffer, pH 8,4, mit destilliertem Wasser. 50 ml 20x Tris-Borat-Puffer wurden in einen 1000 ml Messzylinder übergeführt und auf ein Endvolumen von 1000 ml mit destilliertem Wasser aufgefüllt. Mit Hilfe eines Magnetrührers (Framo-Gerätetechnik M20/1) wurde die Mischung für 5 Minuten gerührt.

8 M Harnstoff (für 8 Gele)

28,8 g Harnstoff (SigmaUltra) wurden ad 60 ml mit destilliertem Wasser aufgefüllt. Zur vollständigen Lösung wurde die Mischung in einem 37 °C warmen Wasserbad unter regelmäßigem Schütteln gelöst.

10 % Ammoniumpersulfat (APS)

1 g Ammoniumpersulfat (Sigma) wurden auf ein Endvolumen von 10 ml mit destilliertem Wasser aufgefüllt. Die Lösung wurde portioniert, darauffolgend bei -20 °C gelagert und direkt vor der Verwendung aufgetaut.

Tetramethylethyldiamin (TEMED)

Tetramethylethyldiamin (TEMED) (Bio-Rad)

Gellösung für 2 Gele

15 ml 8 M Harnstoff

1 ml 20 x Tris-Borat-Puffer, pH 8,4

4 ml Acrylamid 30 % (29:1) (Roth)

Direkt vor dem Gießen Zusatz von:

100 µl 10 % APS (Ammoniumpersulfat in H₂O)

10 µl TEMED (Bio-Rad)

APS und TEMED dienten als Radikalstarter und wurden unter dem Abzug direkt vor dem Gießen der Gele zugegeben. Die Polymerisation erfolgte anschließend innerhalb von 30 Minuten bei Raumtemperatur.

2.1.2 Gießen der Gele

2.1.2.1 Materialien

Doppelgießvorrichtung

Mighty Small SE 245 Dual Gel Caster (Hoefer Scientific Instruments).

Klemmenbaugruppe

(Hoefer Scientific Instruments)

Platten

Es wurden pro Gel jeweils eine Glasplatte (10x 8 cm) und eine Aluminiumplatte (10 x 8 cm) verwendet (Hoefer Scientific Instruments).

T-Abstandhalter (Spacer)

Pro Gel wurden jeweils zwei 1,5 mm Spacer verwendet (Hoefer Scientific Instruments)

Kämme

Pro Gel wurde ein 1,5 mm Kamm verwendet (Hoefer Scientific Instruments).

Federklemmen

Pro Gel wurden zwei Federklammern benötigt (Hoefer Scientific Instruments).

2.1.2.2 Durchführung

Vorbereitung

Zur Entfernung von Fettrückständen, sowie anderen Störfaktoren, wurde die ganze Apparatur, inklusive der Gläser, Kämme und Spacer mit 70 - prozentigem Ethanol gereinigt.

Die Spacer wurden zwischen eine Glas- und eine Aluminiumplatte gelegt, sodass ein sogenannter Sandwichhalter entstand. Dieser besteht aus den beiden Platten und den Abstandshaltern (Spacer), die gemeinsam den Gießraum für das Gel bilden. Der Sandwichhalter wurde in die Klemmbaugruppen geschoben und anschließend in der Doppelgießvorrichtung fixiert. Seitlich wurden pro Gel zwei Schrauben montiert, um die Abdichtung zu verbessern. Der Aufbau der Kämme, Platten und Spacer (links) sowie das Einsetzen der Sandwichhalterung und das Fixieren der Schrauben (rechts) sind in Abbildung 3 dargestellt.

Die Dichtigkeit der Vorrichtung wurde mit 70-prozentigem Ethanol überprüft. Nach positiver Beurteilung wurde das Ethanol entfernt und die Kämme eingesetzt.

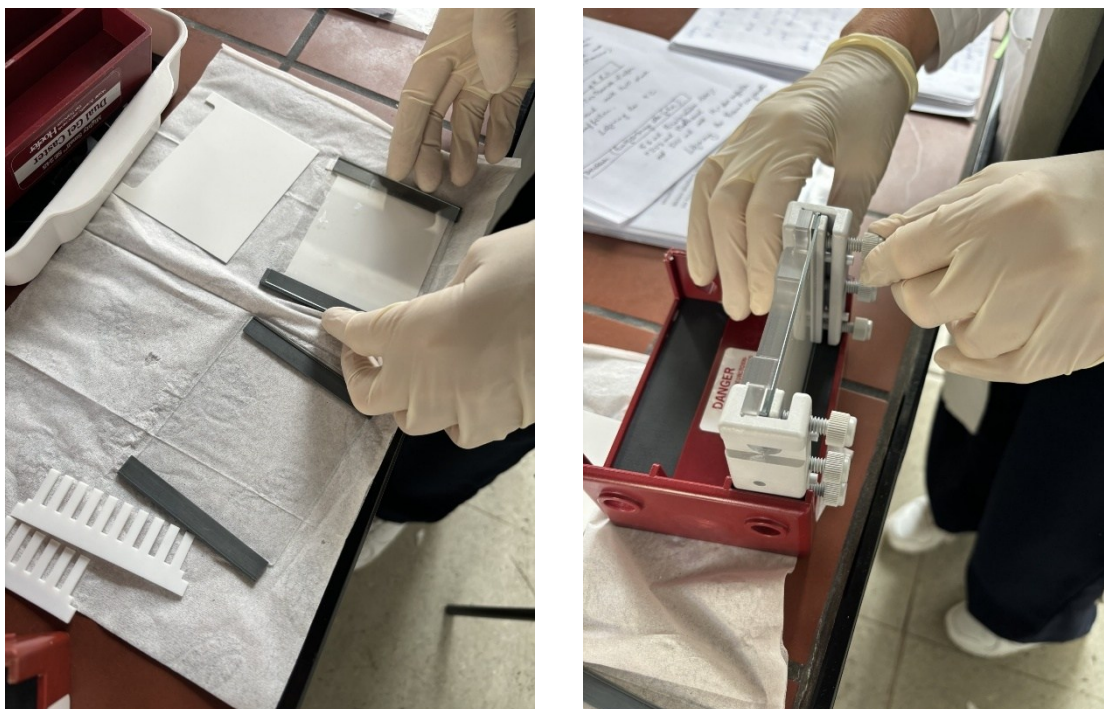


Abbildung 3: Aufbau der Doppelgießvorrichtung Mighty Small SE 245 Dual Gel Caster (Hoefer Scientific Instruments).

Links: Kämme, Spacer und Platten vor dem Einsetzen in die Vorrichtung

Rechts: Eingesetzter Sandwichhalter und Fixieren der Befestigungsschrauben

Quelle: Eigene Aufnahme (Sejla Z.)

Gele gießen

Das Gießen der Gele erfolgte mit einer 5 ml Gilson Pipette, wobei die Pipettenspitze zwischen die beiden Platten des Sandwichhalters geschoben wurde. Das Gel wurde bis zum Kamm aufgefüllt und der Vorgang wurde so lange wiederholt, bis sich das Gel nicht mehr absetzte. Die Apparatur mit den gegossenen Gelen wurde zunächst bei Raumtemperatur bis zur Polymerisation stehen gelassen und anschließend im Kühlschrank, (Küleq 0/15 °) über Nacht bei 4 °C gelagert.

Anschließend wurden die Kämmе rausgezogen und die Apparatur wurde mit 1x Tris-Borat-Puffer (pH 8,4) aufgefüllt. Die Doppelgießvorrichtung mit fixierten Sandwichhaltern und gegossenen Gelen ist in Abbildung 4 dargestellt.

2.1.3 Elektrophorese

2.1.3.1 Materialien

Elektrophorese-Deckel mit Hochspannungskabeln

Mighty Small II SE250 (Hoefer Scientific Instruments)

Obere Pufferkammer

(Hoefer Scientific Instruments)

Untere Pufferkammer

(Hoefer Scientific Instruments)

Federklemmen

Pro Gel wurden zwei Federklammern benötigt (Hoefer Scientific Instruments).

Weißе Auffangwanne

Die Wanne wurde für einen besseren Halt der Apparatur verwendet.

Stromvorrichtung

Power-Pac Basic, 300 V 400 mA 75 W (Bio-Rad)

2.1.3.2 Durchführung des Pre-Runs

Die beiden Gele, inklusive der Platten und Spacer, wurden in die Elektrophorese-Apparatur geschoben und mit Hilfe von Federklemmen fixiert. Die Kammern wurden mit 1x Tris-Borat-Puffer (pH 8,4) (= Elektrophorese-Puffer) aufgefüllt. Zur Entfernung von Störfaktoren, wie Rückständen ausgefällter Chemikalien, wurden die Geltaschen mehrmals

mit Elektrophorese-Puffer ausgespült. Dabei wurde eine 10 ml Spritze mit 20G Kanüle (Braun) verwendet. Anschließend erfolgte der Pre-Run. Die Apparatur mit dem darin befindlichen Gel wurde für 30 Minuten bei konstanter Spannung von 120 V an die Stromvorrichtung angeschlossen. Die Durchführung erfolgte in einem Kühlschrank bei 4 °C (Küleq 0/15 °). Der Vorlauf der Elektrophorese-Apparatur im Kühlschrank ist in Abbildung 4 (links) dargestellt.

2.1.3.3 Probenauftrag

Nach Beendigung des Pre-Runs wurden die Geltaschen erneut mit Elektrophorese-Puffer gespült, mithilfe einer 10 ml Spritze mit 21G Kanüle. Anschließend wurden in die ersten 7 Lanes (Auftragstaschen) jeweils 35 µl Probe aufgetragen. In die 8. Lane wurden 23 µl Holo-Transferrin, in die 9. Lane 23 µl Apo-Transferrin und in die 10. Lane 26 µl einer Mischung aus Holo- und Apo-Transferrin aufgetragen. Die Kammern wurden mit Elektrophorese-Puffer aufgefüllt.

2.1.3.4 Run

Der Run der Gele erfolgte in einem Kühlschrank bei 4 °C (Küleq 0/15 °). Dabei wurde die Elektrophorese-Apparatur für 120 Minuten bei konstanter Spannung von 150 V an die Stromvorrichtung angeschlossen. Der Aufbau während des Laufs ist in Abbildung 4 (rechts) dargestellt. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde der Puffer ausgeleert und die Platten von unten aus der Vorrichtung gedrückt. Die Platten wurden vorsichtig voneinander getrennt und zur späteren Orientierung wurde am Gel unten rechts eine Ecke abgeschnitten.

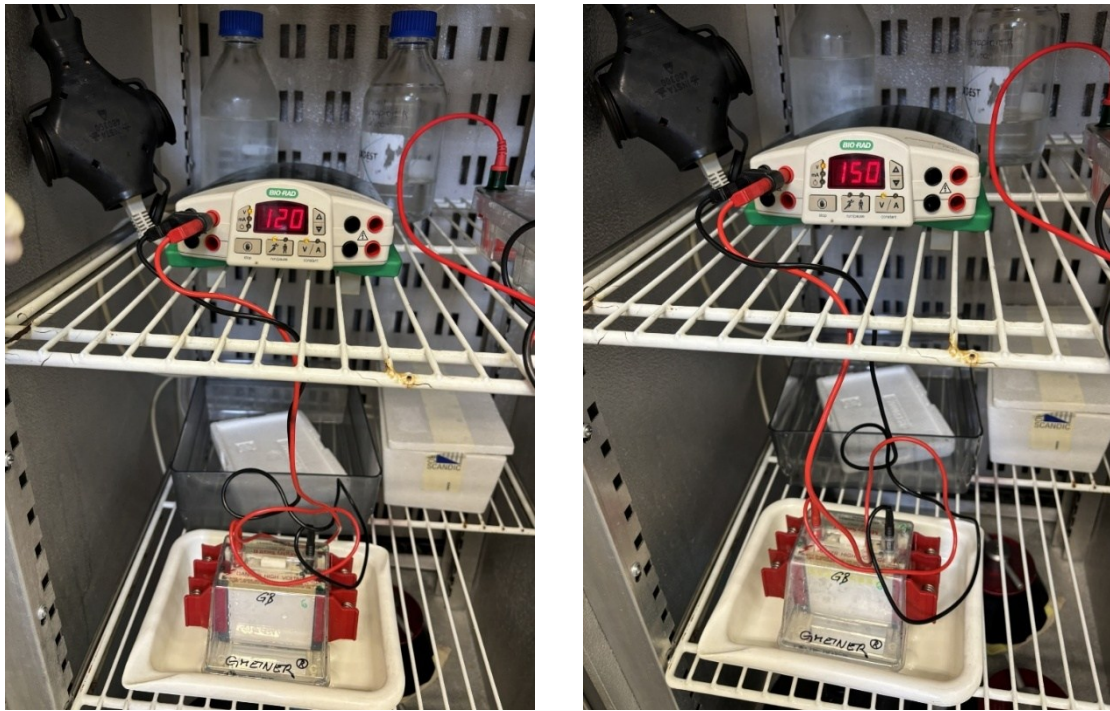


Abbildung 4: Elektrophorese-Apparatur während des Pre-Runs bei 120 V (links) und während des Runs bei 150 V (rechts) im Kühlschrank (4 °C).

Quelle: Eigene Aufnahme (Sejla Z.)

2.1.4 Färben der Gele

2.1.4.1 Materialien

Rotationsschüttler

Belly Dancer (Stovall)

Plastikschale mit Deckel

(IKEA)

Schwamm

Der Schwamm wurde in kleine Stücke geschnitten und zusammen mit dem Gel und der Entfärbelösung in die Plastikschale gelegt. Er diente zur Adsorption von Farbstoffpartikeln aus der Lösung

Amido Black 10B-Färbelösung

5 mg Amido Black 10B (BioRad)

in Methanol:Wasser:Essigsäure = 4:4:1

222 ml Methanol (Merck)

56 ml Essigsäure (100 %) (Merck)

ad 500 ml destilliertes Wasser

Entfärbelösung (Destain-Lösung)

Methanol:Wasser:Essigsäure = 4:4:1

222 ml Methanol (Merck)

56 ml Essigsäure (100 %) (Merck)

ad 500 ml destilliertes Wasser

222 ml Methanol wurden in einen 500 ml-Messzylinder gegeben und mit destilliertem Wasser auf 400 ml aufgefüllt. Anschließend wurden 56 ml Essigsäure langsam zugegeben und mit destilliertem Wasser auf 500 ml aufgefüllt.

2.1.4.2 Durchführung

Das Gel wurde von der Glasplatte gelöst und in die Plastischale gegeben. Anschließend wurde es mit 15 ml Amido Black 10B-Färbelösung überschüttet und für 5 Minuten am Belly Dancer inkubiert. Nach der Färbung wurde die Lösung verworfen und die Entfärbelösung zum Gel gegeben. Dabei wurden auch die klein geschnittenen Schwämme zugegeben, die der schnelleren und besseren Entfärbung dienten. Die Entfärbung erfolgte über Nacht auf dem Belly Dancer. Nach der Entfärbung wurde die verbrauchte Destain-Lösung mittels Aktivkohlefiltration aufbereitet, um sie erneut verwenden zu können (siehe Abbildung 5). Danach wurden die Gele densitometrisch ausgewertet.

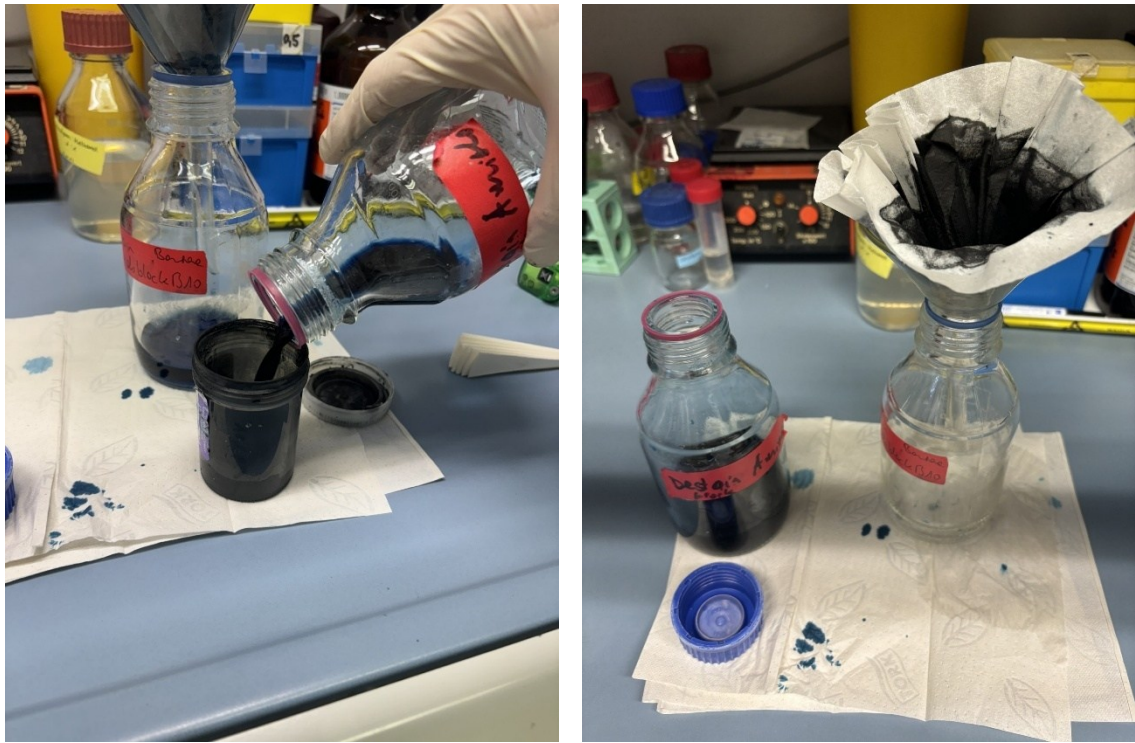


Abbildung 5: Filtration der gebrauchten Destain-Lösung mit Aktivkohle

Quelle: Eigene Aufnahme (Sejla Z.)

2.1.5 Fotodokumentation

2.1.5.1 Materialien

Folienbeutel transparent

SEKUROKA® aus PP, 40 µm (Roth, Lactan)

Kamera

Smartphone Kamera Huawei P 30-Lite mit Objektivreihe bestehend aus drei Objektiven: 48.0 MP, f / 1.8, Phasenvergleich-AF, LED-Blitz, Videos @1080 p / 60 fps (Kamera 1); 8.0 MP, Weitwinkelobjektiv (Kamera 2); 2.0 MP, Tiefenschärfe (Kamera 3); Betriebssystem: EMUI 12

2.1.5.2 Durchführung

Die Gele wurden aus der Plastischale entnommen und in transparente Folienbeuten (Sekuroka) gelegt. Bis zur weiteren Dokumentation wurden sie beschriftet und in einem Kühlschrank bei 4 °C (Küleq 0/15 °) gelagert.

Zur Aufnahme der Gele diente ein weißer Papierhintergrund. Dabei wurden die Folienbeutel mit den darin befindlichen Gelen auf das Papier gelegt und es wurde mit einer Smartphone-Kamera ein Foto aufgenommen.

2.1.6 Densitometrische Auswertung

2.1.6.1 Materialien

AlphaEase FC™, Version 3.2.1 (Alpha Innotech Corporation)

Excel (Microsoft)

GraphPad Prism 5 (GraphPad Software)

2.1.6.2 Durchführung

Die Gele wurden anhand der angefertigten Fotos mittels der Software AlphaEase FC™, Version 3.2.1 (Alpha Innotech Corporation) densitometrisch ausgewertet. Bei der Auswertung erhält man den prozentuellen Anteil von Apo-Transferrin, Holo-Transferrin und mo-noferrischem Transferrin in Bezug auf das gesamte Transferrin in den einzelnen Proben. Folgende Einstellungen im Programm AlphaEase FC™ wurden zur Auswertung der Gelfotos verwendet:

ENHANCEMENT TOOLS: CONTRAST AJUSTMENT: EQUAL

ANALYSIS TOOLS: SPOT DENSO

OBJECT: RECTANGLE

AUTO BKGD

INVERT

Die im Programm AlphaEase FC™ erhaltenen Daten wurden in MS-Excel übertragen. Für das Anfertigen von Grafiken wurde das Programm GraphPad Prism 5 (GraphPad Software) verwendet. Der prozentuelle Anteil der Transferrin-Untertypen wurde mithilfe von Balkendiagrammen oder Punktediagrammen grafisch dargestellt.

2.2 Vorversuch Spiken des Serums mit Apo-Transferrin

Da das Serum (von Sigma) von gesunden Probanden ohne Eisenmangel stammt, wurde in Vorversuchen ermittelt, ob durch Zugabe von Apo-Transferrin ein Serum mit einer Transferrinsättigung erzeugt werden kann, wie sie typischerweise bei Patienten mit Eisenmangel vorkommt. Ziel war es, ein Serum zu erhalten, das besser mit der Zielgruppe der Eisentherapie korreliert. Dazu wurde Serum mit unterschiedlichen Konzentrationen von Apo-Transferrin gespikt. Anschließend wurden die verschiedenen eisenbeladenen Transferrinspezies mittels Harnstoff-Gelelektrophorese aufgetrennt und densitometrisch ausgewertet, um eine optimale Spike-Konzentration für weitere Experimente zu bestimmen.

2.2.1 Materialien

Humanes Serum S1M (von Sigma)

Für diese Arbeit wurde gepooltes Serum von gesunden Probanden bei der Firma Sigma, Österreich gekauft.

Apo-Transferrin

Für die Herstellung der Proben P1-P6 wurden 5 mg Apo-Transferrin (Sigma) in 5 ml destilliertem Wasser gelöst. Für die Herstellung der Proben P11-P16 wurden 10 mg Apo-Transferrin in 10 ml destilliertem Wasser gelöst.

Rivanol-Fällungsreagenz 0,6 %

Es wurden 30 mg Rivanol (6,9-Diamino-2-Ethoxy-Acridine Lactate) (Sigma) in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß eingewogen und in 5 ml 1x Tris-Borat-Puffer (pH 8,4) gelöst.

Destilliertes Wasser

Glycerol

Glycerol > 99 % (Merck)

2.2.2 Ansatz

In den nachfolgenden Tabellen sind die Ansätze für die Inkubationen angeführt.

Tabelle 1: Ansatz 1 – Mischung von Serum mit Apo-Transferrin (5 mg/ml) und destilliertem Wasser für die Proben P1 – P6 (Vorversuch Spiking).

	Serum	Apo-Transferrin (5 mg/ml)	Destilliertes Wasser
P1	40 µl	10 µl	-
P2	40 µl	8 µl	2 µl
P3	40 µl	6 µl	4 µl
P4	40 µl	4 µl	6 µl
P5	40 µl	2 µl	8 µl
P6	40 µl	-	10 µl

Tabelle 2: Ansatz 1 – Mischung von Serum mit Apo-Transferrin (10 mg/ml) und destilliertem Wasser für die Proben P11 – P16 (Vorversuch Spiking).

	Serum	Apo-Transferrin (10 mg/ml)	Destilliertes Wasser
P11	40 µl	10 µl	-
P12	40 µl	8 µl	2 µl
P13	40 µl	6 µl	4 µl
P14	40 µl	4 µl	6 µl
P15	40 µl	2 µl	8 µl
P16	40 µl	-	10 µl

2.2.3 Durchführung

Zu 40 µl Probe (P1 bis P6 und P11 bis P16, siehe Tabelle 1 und Tabelle 2), wurden 140 µl Rivanol-Fällungsreagenz und 20 µl Glycerin zugesetzt. Anschließend wurden die Proben auf dem Vortex (R Labinco „524“) gut durchgemischt, 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und danach in einer Zentrifuge (Eppendorf Centrifuge 5415 D) 5 Minuten bei 5000 rpm zentrifugiert. Die ausgefällten Proteine befanden sich anschließend als Präzipitat am Boden der Eppendorf-Gefäße.

Vom Überstand (Supernatant) wurden 35 µl in ein neues Eppendorf Gefäß überführt, auf dem Vortex (R Labinco „524“) gemischt und anschließend für 1 Minute lang in einer Eppendorf-Tischzentrifuge (Eppendorf Tisch-Zentrifuge 5450) bei 3000 rpm zentrifugiert, um an der Gefäßwand haftende Tropfen der Probe herunterzuschleudern. Die Proben wurden bis zum Auftrag auf das Gel zur Seite gestellt und es wurde mit der Herstellung der Vergleichsproben fortgefahren, die auf demselben Gel aufgetragen wurden.

2.3 Vergleichsproben für die Harnstoff-Gelelektrophorese

2.3.1 Materialien

Apo-Transferrin

Humanes Apo-Transferrin (Sigma)

Holo-Transferrin

Humanes Holo-Transferrin (Sigma)

Rivanol-Fällungsreagenz 0,6 %

Es wurden 30 mg Rivanol (6,9-Diamino-2-Ethoxy-Acridine Lactate) (Sigma) in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß eingewogen und in 5 ml 1x Tris-Borat-Puffer, pH 8,6, gelöst.

Glycerin

Glycerol >99 % (Merck)

2.3.2 Durchführung

Apo-Transferrin

in ein Eppendorf Gefäß wurden pipettiert:

3 µl Apo-Transferrin (5 mg/ml in destilliertem Wasser)

15 µl Rivanol-Fällungsreagenz 0,6 %

5 µl Glycerin

Holo-Transferrin

in ein Eppendorf Gefäß wurden pipettiert:

3 µl Apo-Transferrin (5 mg/ml in destilliertem Wasser)

15 µl Rivanol-Fällungsreagenz 0,6 %

5 µl Glycerin

Apo-Transferrin + Holo-Transferrin

in ein Eppendorf Gefäß wurden pipettiert:

3 µl Apo-Transferrin (5 mg/ml in destilliertem Wasser)

3 µl Holo-Transferrin (5 mg/ml in destilliertem Wasser)

15 µl Rivanol-Fällungsreagenz 0,6 %

5 µl Glycerin

2.3.3 Harnstoff-Gelelektrophorese

Die einzelnen Geltaschen wurden mit 1x Tris-Borat-Puffer mithilfe einer 10 ml Spritze und 21G Kanüle durchgespült und die Kammern danach mit Puffer vollständig aufgefüllt. Das Gel wurde ohne Proben einem Pre-Run bei 4 °C (Küleq 0/15 °) für 30 Minuten bei einer konstanten Spannung von 120 V unterzogen. Nach Beendigung des Pre-Runs wurde der Puffer entleert. Vor dem Auftragen auf das Gel wurden alle Ansätze (P1 – P6, P11 – P16, Apo-Transferrin, Holo-Transferrin, Apo-Transferrin + Holo-Transferrin) auf dem Vortex (R Labinco „524“) gut durchmischt und für 1 Minute in einer Eppendorf-Tischzentrifuge (Eppendorf Tisch-Zentrifuge 5450) bei 3000 rpm zentrifugiert, um an den Seitenwänden haftende Flüssigkeit abzuschleudern. Die Proben wurden mit Gellade-Pipettenspitzen mit langer, dünner Spitze in die Geltaschen aufgetragen.

2.3.3.1 Probenauftrag

Tabelle 3: Probenaufteilung der gespikten Proben P1 – P6 mit den Vergleichsproben (Apo-Tf, Holo-Tf, Apo-Tf + HoloTf)

Apo-Tf	P1	P2	P3	P4	P5	P6	Apo-Tf +Holo-Tf	Holo-Tf	X
--------	----	----	----	----	----	----	--------------------	---------	---

Tabelle 4: Probenaufteilung der gespikten Proben P11 – P16 mit den Vergleichsproben (Apo-Tf, Holo-Tf, Apo-Tf + HoloTf)

Apo-Tf	P1	P2	P3	P4	P5	P6	Apo-Tf +Holo-Tf	Holo-Tf	X
--------	----	----	----	----	----	----	--------------------	---------	---

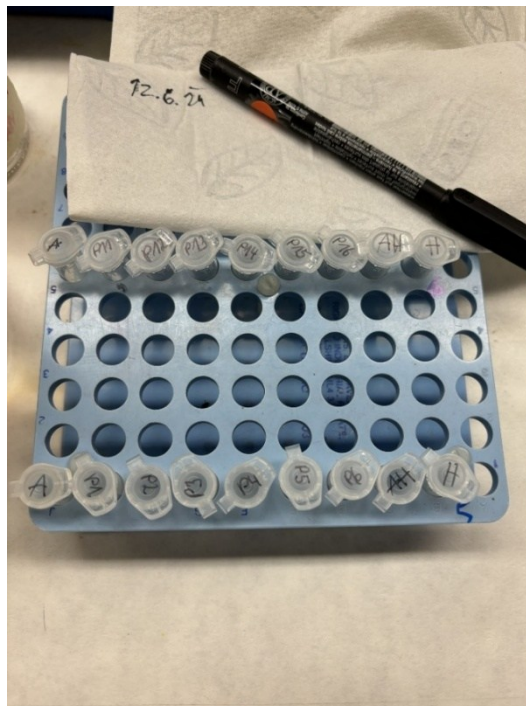


Abbildung 6: Beschriftete Eppendorf-Gefäße (P1 – P6 und P11 – P16) mit gespikten Proben sowie Vergleichsproben (Apo-Tf, Holo-Tf, Apo-Tf + HoloTf).

Quelle: Eigene Aufnahme (Sejla Z.)

2.3.3.2 Run

Die Gele wurden einem Run von 120 Minuten bei einer konstanten Spannung von 150 V bei 4 °C (Külee 0/15 °) unterzogen. Danach wurden die Platten aus der Vorrichtung von unten herausgedrückt und voneinander getrennt, sodass das Gel auf einer der beiden Platten blieb. Zur späteren Orientierung wurde am unteren rechten Eck des Gels die Ecke abgeschnitten.

2.3.3.3 Färben und Entfärben der Gele

2.3.3.3.1 Materialien

Rotationsschüttler

Belly Dancer (Stovall)

Plastikschale mit Deckel

(IKEA)

Schwamm

Der Schwamm wurde in kleine Stücke geschnitten und zusammen mit dem Gel und der Entfärbelösung in die Plastikschale gelegt. Er diente dem Adsorbieren des Farbstoffs aus der Entfärbungslösung (Bauhaus).

Amido Black 10B-Färbelösung

5 mg Amido Black 10B (BioRad)

in Methanol:Wasser:Essigsäure = 4:4:1

222 ml Methanol (Merck)

56 ml Essigsäure (100 %) (Merck)

ad 500 ml destilliertes Wasser

Entfärbelösung (Destain-Lösung)

Methanol:Wasser:Essigsäure = 4:4:1

222 ml Methanol (Merck)

56 ml Essigsäure (100 %) (Merck)

ad 500 ml destilliertes Wasser

2.3.3.3.2 Durchführung

Das Gel wurde von der Platte gelöst und in eine Plastischale (IKEA) mit 15 ml Amido Black 10B-Färbelösung gelegt. Auf dem Belly Dancer (Stovall) wurde es für 10 Minuten gefärbt und anschließend wurde die Färbelösung entfernt. Danach wurden 15 ml Entfärbungslösung hinzugefügt und zur Entfernung des überschüssigen Farbstoffes aus der Entfärbungslösung wurden 3–4 kleine Schwämme in die Lösung gegeben. Die Entfärbung erfolgte über Nacht auf dem Belly Dancer (Stovall). Nach Abschluss der Entfärbung wurde das Gel in transparente Folienbeutel gelegt.

Die Bildaufnahme erfolgte mit einer Smartphonkamera. Zur besseren Darstellung wurde ein weißer Leuchtschirm verwendet. Anschließend erfolgte eine densitometrische Auswertung mittels AlphaEase FC™, Version 3.2.1 (Alpha Innotech Corporation) Software.

2.4 Gewinnung der Proben zur Bestimmung der Zeit und Temperaturabhängigkeit der Eisenbeladung von Transferrin

Die Inkubation des Serums mit Venofer (Fe-Saccharat) erfolgte bei einer pharmakologisch relevanten Eisenkonzentration. Dabei wurde die zu erwartende Plasmakonzentration bei Patienten nach Gabe der maximal empfohlenen Einzeldosis von 200 mg Venofer eingesetzt. Die Inkubation wurde für 15 Minuten bei 37 °C durchgeführt. Anschließend wurde der Einfluss der Parameter Temperatur und Zeit nach der Probennahme auf die Transferrin-Beladung untersucht.

2.4.1 Materialien

Serum

Humanserum von gesunden Probanden (von Sigma)

Apo-Transferrin

Humanes Apo-Transferrin (Sigma)

Rivanol-Fällungsreagenz 0,6 %

Es wurden 30 mg Rivanol (6,9-Diamino-2-Ethoxy-Acridine Lactate) (Sigma) in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß eingewogen und in 5 ml 1x Tris-Borat-Puffer, pH 8,6, gelöst.

Venofer

(Vifor, Schweiz)

Eisenkonzentration in der Ampulle: 20 mg/ml

Das Verteilungsvolumen für intravenöse Eisenpräparate entspricht etwa dem Plasmavolumen (Geisser and Burckhardt, 2011).

Das Plasmavolumen kann für einen Patienten in Abhängigkeit von Geschlecht, Körpergewicht, Körpergröße und Hämatokrit berechnet werden (Sprenger *et al.*, 1987).

Für die Berechnung der Plasmakonzentration wurde in dieser Arbeit einheitlich ein Verteilungsvolumen von 3,5 Liter angenommen. Bei einer Einzeldosis von 200 mg Eisensaccharat ergibt sich demnach eine Plasmakonzentration des Präparats von rund 57,14 mg Eisen/ml oder 2,857 µg / 50 µl Plasma bzw. Serum. Diese Konzentration an Venofer wurde bei den Versuchen in dieser Studie eingesetzt.

0,9 % NaCl

Kochsalzlösung isoton (Fresenius)

Glycerin

Glycerol > 99 % (Merck)

2.4.2 Ansätze

Tabelle 5: Ansätze der Probenmischungen für die Inkubation mit intravenösem Eisen (Venofer)

Ansatz	Serum (µl)	Apo-Tf (10 mg/ml) (µl)	0,9 % NaCl (µl)	Venofer® (20 mg Fe/ml) (µl)
1x	40	4	3,15	2,85
20x	800	80	63	57

Tabelle 6: Ansätze der Probenmischungen für die Inkubation ohne intravenöses Eisen (Kontrolle)

Ansatz	Serum (µl)	Apo-Tf (10 mg/ml) (µl)	0,9 % NaCl (µl)	Venofer® (20 mg Fe/ml) (µl)
1x	40	4	6	-
20x	800	80	120	-

2.4.3 Durchführung

Zu Beginn wurden 30 Eppendorf-Gefäße beschriftet. Die Gefäße für die Proben mit Eisen wurden mit „P“ (Proben) und die Gefäße für die Proben ohne Eisen mit „C“ (Kontrollen) beschriftet. Zunächst wurde das Serum (von Sigma) mit Apo-Transferrin (Sigma) versetzt und für 15 Minuten bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Die weitere Zugabe von 0,9 % NaCl (Fresenius) und Venofer (Vifor) erfolgte auf Eis. Nach kurzem Vermischen auf dem Vortex (R Labinco „524“) wurde die Mischung in die vorbereiteten Eppendorf-Gefäße (je 40 µl) portioniert und erneut 15 Minuten bei 37 °C im Wasserbad inkubiert.

Mit i.v.-Eisen:

Tabelle 7: Inkubationsschema der Proben mit intravenösem Eisen bei verschiedenen Temperaturen und Zeiten

4 °C	25 °C	37 °C	Inkubation
P1	P2	P3	0 h
P11	P12	P13	0,5 h
P21	P22	P23	1 h
P31	P32	P33	2 h
P41	P42	P43	4 h

Ohne i.v.-Eisen:

Tabelle 8: Inkubationsschema der Proben ohne intravenöses Eisen (Kontrollproben) bei verschiedenen Temperaturen und Zeiten

4 °C	25 °C	37 °C	Inkubation
C1	C2	C3	0 h
C11	C12	C13	0,5 h
C21	C22	C23	1 h
C31	C32	C33	2 h
C41	C42	C43	4 h

Für die Ermittlung des Nullpunktes wurden die jeweiligen Proben (siehe Tabelle 7 und Tabelle 8) direkt nach der 15-minütigen Inkubationszeit im Wasserbad mit 140 µl Rivanol-Fällungsreagenz 0,6 % und 20 µl Glycerin (Merck) versetzt. Nach dem Mischen auf dem Vortex ((R Labinco „524“) wurden die Gefäße bei Raumtemperatur 8 Minuten bis zur Fällung inkubiert. Die restlichen Eppendorf-Gefäße wurden nach Ablauf der in der Tabelle angegebenen Zeit bei der aufgelisteten Temperatur (gemäß Tabelle 7 und Tabelle 8) ebenfalls bei Raumtemperatur mit je 140 µl Rivanol-Fällungsreagenz 0,6 % und je 20 µl Glycerin (Merck) behandelt. Nach 8-minütiger Inkubation erfolgte eine 5-minütige Zentrifugation bei 5000 rpm (Eppendorf Tisch-Zentrifuge 5450). Der Überstand wurde in neu beschriftete Eppendorf-Gefäß zu je 35 µl portioniert und bis zur Gel-Elektrophorese bei -20 °C gelagert.

Für einen weiteren Ansatz wurden 30 Eppendorf-Gefäße beschriftet (P = mit Eisen; C = ohne Eisen). Für die 20-fachen Ansätze wurden zwei größere Eppendorf-Gefäße jeweils mit 800 µl Humanserum (Sigma) und 80 µl Apo-Transferrin (Sigma) versetzt und für 15 Minuten bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 63 µl NaCl (Fresenius) und 57 µl Venofer (Vifor) auf Eis, gefolgt von kurzem Vermischen auf dem Vortex (R Labinco „524“). Danach wurden die Mischungen in die zuvor beschrifteten Eppendorf-Gefäße zu je 40 µl portioniert und erneut für 15 Minuten bei 37 °C inkubiert.

Die Proben für den Nullpunkt wurden unmittelbar danach mit Rivanol-Fällungsreagenz 0,6 % und Glycerin (Merck) versetzt, 8 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und 5 Minuten bei 5000 rpm zentrifugiert (Eppendorf Tisch-Zentrifuge 5450). Diese Schritte wurden bei den anderen Proben, nach deren jeweiliger Inkubationszeit bei entsprechender Temperatur, wiederholt. Von den Überständen wurden jeweils zweimal 35 µl mit einer 6-Kanal-Pipette in neu beschriftete Eppendorf-Gefäße überführt und bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Diese Proben wurden dann für die Harnstoff-Gel-elektrophorese zum Auftragen in die Geltaschen verwendet.

2.4.4 Durchführung der Harnstoff-Gelelektrophorese

Vergleichsproben

Die Vergleichsproben bestanden aus Apo- und Holo-Transferrin und dienten später dem Vergleich der Banden der Proben mit den Laufweiten von Transferrin mit bekannter Eisen-beladung.

5x Sample Buffer:

5 ml Glycerol (Merck)

500 µl 20x Tris-Borat-Laufpuffer, pH 8,4

50 µl 0,05 %iges Bromphenolblau (Sigma)

5 ml destilliertes Wasser

• Apo-Transferrin

15 µl Apo-Transferrin (5 mg/ml) (Sigma)

60 µl destilliertes Wasser

25 µl 5x Sample Buffer

Jeweils 20 µl pro Geltasche (Lane)

• Holo-Transferrin

15 µl Holo-Transferrin (5 mg/ml) (Sigma)

60 µl destilliertes Wasser

25 µl 5x Sample Buffer

Jeweils 20 µl pro Geltasche (Lane)

Für die Harnstoff-Gelelektrophorese konnten bis zu sechs Gele gleichzeitig gegossen werden (siehe Abbildung 7, links). Nach anfänglicher Polymerisation bei Raumtemperatur wurden die Gele bei 4 °C im Kühlschrank (Küleq 0/15 °) über Nacht gelagert. Am nächsten Tag wurden die Gele aus der Form genommen und jeweils zwei Gele in die Elektrophorese-Apparatur eingespannt (insgesamt vier Gele).

Die Kammern wurden mit 1x Tris-Borat-Puffer (pH 8,4) aufgefüllt. Der 1x-Tris Borat-Puffer wurde hergestellt, indem 50 ml 20x Tris-Borat-Puffer mit destilliertem Wasser auf 1000 ml in einem 1000 ml Messzylinder verdünnt und anschließend auf einem Magnetrührer (Framo-Gerätetechnik M20/1) vermischt wurden.

Anschließend wurden die eingespannten Gele mit einer Spritze und einer Kanüle mit Puffer gespült (siehe Abbildung 7, rechts). Um mögliche Störfaktoren zu entfernen, erfolgte ein Pre-Run bei 4 °C im Kühlschrank (Küleq 0/15 °) bei konstanten 120 V für 30 Minuten.

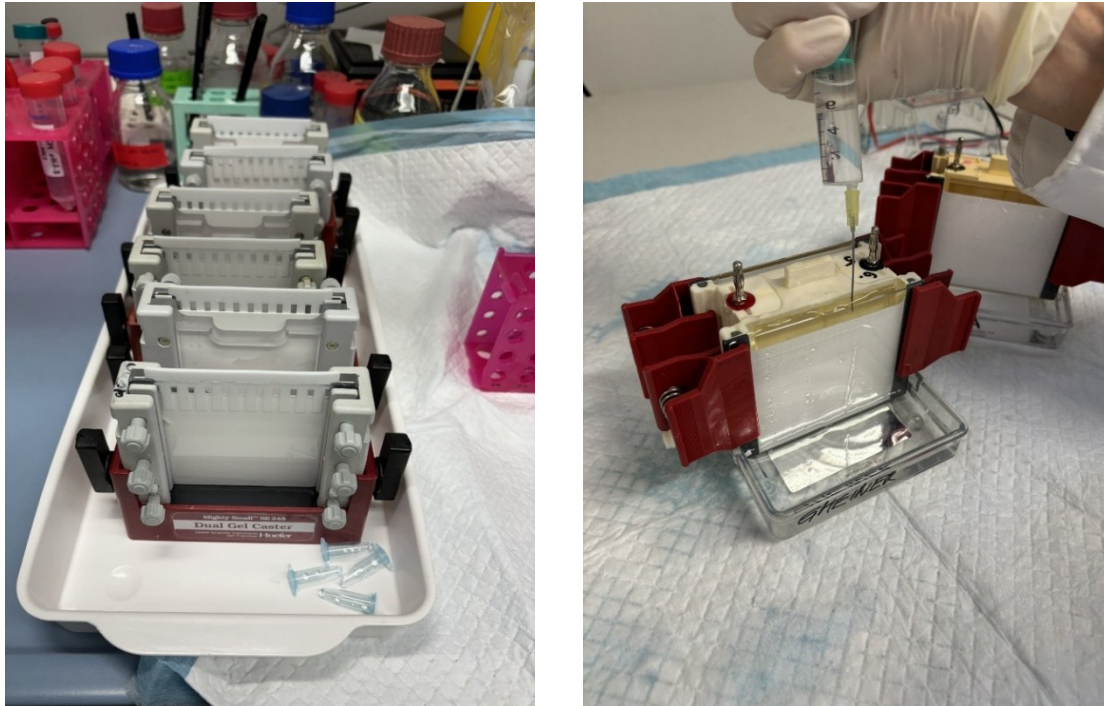


Abbildung 7: Darstellung der gegossenen Gele (links) und des Durchspülens mittels Spritze und Kanüle mit Puffer vor dem Lauf (rechts)

Quelle: Eigene Aufnahme (Sejla Z.)

Die Proben wurden aus dem Tiefkühler genommen und bei Raumtemperatur aufgetaut. Zur Herstellung der Vergleichsproben wurden Apo-Transferrin (5 mg/ml) und Holo-Transferrin (5 mg/ml) aus dem Kühlschrank entnommen und davon jeweils 15 µl in einem Eppendorf-Gefäß mit 60 µl destilliertem Wasser und 25 µl 5x Sample-Puffer versetzt. Die so hergestellten Vergleichsproben mit Apo- bzw Holo-Transferrin wurden zu je 20 µl portioniert und auf jedes Gel als Vergleichslösung aufgetragen.

Vor dem Auftragen der Proben wurden die eingespannten Gele erneut mit einer Spritze und Kanüle mit Puffer gespült. Anschließend wurden von den Proben jeweils 35 µl, sowie von Apo-Tf und Holo-Tf je 20 µl, pro Lane aufgetragen (siehe Tabelle 9). Der Run erfolgte bei 4 °C (Küleq 0/15 °) für 120 Minuten bei einer konstanten Spannung von 150 V. Der Run ist in Abbildung 8 (rechts) dargestellt.

Ansatz:

Tabelle 9: Auftragsschema der Proben bei der Harnstoff-Gelelektrophorese

Gel	Lane 1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
3	P1	P2	P3	P11	P12	P13	P21	P22	ApoTf	HoloTf
4	P23	P31	P32	P33	P41	P42	P43	C1	ApoTf	HoloTf

Gel	Lane 1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
5	C1	C3	C11	C12	C13	C21	C22	C23	ApoTf	HoloTf
6	C31	C32	C33	C41	C42	C43	ApoTf	HoloTf	X	X



Abbildung 8: Aufgetragene Proben von Gel 5 und 6 vor dem Lauf (links) und der Elektrophorese-Run der Gele im Küleq 0/15 ° (rechts).

Quelle: Eigene Aufnahme (Sejla Z.)

Nach Beendigung des Elektrophorese-Laufs wurde der Puffer ausgeleert und der Gelhalter vorsichtig von unten aus der Vorrichtung gedrückt. Anschließend wurden die Befestigungsschrauben der Apparatur gelöst und die beiden Platten mit einem Schaber vorsichtig voneinander getrennt. Dabei wurde die Glasplatte nach oben gelegt und an

der rechten Ecke des Gels wurde ein kleines Stück weggeschnitten, um später die Orientierung zu erleichtern. Die Gele wurden anschließend in einer Amido Black 10B-Färbelösung in Plastikschaalen (IKEA) auf dem Belly Dancer für 5 Minuten inkubiert. Danach wurde die Färbelösung aus den Plastikschaale abgegossen und die Gele mit 20 ml Entfärbelösung übergossen. Die Entfärbung erfolgte auf dem Belly Dancer über Nacht. Zusätzlich wurden kleine Schaumstoffstücke hinzugefügt, um den überschüssigen Farbstoff zu binden.

Am nächsten Tag wurden die Gele in Plastikfolie gepackt, fotografiert und densitometrisch ausgewertet. Da beim ersten Versuchsansatz keine eindeutigen Banden zu sehen waren, wurde die Durchführung der Elektrophorese in weiterer Folge optimiert.

2.4.4.1 Optimierung der Elektrophorese

Zur Optimierung der Elektrophorese wurde die Vorbereitung der Vergleichsproben und der Ablauf der Elektrophorese geändert.

Vergleichsproben (neuer Ansatz):

5x Sample Buffer:

5 ml Glycerol (Merck)

500 µl 20x Tris-Borat-Laufpuffer, pH 8,4

50 µl 0,05 %iges Bromphenolblau (Sigma)

5 ml destilliertes Wasser

- **Apo-Transferrin**

15 µl Apo-Transferrin (5 mg/ml) (Sigma)

5 µl Sample Buffer

Jeweils 20 µl pro Geltasche (Lane)

- **Holo-Transferrin**

15 µl Holo-Transferrin (5 mg/ml) (Sigma)

5 µl Sample Buffer

Jeweils 20 µl pro Geltasche (Lane)

Zuvor wurden je 15 µl Apo-Transferrin bzw. Holo-Transferrin mit 60 µl destilliertem Wasser und 25 µl Sample Buffer in ein großes Eppendorf-Gefäß pipettiert und in Portionen zu je 20 µl aufgeteilt. Im Unterschied zur ursprünglichen Durchführung wurden bei der Optimierung je 15 µl Apo-Transferrin oder Holo-Transferrin mit 5 µl Sample Buffer direkt

in vier Eppendorf-Gefäße pipettiert. Die Mischungen wurden anschließend auf dem Vortex (R Labinco „524“) gemischt und zentrifugiert (Eppendorf Centrifuge 5415 D).

Die Gele wurden vor dem Probenauftrag einem Pre-Run bei 120 V für 30 Minuten im Kühlschrank (Küleq 0/15) unterzogen. Nach dem Vorlauf wurden die Gele mit einer 10-ml-Spritze mit Kanüle und 1x Tris-Borat-Puffer gespült. Die Proben wurden aus dem Gefrierschrank (-20 °C) geholt, bei Raumtemperatur aufgetaut und vor dem Auftragen am Vortex (R Labinco „524“) durchmischt. Nach dem Auftragen der Proben wurden alle Kammern vollständig mit dem Puffer aufgefüllt und einem Run von 2 Stunden bei 150 V (80 mA) (Bio-Rad Model 200/2.0 Power Supply) unterzogen.

Nach dem Run wurden die Gele in Plastikschaalen (IKEA) mit Amido Black 10B-Färbelösung 5 Minuten gefärbt und mit Destain-Lösung über Nacht auf dem Belly Dancer entfärbt. Da die Entfärbung unzureichend war wurde, die Entfärbelösung (Destain) am nächsten Tag erneuert und für weitere 20 Minuten inkubiert. Danach wurde die Entfärbelösung (Destain) abgegossen und die Gele bis zur fotografischen Aufnahme in Folie verpackt und im Küleq bei 4 °C gelagert.

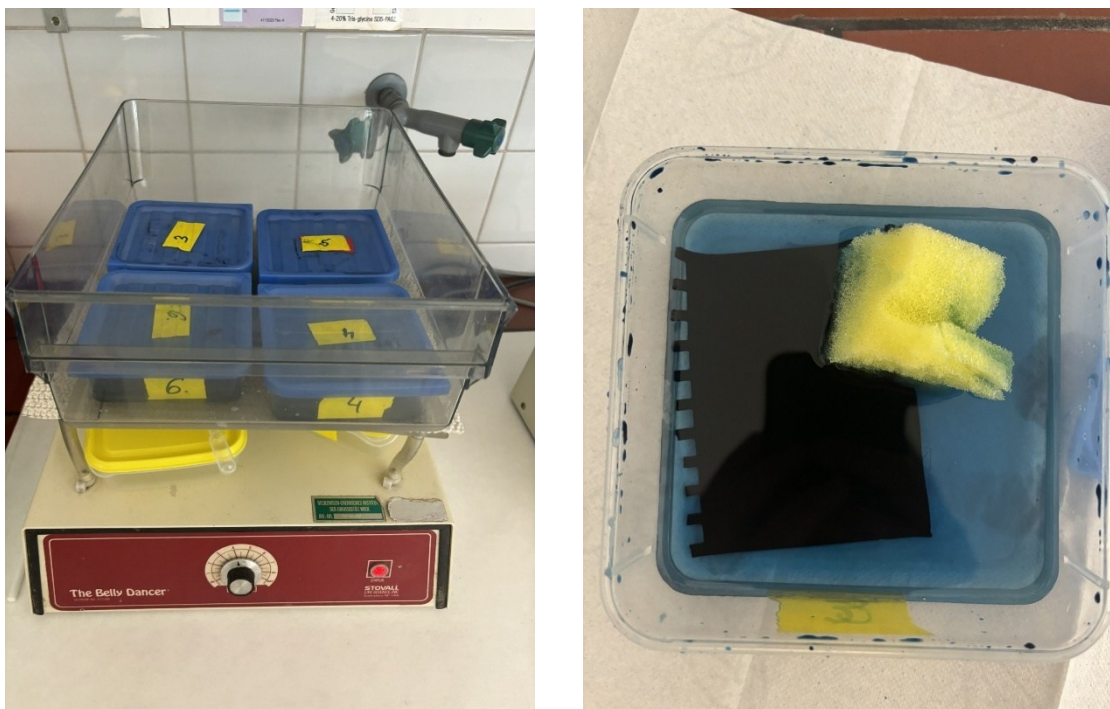


Abbildung 9: Färben der Gele auf Belly Dancer (rotierende Platte)

Links: Gele in Plastikschaalen während der Inkubation am Belly Dancer (Stovall).

Rechts: Gel in einer offener Plastikschaale mit Schwamm zur Unterstützung der Entfärbung.

Quelle: Eigene Aufnahme (Sejla Z.)

2.4.5 Fotodokumentation

2.4.5.1 Materialien

Folienbeutel transparent

SEKUROKA® aus PP, 40 µm (Roth, Lactan)

Kamera

Smartphone Kamera Huawei P 30-Lite mit Objektivreihe bestehend aus drei Objektiven: 48.0 MP, f / 1.8, Phasenvergleich-AF, LED-Blitz, Videos @1080 p / 60 fps (Kamera 1); 8.0 MP, Weitwinkelobjektiv (Kamera 2); 2.0 MP, Tiefenschärfe (Kamera 3); Betriebssystem: EMUI 12

LED-Leuchtplatte

LIGHT PAD (CRELANDO)

2.4.5.2 Durchführung

Die Gele wurden in transparente Folienbeuten (Sekuroka) eingelegt und auf der LED-Leuchtplatte Light Pad positioniert. Die Gele wurden mit der niedrigsten LED-Lichtintensitätsstufe von oben mit einer Smartphone Kamera (Huawei P 30-Lite) fotografiert.

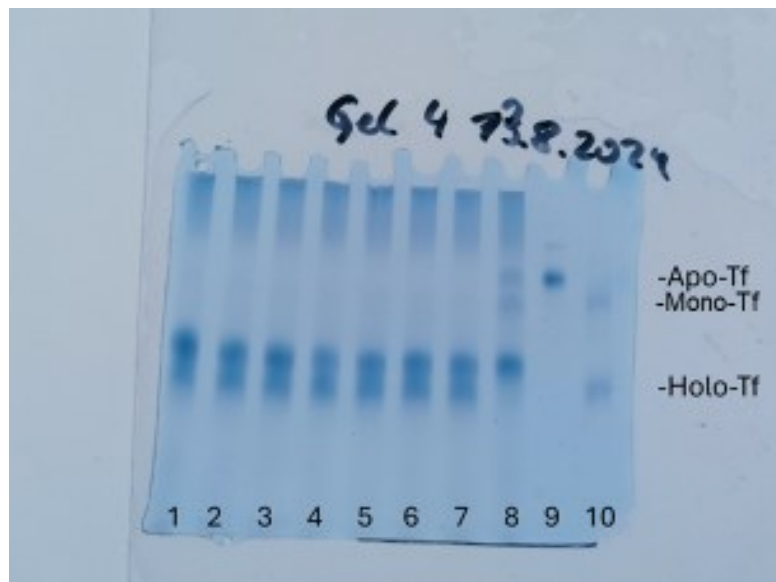


Abbildung 10: Fotoaufnahme eines der gefärbten Gele (Gel 4) auf der LED-Leuchtplatte

Quelle: Eigene Aufnahme (Sejla Z.)

In Abbildung 10 ist eines der Gele dargestellt. Das Gel zeigt in Lane 1 bis 7 die verschiedenen Proben und in Lane 8 die Kontrollprobe (C1). In den Serumproben sind die Banden der verschiedenen Transferrinspezies erkennbar. Es zeigt sich eindeutig eine Bande auf gleicher Höhe wie das Holo-Transferrin (Lane 10), während die Apo-Transferrin-Bande in den Proben schwächer ist. Die Vergleichsbanden in Lane 9 und 10, die Apo- bzw. Holo-Transferrin entsprechen, sind gut erkennbar. In Lane 8 (Kontrollprobe Serum) ist auch die Bande für monoferrisches Transferrin erkennbar. Das als Vergleichssubstanz eingesetzte Holo-Transferrin (Sigma) enthielt neben Holo-Transferrin offensichtlich auch monoferrisches Transferrin, während in Lane 9 das gekaufte Apo-Transferrin (Sigma) keine Verunreinigung mit anderen Transferrinspezies aufwies. Die Banden der Kontrolle (Serum) in Lane 8 zeigen die charakteristischen Banden der verschiedenen Transferrin-Formen.

2.4.6 Densitometrische Auswertung

2.4.6.1 Materialien

AlphaEase FC™, Version 3.2.1 (Alpha Innotech Corporation)

Excel (Microsoft)

GraphPad Prism 5 (GraphPad Software)

2.4.6.2 Durchführung

Das Programm AlphaEase FC™, Version 3.2.1 (Alpha Innotech Corporation) lieferte den prozentuellen Anteil von Apo-Transferrin, Holo-Transferrin und monoferrischem Transferrin bezogen auf das gesamte Transferrin in den einzelnen Proben. Folgende Einstellungen dienten zur Auswertung:

ENHANCEMENT TOOLS: CONTRAST AJUSTMENT: EQUAL

ANALYSIS TOOLS: SPOT DENSO

OBJECT: RECTANGLE

AUTO BKGD

INVERT

OUTPUT: CLIPBOARD

Die gewonnenen Daten wurden von dem Programm AlphaEase FC™ in MS-Excel übertragen. Für das Anfertigen von Grafiken wurde das Programm GraphPad Prism 5 (GraphPad Software) verwendet. Der prozentuelle Anteil der Transferrin-Untertypen wurde mit Hilfe von Balkendiagrammen oder Punktediagrammen grafisch dargestellt.

2.5 Statistische Auswertung

2.5.1 Materialien

GraphPad Prism 5 (GraphPad Software)

Diese Software dient zur graphischen Darstellung der Daten und zur Durchführung statistischer Auswertungen.

2.5.2 Durchführung

Der Originaldaten-Output von AlphaEase Imaging Software wurde in MS-Excel importiert, um den prozentuellen Anteil der jeweiligen Banden am Gesamt-Transferrin zu bestimmen.

Die weiteren statistischen Berechnungen und graphischen Darstellungen von Balken- und Liniendiagrammen erfolgten mit dem Programm GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc., USA). Dadurch konnten die Einflüsse verschiedener Parameter auf die Transferrin-Beladung visualisiert und interpretiert werden.

3 Ergebnisse

3.1 Einfluss von Apo-Transferrin-Spike auf die Verteilung der Transferrinspezies in Normalserum

Das von gesunden Probanden gewonnene gepoolte humane Serum (von Sigma) wurde mit unterschiedlichen Konzentrationen an Apo-Transferrin gespikt, um ein Serum zu erhalten, welches besser dem eines Patienten mit Eisenmangel entspricht. Als Vergleichsproben dienten Apo-Transferrin und Holo-Transferrin, welche zuvor noch mit Rivanol-Fällungsreagenz und Glycerin versetzt wurden (siehe 2.2). Mittels Harnstoff-Gelelektrophorese wurden die Transferrinspezies in unterschiedliche Banden aufgetrennt, gefärbt und anschließend densitometrisch ausgewertet.

In Abbildung 11 sind die Ergebnisse des Vorversuchs dargestellt. Wie erwartet, zeigt sich eine direkte Proportionalität zwischen dem zugesetzten Apo-Transferrin-Spike im Serum und dem prozentualen Anteil an Apo-Transferrin am Gesamttransferrin. Während der prozentuale Anteil von Holo-Transferrin, ohne Zugabe von Apo-Transferrin bei über 45 % lag, ist eine deutliche Abnahme von Holo-Transferrin nach einem Spike-Zusatz mit Apo-Transferrin zu beobachten. Es ist ebenfalls zu beobachten, dass sich ab einer Spike-Zugabe von 40 µg Apo-Transferrin zum Serum die Konzentration von Holo-Transferrin praktisch nicht mehr wesentlich verändert.

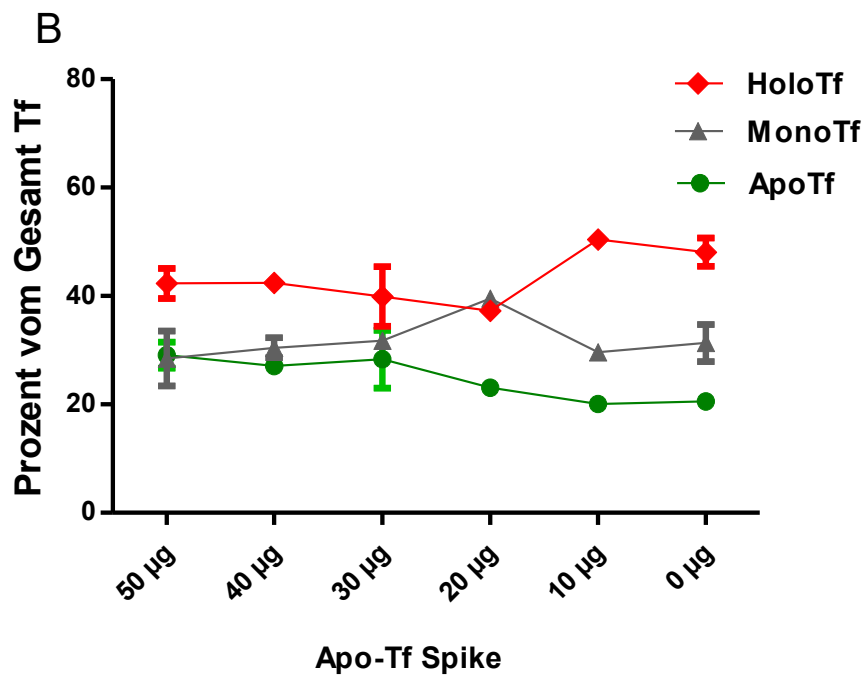
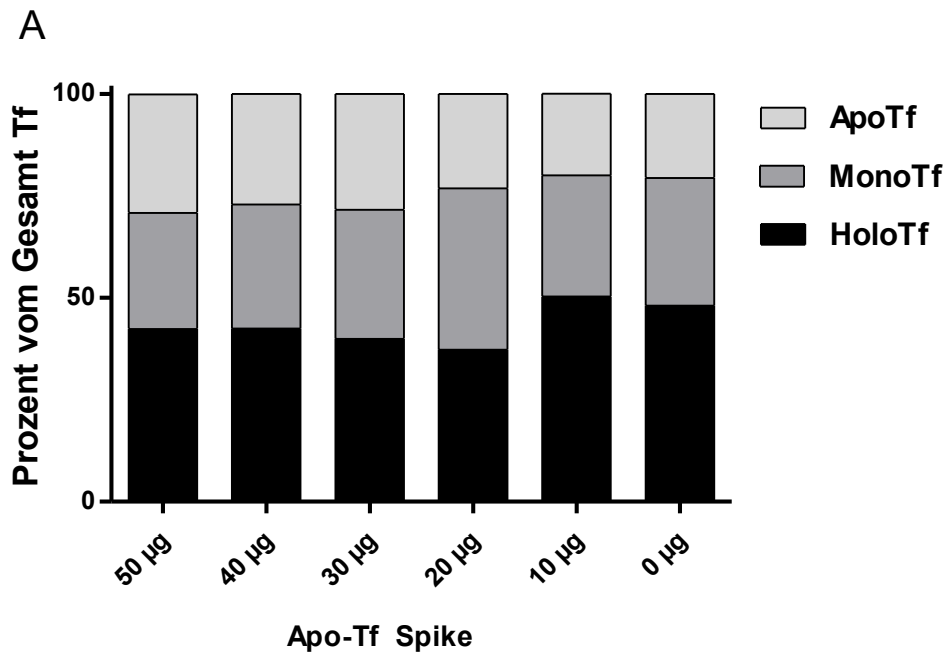


Abbildung 11: Verteilung der Transferrinspezies nach Zugabe von 0 bis 50 µg Apo-Transferrin als Spike zu gepooltem humanem Serum gesunder Probanden (von Sigma)

In Abbildung 12 ist zur besseren Darstellung jeder Parameter in eigenen Grafiken veranschaulicht. Auch hier ist ein deutlicher Anstieg der Apo-Transferrin Konzentration, bei Zugabe von mehr Apo-Transferrin als Spike, zu beobachten.

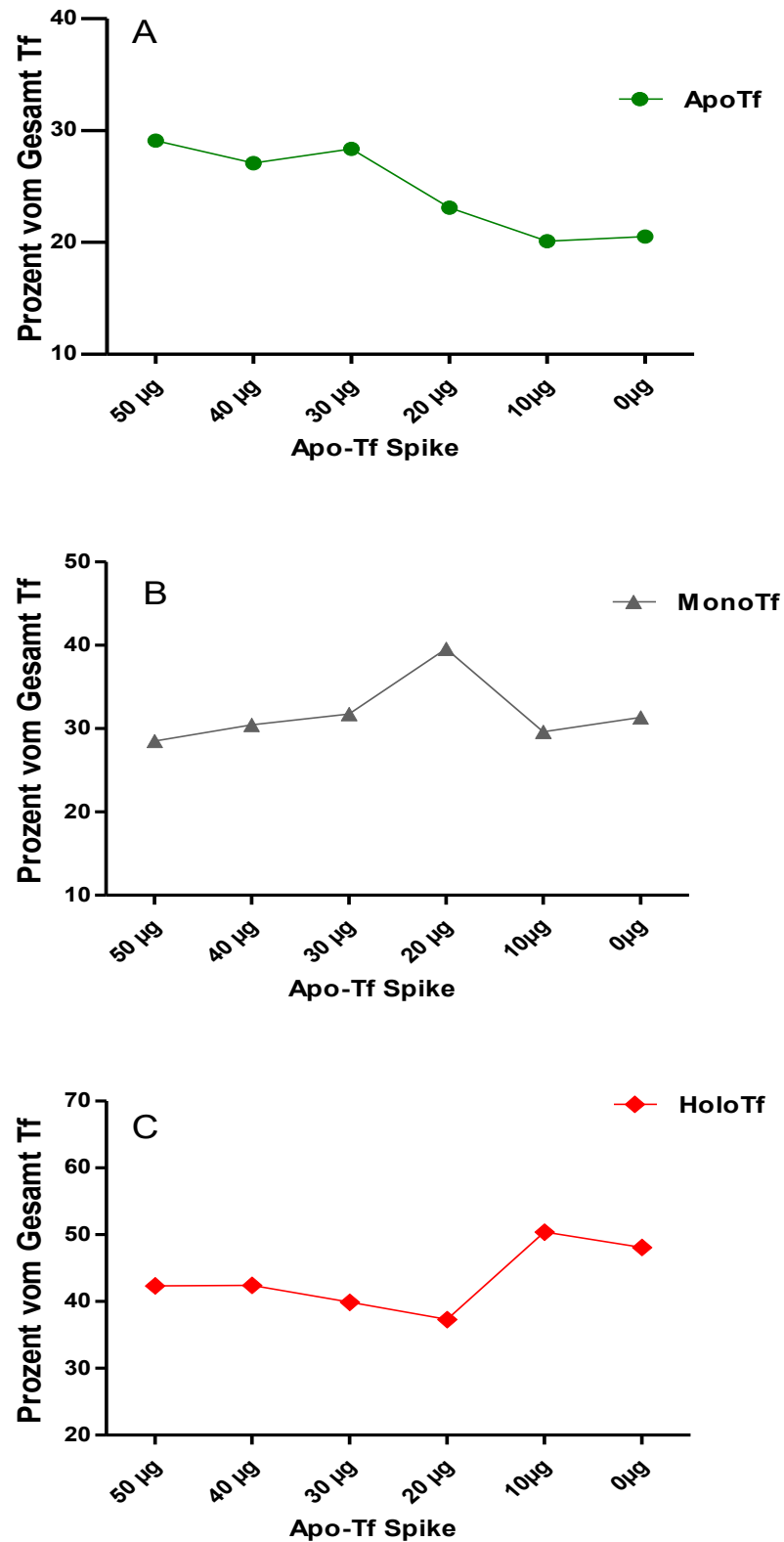


Abbildung 12: Verteilung der Transferrinspezies nach Zugabe von 0 bis 50 µg Apo-Transferrin als Spike zu gepooltem humanem Serum gesunder Probanden (von Sigma), getrennt in Apo-, Mono- und Holo-Transferrin

In Abbildung 13 wird die prozentuale Verteilung der Transferrinspezies nach Zugabe eines weiteren Konzentrationsbereichs (0-100 μg) von Apo-Transferrin-Spike zu gepooltem Serum gesunder Probanden (von Sigma) gezeigt. Der prozentuale Anteil von Apo-Transferrin stieg mit zunehmender Apo-Transferrin-Spike Konzentrationen weiter an auf etwa 35 %.

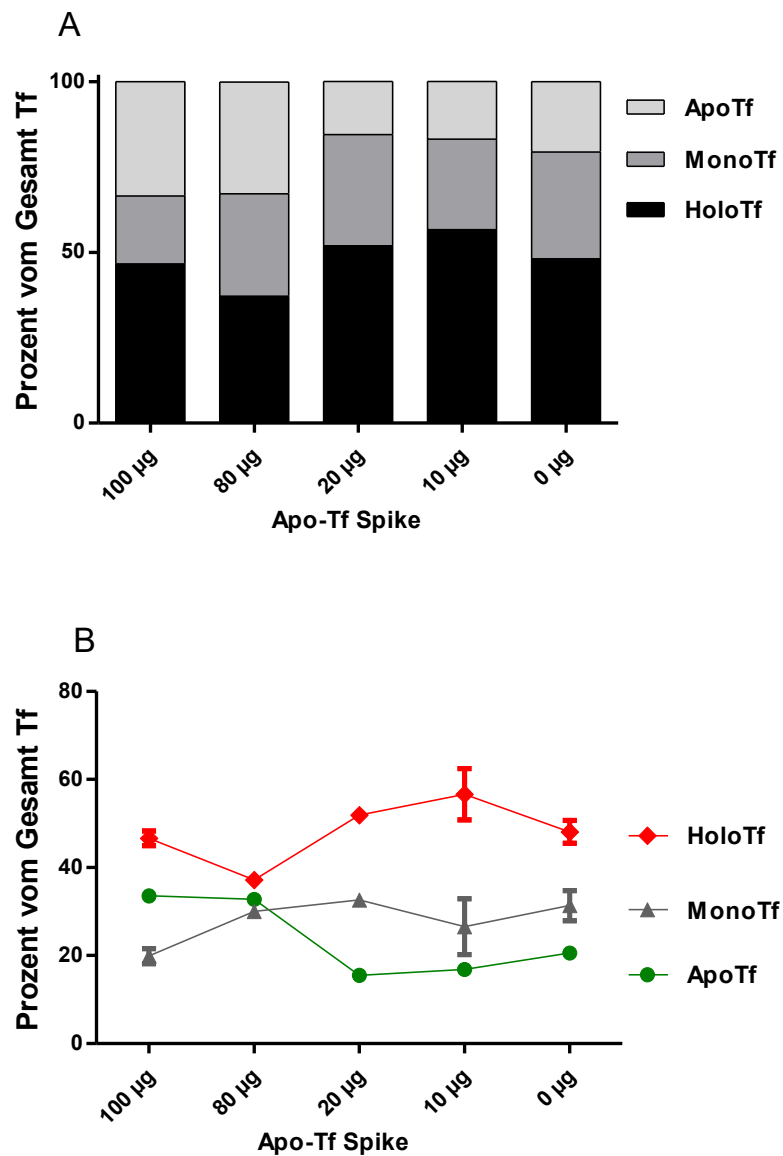


Abbildung 13: Prozentualer Anteil der einzelnen Transferrinspezies am gesamten Transferrin nach Zugabe von Apo-Transferrin als Spike zu gepooltem humanem Serum gesunder Probanden (von Sigma).

In Abbildung 14 wird der prozentuale Anteil der Transferrinspezies Apo-Transferrin, Mono-Transferrin und Holo-Transferrin am Gesamttransferrin in einzelnen Diagrammen dargestellt.

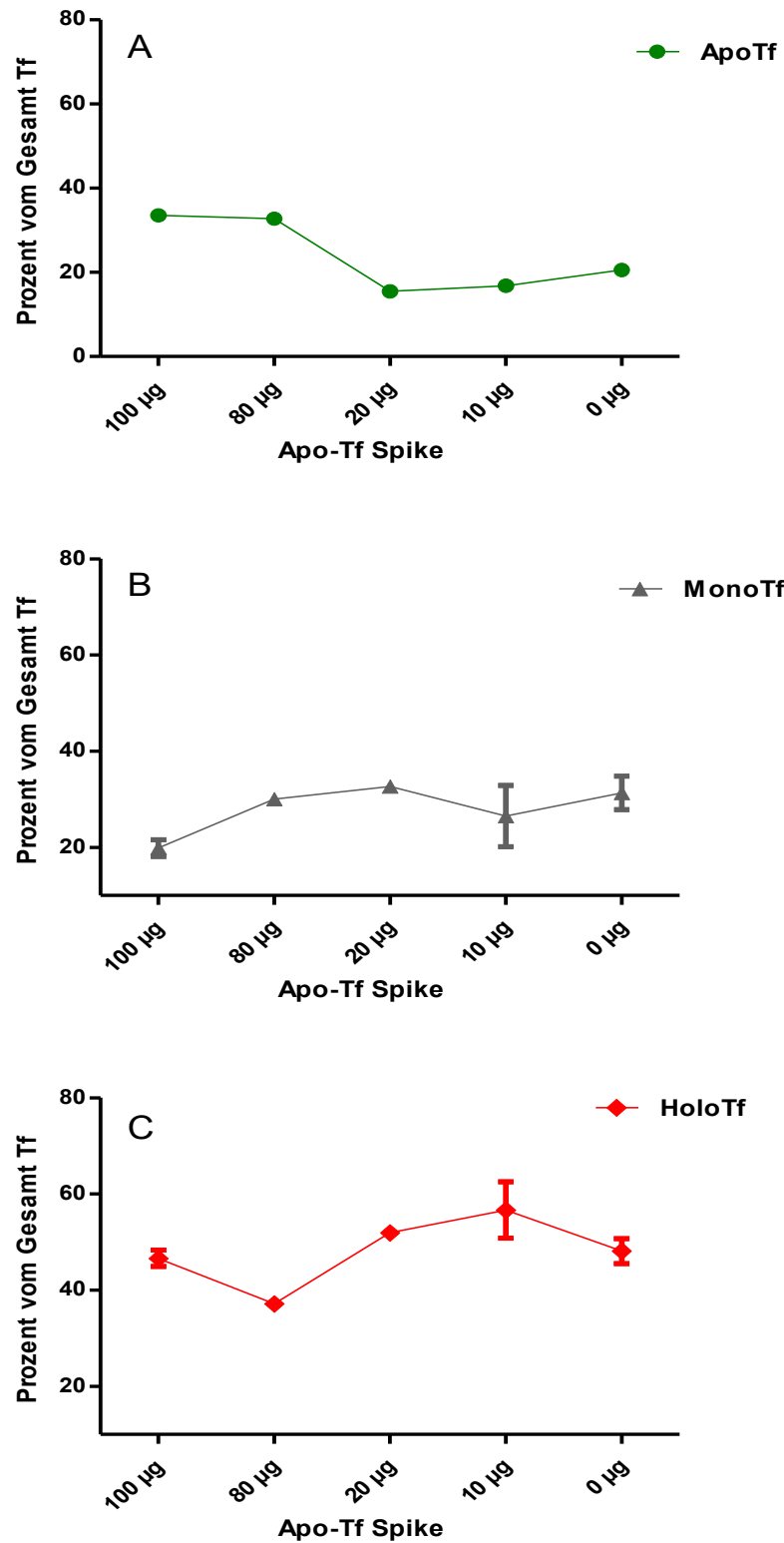


Abbildung 14: Prozentualer Anteil der einzelnen Transferrinspezies am gesamten Transferrin nach Zugabe von Apo-Transferrin als Spike zu gepooltem humanem Serum gesunder Probanden (von Sigma).

3.2 Einfluss der Aufarbeitungszeit bis zur Rivanolfällung auf die Verteilung der Transferrinspezies in gepooltem humanem Serum gesunder Probanden (von Sigma)

Es wurde untersucht, wie sich eine Inkubation (0 bis 4 Stunden) von gepooltem humanem Serum mit zugesetztem Apo-Transferrin-Spike bei unterschiedlichen Temperaturen auf den prozentualen Anteil der einzelnen Transferrinspezies im Verhältnis zum Gesamttransferrin auswirkt. Die Inkubationstemperaturen entsprachen dabei etwa 4 °C (auf Eis) sowie 25 °C und 37 °C (beide in einem temperierten Wasserbad).

Die Ergebnisse des Zeitverlaufs für die unterschiedlichen Inkubationstemperaturen sind in Abbildung 15 dargestellt. Dabei zeigten sich über den gesamten Beobachtungszeitraum nur geringe Schwankungen im prozentualen Anteil der einzelnen Transferrinspezies am Gesamttransferrin bei den drei untersuchten Inkubationstemperaturen.

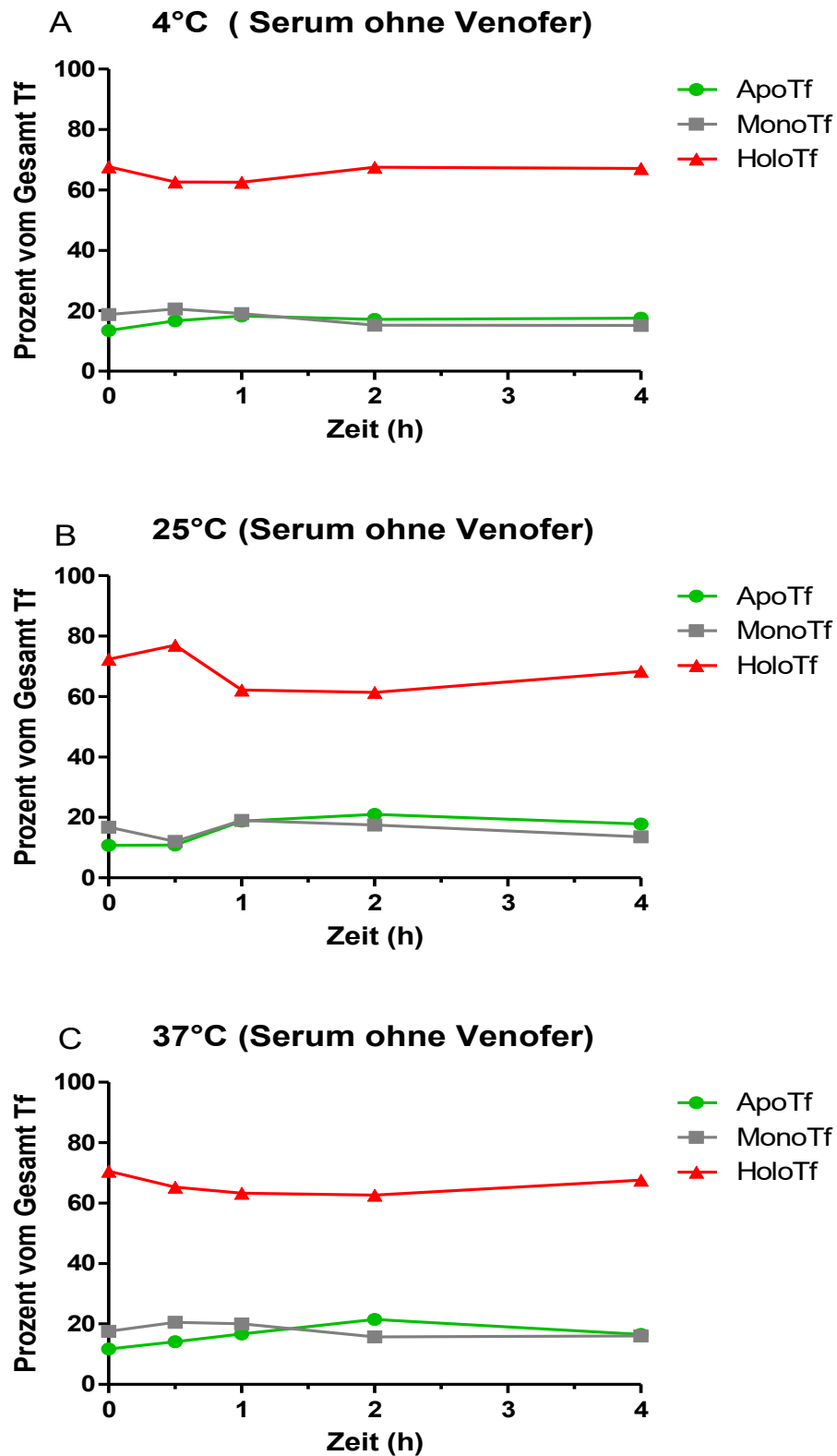


Abbildung 15: Zeitlicher Verlauf der Transferrin-Beladung von gepooltem humanem Serum gesunder Probanden (von Sigma) bei Inkubation unter verschiedenen Temperaturbedingungen bis zur Rivanolfällung

3.3 Einfluss der Temperatur bis zur Rivanolfällung auf die Verteilung der Transferrinspezies in unbehandeltem Serum

Zur Verdeutlichung des Einflusses der Inkubationstemperatur auf den prozentualen Anteil der verschiedenen Transferrinspezies wurden die Ergebnisse mit Serum, dem kein intravenöses Eisen zugesetzt worden war, in geschichteten Balkendiagrammen, getrennt nach den einzelnen Zeitpunkten, dargestellt (Abbildung 16).

In Abbildung 17 wird der Verlauf der prozentualen Anteile der einzelnen Transferrinspezies am Gesamttransferrin bei drei unterschiedlichen Temperaturen dargestellt. Die Inkubationsbedingungen entsprachen etwa 4 °C (auf Eis), 25 °C (temperiertes Wasserbad) und 37 °C (temperiertes Wasserbad). Bei 0 Stunden, 1 Stunde, 2 Stunden und 4 Stunden waren praktisch keine Unterschiede zwischen den einzelnen Temperaturen erkennbar.

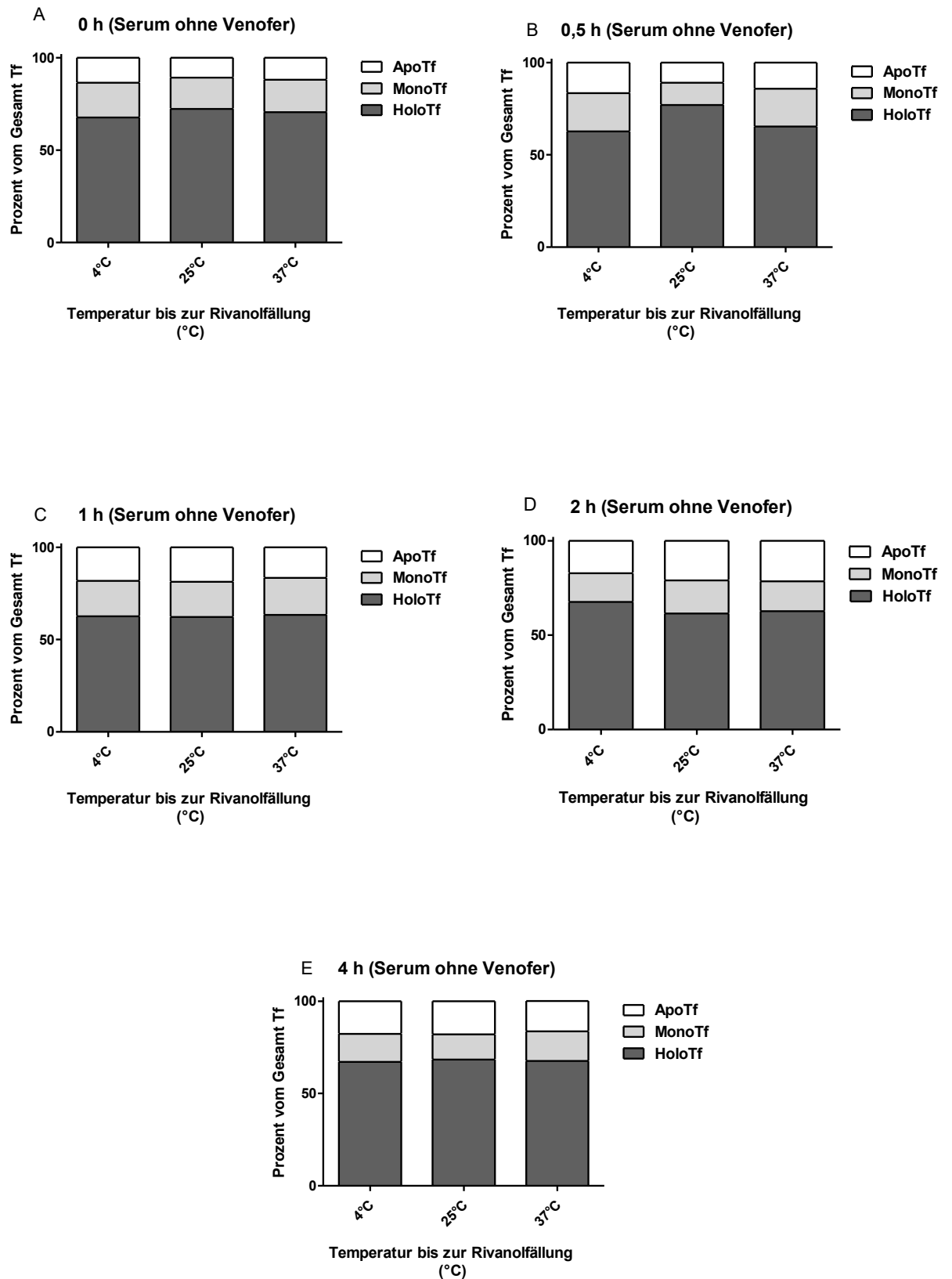


Abbildung 16: Abhängigkeit der Transferrin-Beladung in unbehandeltem Serum (ohne i.v.-Eisenzusatz) in Abhängigkeit der Temperatur

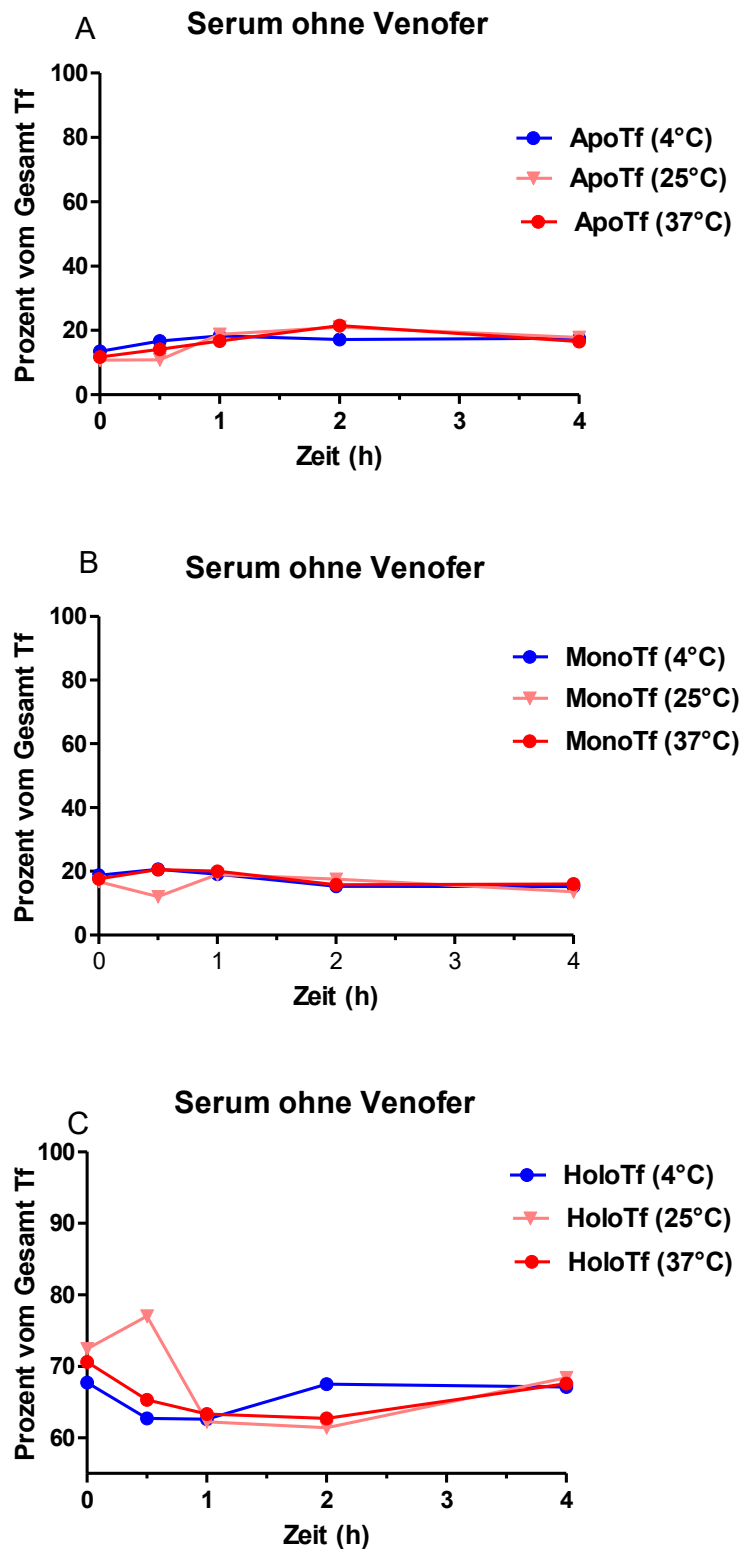


Abbildung 17: Einfluss der Inkubationstemperatur bis zur Rivanol-fällung bei unterschiedlichen Lagerungstemperaturen auf den prozentualen Anteil von Apo-Transferrin, monoferrischem Transferrin und Holo-Transferrin im Serum (ohne i.v.-Eisenzusatz)

3.4 Einfluss der Aufarbeitungszeit bis zur Rivanolfällung auf die Verteilung der Transferrinspezies in Serum nach Inkubation mit Venofer

Als Nächstes wurde untersucht, ob sich die Aufarbeitungszeit, bis zu der die Rivanolfällung erfolgte, auf den prozentualen Anteil der einzelnen Transferrinspezies bezogen auf Gesamttransferrin auswirkt, wenn Serum mit Venofer behandelt wurde. Dazu wurde das Serum für 15 Minuten bei 37 °C mit Venofer inkubiert. Anschließend erfolgte die Rivanolfällung entweder sofort (Zeitpunkt 0) oder nach einer weiteren Inkubation von 0,5 bis 4 Stunden bei etwa 4 °C (auf Eis) bzw. bei 25 °C und 37 °C (beide in einem temperierten Wasserbad).

Abbildung 18 zeigt die Ergebnisse für die drei untersuchten Temperaturen. Dabei ist erkennbar, dass in Gegenwart von Venofer eine Inkubationszeit von mehr als 60 Minuten bis zur Rivanolfällung, bei einer Inkubation auf Eis (etwa 4 °C), zu einem Anstieg des Holo-Transferrins und einem Absinken des Apo-Transferrins führt. Auch bei 25 °C kommt es bereits nach etwa 30 Minuten zu einer leichten Änderung der Transferrin-Be-ladung und zu einer stärkeren Veränderung nach 60 Minuten Inkubation bis zur Rivanolfällung. Bei 37 °C kann hingegen nur dann keine Veränderung des prozentualen Anteils der einzelnen Transferrinspezies im Vergleich zum Zeitpunkt Null Stunden beobachtet werden, wenn die Rivanolfällung innerhalb von 0,5 Stunden erfolgt.

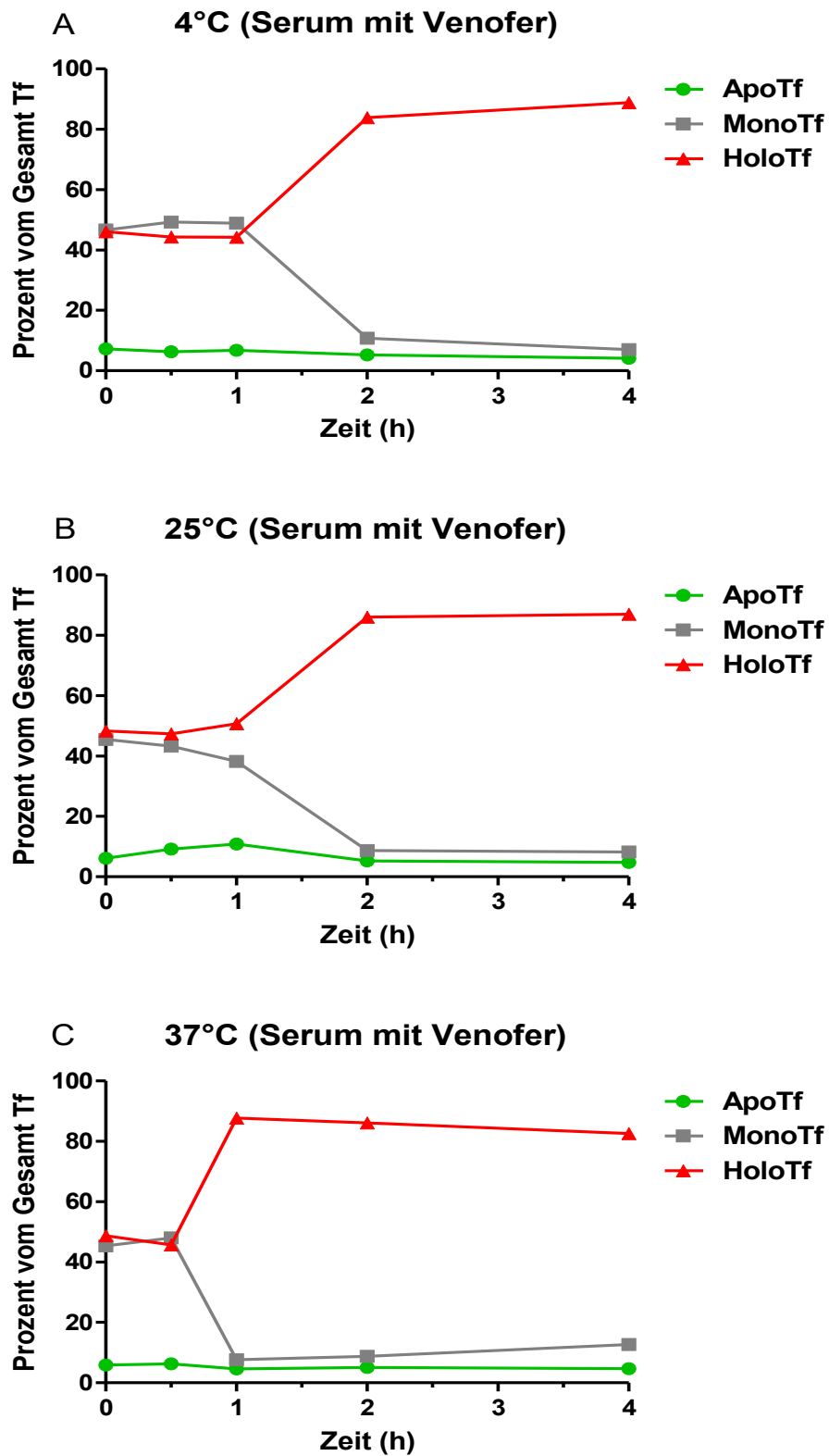


Abbildung 18: Zeitverlauf der einzelnen Transferrinspezies in Serum mit Venofer bis zur Rivanolfällung bei unterschiedlichen Temperaturen

Um den Einfluss der Temperatur zu verdeutlichen, wurden in Abbildung 19 und Abbildung 20 die Ergebnisse zu den einzelnen Zeitpunkten bis zur Rivanolfällung bei den drei verschiedenen Temperaturen dargestellt.

In Abbildung 19 zeigen die geschichteten Balkendiagramme den prozentualen Anteil der einzelnen Transferrinspezies in den Proben, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten bei den jeweiligen Temperaturen gesammelt und der Rivanolfällung unterzogen wurden. Während die prozentuale Verteilung der Transferrinspezies bei 0 und 0,5 Stunden in allen drei Temperaturen noch vergleichbar ist, zeigt sich bei 1 Stunde ein temperaturabhängiger Unterschied der prozentualen Verteilung der Transferrinspezies. Bei 4 °C und 25 °C treten noch relativ ähnliche Verteilungen auf, während bei 37 °C bereits der Großteil des Transferrins in Form von Holo-Transferrin vorliegt. Bei 2 und 4 Stunden sind die Verteilungen der Transferrinspezies bei allen drei Temperaturen wieder ähnlich, wobei die Transferrinspezies Holo-Transferrin überwiegt.

In Abbildung 20 stellt diese Ergebnisse nochmals in einer anderen Darstellung, in Abhängigkeit von der verstrichenen Zeit bis zur Rivanolfällung, getrennt für die einzelnen Transferrinspezies bei den drei unterschiedlichen Temperaturen, dar. Es ist erkennbar, dass der prozentuale Anteil an Apo-Transferrin über den gesamten Beobachtungszeitraum (0 – 4 Stunden) relativ konstant bleibt. Im Gegensatz dazu werden die relativen Anteile von monoferrischem Transferrin und Holo-Transferrin deutlich durch die Inkubationstemperatur sowie die verstrichene Zeit bis zur Rivanolfällung beeinflusst.

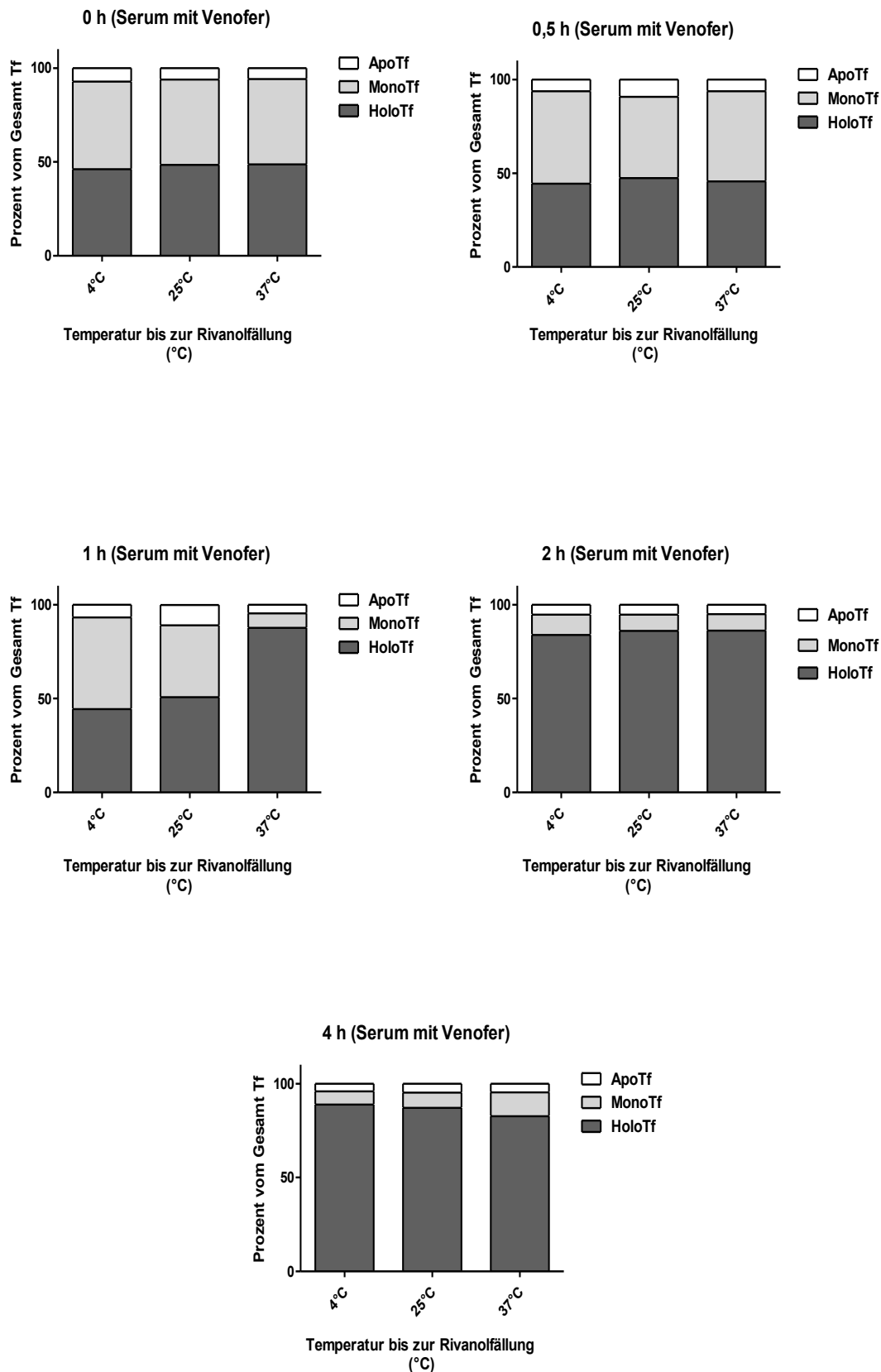


Abbildung 19: Abhängigkeit der Transferrin-Beladung im Serum mit Venofer in Abhängigkeit der Temperatur getrennt nach Inkubationstemperatur

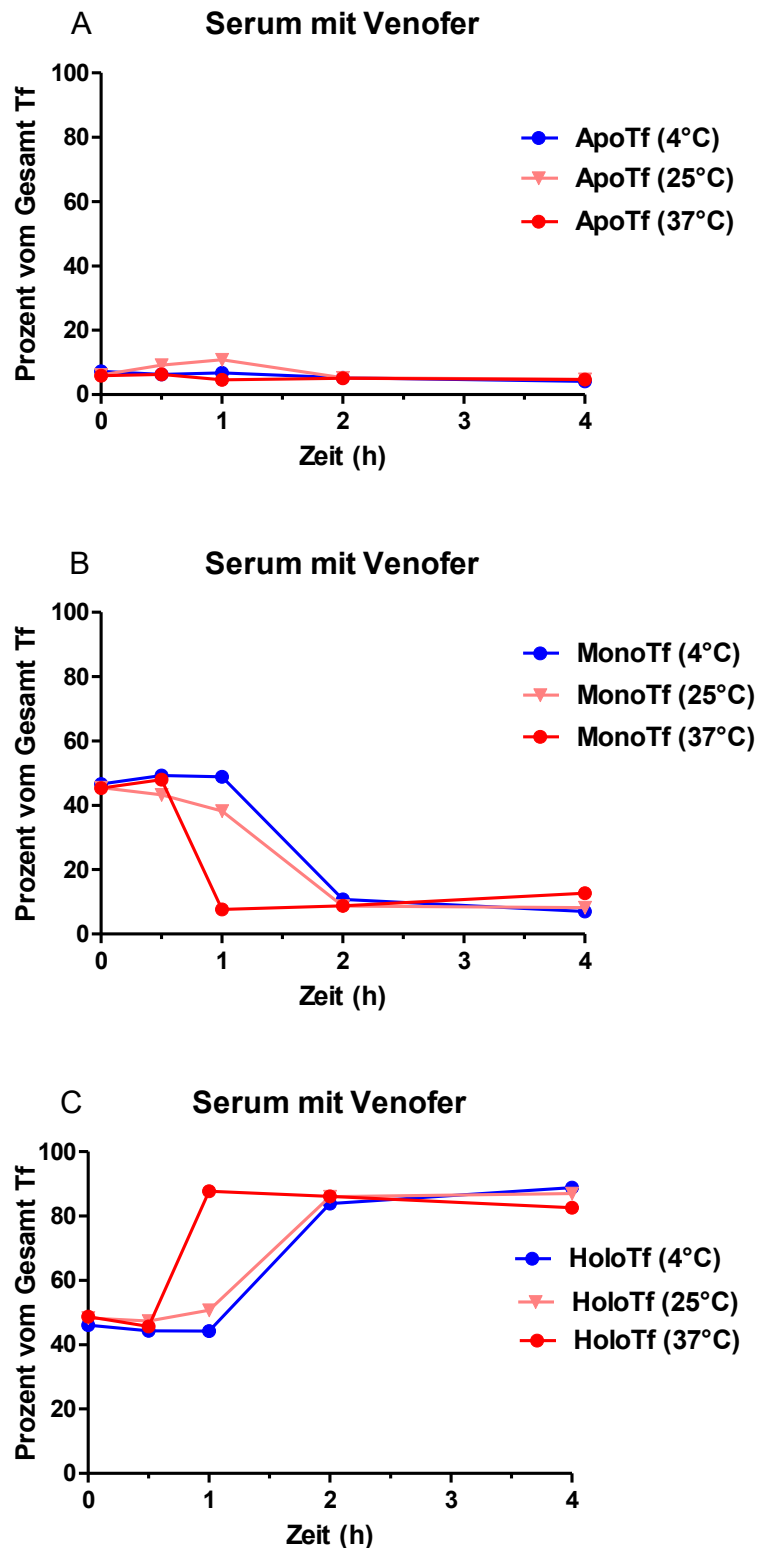


Abbildung 20: Einfluss der Inkubationstemperatur bis zur Rivanolfällung bei unterschiedlichen Lagerungstemperaturen auf den prozentualen Anteil von Apo-Transferrin, monoferrischem Transferrin und Holo-Transferrin am gesamten Transferrin im Serum mit ivFe (Venofer)

3.5 Vergleich der Stabilität der Transferrin-Beladung im Serum ohne Zusatz von Venofer und in Gegenwart von Venofer

Zum Abschluss der Studie wurde untersucht, welchen Einfluss die fehlende Einhaltung eines Zeitmanagements auf die Ergebnisse hat. In einem Szenario wurden Proben zwischen 0 – 4 h bei drei unterschiedlichen Temperaturen gelagert, bevor die Rivanolfällung durchgeführt wurde (Abbildung 21). Dieses Szenario wurde mit einem zweiten verglichen, bei dem ausschließlich Proben berücksichtigt wurden, die nach 0 – 1 h Lagerung vor der Rivanolfällung inkludiert wurden (Abbildung 22).

Serum ohne Zusatz von Venofer zeigt bei den Proben, die im Zeitraum 0 – 4 h und 0 – 1 h gesammelt und jeweils sofort mit Rivanol gefällt wurden, eine vergleichbare Streuung der Einzelwerte bei allen Temperaturen.

Bei Serum mit Venofer fällt hingegen auf, dass die Streuung bei Berücksichtigung der Proben, die im Zeitraum 0 – 4 h gesammelt und sofort mit Rivanol gefällt wurden, größer ist als bei Proben, die nur im Zeitraum 0 – 1 h gesammelt und sofort mit Rivanol gefällt wurden (Abbildung 21 und Abbildung 22). Dieser Unterschied war besonders auffällig bei 37 °C.

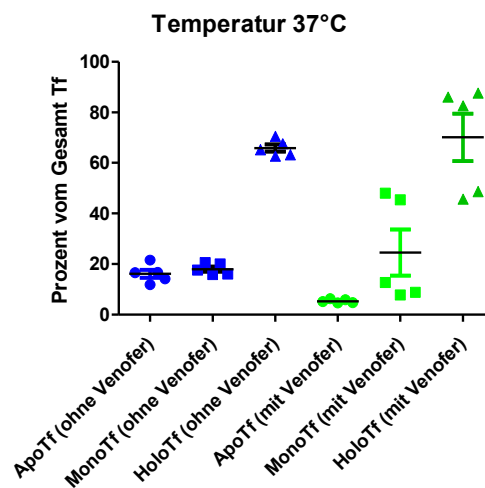
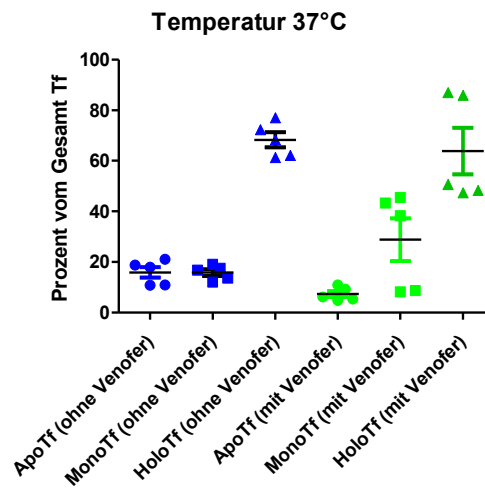
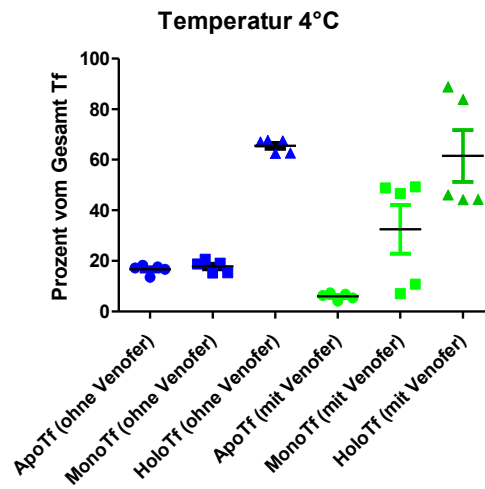


Abbildung 21: Einfluss der Lagertemperatur auf die einzelnen Transferrinspezies bis zur Rivanolfällung im Zeitraum von 0 – 4 h

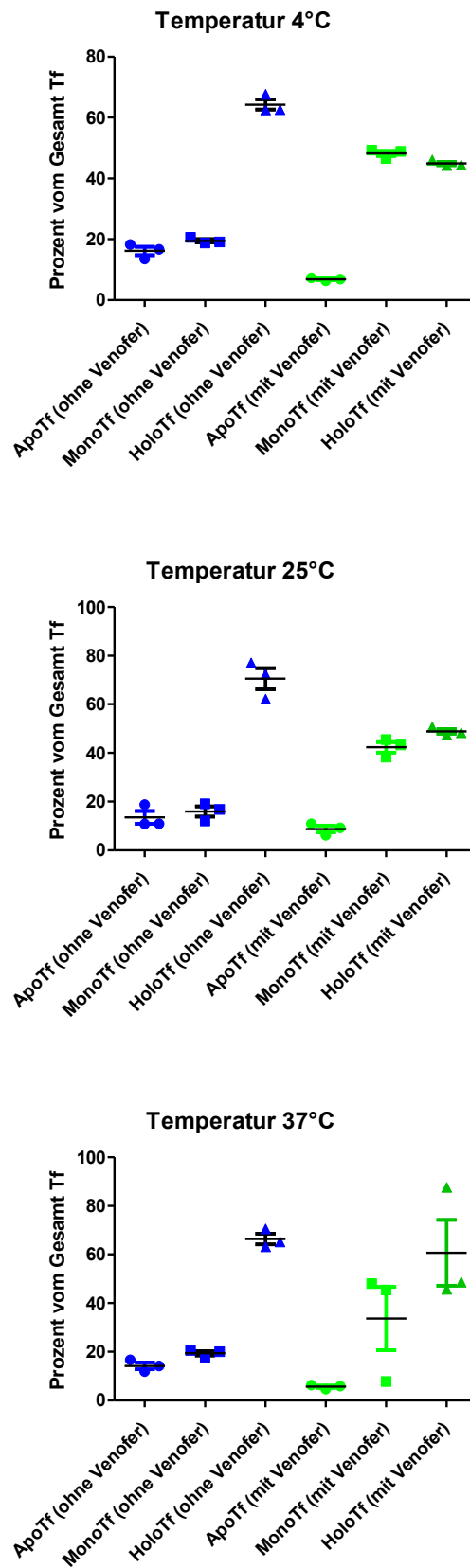


Abbildung 22: Einfluss der Lagertemperatur auf die einzelnen Transferrinspezies bis zur Rivanolfällung im Zeitraum von 0 – 1 h

Mittels GraphPad Prism 5 wurden anschließend die relativen Streuungen der Einzelwerte bei den verschiedenen Temperaturen untersucht und die prozentualen Variationskoeffizienten berechnet. In der Tabelle sind die prozentualen Variationskoeffizienten als CV (%) nach den unterschiedlichen Zeitintervallen bis zur Rivanolfällung ausgewiesen. Dabei wurden entweder alle Werte (0 – 4 h) berücksichtigt oder nur Messwerte bis zu 1 Stunde (Zeitintervall 0 – 1h) (Tabelle 10).

Tabelle 10: Relative Streuung der Einzelwerte in Abhängigkeit der Temperatur und Zeit bis zur Rivanolfällung

4 °C	ohne Venofer			mit Venofer		
	ApoTf	MonoTf	HoloTf	ApoTf	MonoTf	HoloTf
CV (%) (0-1 h)	15.12 %	4.95 %	4.53 %	7.35 %	3.02 %	2.25 %
CV (%) (0-4 h)	11.17 %	13.63 %	4.01 %	21.41 %	66.51 %	37.05 %

25 °C	ohne Venofer			mit Venofer		
	ApoTf	MonoTf	HoloTf	ApoTf	MonoTf	HoloTf
CV (%) (0-1 h)	34.00 %	22.47 %	10.74 %	27.87 %	8.71 %	3.47 %
CV (%) (0-4h)	29.78 %	18.31 %	9.75 %	36.61 %	65.14 %	32.35 %

37 °C	ohne Venofer			mit Venofer		
	ApoTf	MonoTf	HoloTf	ApoTf	MonoTf	HoloTf
CV (%) (0-1 h)	17.26 %	8.00 %	5.68 %	15.87 %	66.93 %	38.60 %
CV (%) (0-4 h)	22.40 %	12.20 %	4.94 %	14.09 %	83.01 %	30.03 %

In Tabelle 10 sind die prozentualen Variationskoeffizienten [CV (%)] getrennt nach den einzelnen Analyten und Temperaturen aufgelistet. Die Variationskoeffizienten stellen dabei ein Maß für die relative Streuung der Proben um die Mittelwerte dar. Die Ergebnisse für das Serum mit Venofer zeigen, dass die Streuung geringer ausfällt, wenn ein Sammelintervall von 0 bis 1 Stunde bis zur Rivanolfällung eingehalten wurde, im Vergleich zur Inklusion aller Zeitpunkte (0 – 4 h bis zur Rivanolfällung). Dies traf zu bei 4 °C und 25 °C, jedoch nicht bei einer Lagertemperatur von 37 °C bis zur Rivanolfällung.

4 Schlussbetrachtung

Bei pharmakokinetischen Studien werden Plasmakonzentrationen verabreichter Medikamente untersucht. Dabei werden die Plasmaspiegel des verabreichten Medikaments zu unterschiedlichen Zeitpunkten erhoben, um Informationen über Verteilung, Aufnahme und Elimination zu gewinnen (Aarons and Ogungbenro, 2010).

Bei der Verabreichung von intravenösen Eisenpräparaten befindet sich der aktive Wirkstoff im Eisenkern eines Nanopartikels, wobei der Kern durch eine Hülle aus Kohlenhydraten stabilisiert wird. Die Eisennanopartikel sind sehr stabil und wurden so entwickelt, dass das Eisen aus dem Kern möglichst erst nach Aufnahme der Nanopartikel durch Makrophagen des retikuloendothelialen Systems intrazellulär freigesetzt wird. Anschließend wird das Eisen über Ferroportin an die Blutbahn abgegeben, wo es vom Eisen-transportprotein Transferrin komplexiert wird (Nikraves *et al.*, 2020).

Instabilere Eisenpräparate können jedoch bereits im Plasma Eisen freisetzen, das bei ausreichend verfügbaren freien Eisenbindungsstellen im Plasma an Transferrin bindet (Pai *et al.*, 2017).

Um die Stabilität von intravenösen Eisenpräparaten, etwa bei Bioäquivalenzstudien von generischen und originalen Präparaten zu untersuchen, wird daher auch Transferrin-gebundenes Eisen analysiert (Auerbach and Ballard, 2010).

Die genauen Bedingungen nach der Blutabnahme sowie während der Probengewinnung, die nötig sind, um verlässliche Ergebnisse zu erhalten, sollten vor der Durchführung klinischer Studien untersucht werden und waren Untersuchungsgegenstand dieser Arbeit (Auerbach and Ballard, 2010).

Im klinischen Setting werden den Patienten bei Bioäquivalenzstudien vor Studienbeginn (Baseline) sowie zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der intravenösen Eisengabe Blutproben abgenommen, um verschiedene Parameter zu analysieren. Transferrin-gebundenes Eisen ist dabei einer der Parameter, der in Serumproben untersucht werden kann. Nach der Blutabnahme muss die natürlich einsetzende Blutgerinnung bei Raumtemperatur abgewartet werden, bevor das Serum durch Zentrifugation gewonnen wird. Anschließend müssen die Serumproben gesammelt und für den Transport vorbereitet werden (Auerbach and Ballard, 2010).

In dieser Studie wurde untersucht, welche Zeitspanne und welche Temperatur bei der Aufarbeitung der Blutproben eingehalten werden sollte, um stabile Ergebnisse zu erhalten.

In der Studie wurde mit kommerziell erhältlichem, gepooltem humanem Serum gesunder Probanden (von Sigma) gearbeitet. Da die Eisenpräparate für Patienten mit Eisenmangelanämie entwickelt wurden, wurde im ersten Schritt versucht, durch Zusatz von Apo-Transferrin ein Serum zu erhalten, das dem eines eisendefizienten Patienten ähnlicher ist. Dazu wurde das Serum mit unterschiedlichen Konzentrationen an Apo-Transferrin gepikt, um ein Serum mit einer geringeren Transferrin-Beladung zu erhalten. Es konnte gezeigt werden, dass der Zusatz von Apo-Transferrin den prozentualen Anteil an Apo-Transferrin im Serum erhöht. Auf Basis dieser Ergebnisse wurde eine geeignete Konzentration an Apo-Transferrin-Spike ausgewählt, mit der die weiteren Versuche durchgeführt wurden. Ziel war es, in der Studie, anstelle von „normalem Serum“ (= gepooltes Serum gesunder Probanden) mit hoher Transferrinsättigung, ein Serum mit geringerer Transferrinsättigung einzusetzen, ähnlich der Transferrinsättigung bei Patienten mit Eisenmangelanämie.

Im nächsten Schritt wurde das mit einer einheitlichen Konzentration an Apo-Transferrin gespikte Serum mit Venofer versetzt und für 15 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die Venofer-Konzentration entsprach dabei etwa der nach einer i.v. Eisengabe zu erwartenden Plasmakonzentration nach Gabe von 200 mg Eisen, wenn von einem Verteilungsvolumen von 3,5 Liter ausgegangen wird.

Die Grundlage für diese Annahme und Berechnung der Plasmakonzentration von Venofer stammt aus einer Untersuchung von Danielson und Kollegen, die bei ihren Berechnungen zu dem Schluss kamen, dass das Verteilungsvolumen etwa dem Plasmavolumen entspricht (Danielson *et al.*, 1996).

Anschließend wurde das Venofer enthaltende Serum zur Überprüfung der Stabilität der Transferrin-Beladung bei unterschiedlichen Umgebungstemperaturen und unterschiedlichen Zeiten belassen, bevor eine Rivanolfällung durchgeführt wurde. In den Untersuchungen wurden für die Proben entweder auf Eis (etwa 4 °C) beziehungsweise in temperierten Wasserbädern bei 25 °C und 37 °C für Null bis vier Stunden belassen. Nach 0 Stunden, 0,5 Stunden, 1 Stunde, 2 Stunden und 4 Stunden wurden jeweils Proben entnommen und sofort mit Rivanol-Fällungsreagenz versetzt. Nach erfolgter Zentrifugation wurde der Überstand (enthält Transferrin) gesammelt, elektrophoretisch aufgetrennt und die Gele mit Amido Black 10B-Färbelösung gefärbt. Apo-, Holo- und monoferrisches Transferrin migrierten dabei im Gel in unterschiedlichen Banden, welche im gefärbten Gel densitometrisch mittels Imaging Software AlphaEase analysiert wurden.

Als Vergleich wurde mit Apo-Transferrin gespiktes Serum (ohne Zusatz von Venofer) den gleichen Temperaturbedingungen unterzogen und zu den gleichen Zeitpunkten die

Rivanolfällung durchgeführt. Die erhaltenen Fällungsüberstände nach der Zentrifugation wurden ebenfalls mittels Harnstoff-Gelelektrophorese und Densitometrie analysiert.

Bei den Seren ohne Venofer kam es praktisch zu keiner Veränderung der prozentualen Anteile der unterschiedlich mit Eisen beladenen Transferrinspezies, unabhängig davon wie viel Zeit bis zur Rivanolfällung verstrichen war und welchen Temperaturbedingungen das Serum zuvor ausgesetzt war.

In den Seren, die mit Venofer 15 Minuten bei 37 °C inkubiert wurden und anschließend dem gleichen Temperatur- und Zeitprotokoll wie das Serum ohne Venofer unterzogen wurden, konnte in Abhängigkeit von der Temperatur bereits nach 30 Minuten eine Veränderung in Richtung eines höheren Anteils an Holo-Transferrin und monoferrischem Transferrin beobachtet werden. Besonders ausgeprägt war dies bei einer Temperatur von 37 °C. Bei 25 °C zeigte sich diese Veränderung ebenfalls beim monoferrischem Transferrin. Bei 4 °C entsprachen die prozentualen Anteile der drei Transferrinspezies zu den Zeitpunkten 0,5 Stunden und 1 Stunde den Anteilen zum Zeitpunkt Null Stunden und blieben damit in diesem Zeitraum konstant. Erst ab 2 Stunden bei 4 °C kam es zu einem deutlichen Anstieg der Anteile von Holo-Transferrin und monoferrischem Transferrin.

Wurde die Streuung der Messwerte für Proben untersucht, die nach unterschiedlichen Zeitpunkten mit Rivanol gefällt wurden, zeigte sich bei Serum ohne Venofer nur eine relativ gering Streubreite, was auf eine stabile Transferrin-Beladung hindeutet.

Jansen und Kollegen berichteten, dass Untersuchungen zur Langzeitstabilität von Parametern des Eisenstoffwechsels ergeben haben, dass Transferrin und die damit im Zusammenhang stehende UIBC (Abkürzung aus dem Englischen für „unsaturated iron binding capacity“) einen relativ stabilen Parameter darstellen, wenn die Proben bei -20 °C, -70 °C und -196 °C für ein Jahr gelagert wurden (Jansen, Beekhof and Schenk, 2013).

Ohne Zusatz von Venofer war die Transferrin-Beladung in der vorliegenden Studie auch bei Lagerungstemperaturen von etwa 4 °C (auf Eis), sowie bei 25 °C und 37 °C über mehrere Stunden stabil. Dies stimmt mit den Empfehlungen für die Prozessierung und Aufbewahrung der Proben nach der Blutabnahme überein. Die präanalytischen Bedingungen wurden in einem Artikel von Pfeiffer und Looker auf Seite 1608S, letzter Absatz, wie folgt sinngemäß zusammengefasst (Pfeiffer and Looker, 2017):

„Vollblut sollte gekühlt gelagert werden und für die Bestimmung von Eisen sollte die Gewinnung von Serum durch Zentrifugation am gleichen Tag erfolgen und zur Bestimmung von Serumferritin und löslichem Transferrinrezeptor innerhalb einiger Tage. Das gewon-

nene Serum wäre zumindest eine Woche bei einer Lagertemperatur von 4 °C und zumindest ein Jahr bei einer Temperatur von –20 °C stabil und könne zusätzlich bis zu drei Einfrier-/Auftau-Zyklen unterzogen werden“ [angelehnt an (Pfeiffer and Looker, 2017), Seite 1608S, letzter Absatz].

Bei den Seren mit Venofer kam es hingegen für die einzelnen Transferrinspezies bei Zusammenfassung der Messwerte, die nach unterschiedlichen Zeitpunkten mit Rivanol gefällt wurden, zum Teil zu erheblichen Streuungen der Messergebnisse, wenn Proben vor der Rivanolfällung zwischen 0 – 4 h gelagert wurden. Die Streuung der Daten reduzierte sich jedoch, wenn nur Messwerte inkludiert wurden, bei denen die Proben nach maximal einer Stunde mit Rivanol gefällt wurden und die Lagerung vor der Rivanolfällung entweder bei etwa 4 °C (auf Eis) oder bei 25 °C (im temperierten Wasserbad) stattfand.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass nach Verabreichung von Venofer selbst bei einer Einhaltung der Empfehlungen zur Präanalyse zur Serumgewinnung und Lagerung, wie sie beispielsweise von Pfeiffer und Looker beschrieben wurden, die Ergebnisse einer pharmakokinetischen Studie für Transferrin-gebundenes Eisen, zu stark streuenden Ergebnissen führen würden. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Untersuchung legt jedoch nahe, dass im Vergleich zu den von Pfeiffer und Looker beschriebenen, relativ einfach einzuhaltenden Präanalyse-Empfehlungen ein deutlich strikteres präanalytisches Vorgehen bei allen Patientenproben erforderlich ist (Pfeiffer and Looker, 2017).

Die Stabilität von Venofer liegt im Vergleich zu anderen intravenösen Eisenpräparaten im unteren Bereich (Auerbach and Macdougall, 2017) und die Aussagen dieser Studie sollten daher als Präparate spezifisch eingestuft werden.

Bei der Planung pharmakokinetischer Studien mit anderen Eisenpräparaten sollten die Bedingungen der Präanalyse jeweils separat für das spezifische Präparat untersucht werden, um entsprechende Empfehlungen für präanalytische Bedingungen formulieren zu können.

5 Conclusio

Diese Studie zeigt, dass die Transferrin-Beladung im Serum stabil ist, jedoch nicht über einen längeren Zeitraum in Gegenwart von Venofer, einem Eisensaccharat. Daher ist bei der Durchführung pharmakokinetischer Studien mit Eisensaccharat, in denen Transferrin-gebundenes Eisen als Parameter gemessen wird, ein genaues Temperatur- und Zeitmanagement bei der Probengewinnung und -aufarbeitung erforderlich.

Soweit möglich, sollten alle Schritte auf Eis durchgeführt werden. Den Ergebnissen dieser Studie zufolge sollte die Probenaufarbeitung bei Umgebungstemperaturen von 4 °C und 25 °C nicht länger als eine Stunde dauern.

6 Verzeichnisse

6.1 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
ad	bis zu
AF	Autofokus
ApoTf	Apo-Transferrin
APS	Ammoniumpersulfat
C	Kontrolle
ca.	Circa
C-Domäne	Carboxyterminale Domäne
cm	Centimeter
CV (%)	Variationskoeffizient (in %)
DNA	Desoxyribonukleinsäure (Deoxyribonucleic acid)
DMT1	Divalent Metal Transporter 1
EMUI	Emotion UI (Huawei Benutzeroberfläche)
ESA	Erythropoese-stimulierende Substanzen
F	Blendenzahl
Fe	Eisen
Fe ²⁺	zweiwertiges Eisenion
Fe ³⁺	dreiwertiges Eisenion
Fe-Tf	Eisentransferrin
Fps	Frames per Second (Bilder pro Sekunde)
g	Gramm
h	Stunde
HCl	Salzsäure
HoloTf	Holo-Transferrin
hTf	humanes Transferrin

Abkürzung	Bedeutung
i.v.	Intravenös
IgG	Immunglobulin G
ivFe	Intravenöses Eisen
kDa	Kildodalton
L	Liter
LED	Light Emitting Diode (Leuchtdiode)
M	Molar
mA	Milliampere
mg	Milligramm
mg/ml	Milligramm pro Milliliter
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MonoTf	Monoferisches Transferrin
MP	Megapixel
MT-2	Matriptase-2
NaCl	Natriumchlorid
N-Domäne	Aminoterminal Domäne
P	Probe
P	Progressive Scan (Bildwiedergabeverfahren)
pH	Maß für den Säure- bzw. Basengehalt einer Lösung
PP	Polypropylen
RBC	rote Blutkörperchen
rpm	Umdrehungen pro Minute (revolutions per minute)
Steap3	Six transmembrane epithelial antigen of prostate 3
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Tf	Transferrin
TfR	Transferrinrezeptor
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethane
TSAT	Transferrinsättigung
V	Volt
W	Watt

6.2 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.

Abbildung 1: Mechanismen der Hepcidin vermittelten Eisenregulation	12
Abbildung 2: Darstellung der Holo- und Apo-Transferrin-Struktur auf Einzelmolekülebene	14
Abbildung 3: Aufbau der Doppelgießvorrichtung Mighty Small SE 245 Dual Gel Caster (Hoefer Scientific Instruments).	22
Abbildung 4: Elektrophorese-Apparatur während des Pre-Runs bei 120 V (links) und während des Runs bei 150 V (rechts) im Kühlschrank (4 °C).	25
Abbildung 5: Filtration der gebrauchten Destain-Lösung mit Aktivkohle.....	27
Abbildung 6: Beschriftete Eppendorf-Gefäße (P1 – P6 und P11 – P16) mit gespickten Proben sowie Vergleichsproben (Apo-Tf, Holo-Tf, Apo-Tf + HoloTf).....	33
Abbildung 7: Darstellung der gegossenen Gele (links) und des Durchspülens mittels Spritze und Kanüle mit Puffer vor dem Lauf (rechts)	40
Abbildung 8: Aufgetragene Proben von Gel 5 und 6 vor dem Lauf (links) und der Elektrophorese-Run der Gele im Kühleq 0/15 ° (rechts).	41
Abbildung 9: Färben der Gele auf Belly Dancer (rotierende Platte).....	43
Abbildung 10: Fotoaufnahme eines der gefärbten Gele (Gel 4) auf der LED-Leuchtplatte	44
Abbildung 11: Verteilung der Transferrinspezies nach Zugabe von 0 bis 50 µg Apo-Transferrin als Spike zu gepooltem humanem Serum gesunder Probanden (von Sigma)	48
Abbildung 12: Verteilung der Transferrinspezies nach Zugabe von 0 bis 50 µg Apo-Transferrin als Spike zu gepooltem humanem Serum gesunder Probanden (von Sigma), getrennt in Apo-, Mono- und Holo-Transferrin	49
Abbildung 13: Prozentualer Anteil der einzelnen Transferrinspezies am gesamten Transferrin nach Zugabe von Apo-Transferrin als Spike zu gepooltem humanem Serum gesunder Probanden (von Sigma).	50

Abbildung 14: Prozentualer Anteil der einzelnen Transferrinspezies am gesamten Transferrin nach Zugabe von Apo-Transferrin als Spike zu gepooltem humanem Serum gesunder Probanden (von Sigma).....	51
Abbildung 15: Zeitlicher Verlauf der Transferrin-Beladung von gepooltem humanem Serum gesunder Probanden (von Sigma) bei Inkubation unter verschiedenen Temperaturbedingungen bis zur Rivanolfällung.....	53
Abbildung 16: Abhängigkeit der Transferrin-Beladung in unbehandeltem Serum (ohne i.v.-Eisenzusatz) in Abhängigkeit der Temperatur.....	55
Abbildung 17: Einfluss der Inkubationstemperatur bis zur Rivanolfällung bei unterschiedlichen Lagerungstemperaturen auf den prozentualen Anteil von Apo-Transferrin, monoferrischem Transferrin und Holo-Transferrin im Serum (ohne i.v.-Eisenzusatz).....	56
Abbildung 18: Zeitverlauf der einzelnen Transferrinspezies in Serum mit Venofer bis zur Rivanolfällung bei unterschiedlichen Temperaturen	58
Abbildung 19: Abhängigkeit der Transferrin-Beladung im Serum mit Venofer in Abhängigkeit der Temperatur getrennt nach Inkubationstemperatur.....	60
Abbildung 20: Einfluss der Inkubationstemperatur bis zur Rivanolfällung bei unterschiedlichen Lagerungstemperaturen auf den prozentualen Anteil von Apo-Transferrin, monoferrischem Transferrin und Holo-Transferrin am gesamten Transferrin im Serum mit ivFe (Venofer).....	61
Abbildung 21: Einfluss der Lagertemperatur auf die einzelnen Transferrinspezies bis zur Rivanolfällung im Zeitraum von 0 – 4 h.....	63
Abbildung 22: Einfluss der Lagertemperatur auf die einzelnen Transferrinspezies bis zur Rivanolfällung im Zeitraum von 0 – 1 h.....	64

6.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Ansatz 1 – Mischung von Serum mit Apo-Transferrin (5 mg/ml) und destilliertem Wasser für die Proben P1 – P6 (Vorversuch Spiking).....	30
Tabelle 2: Ansatz 1 – Mischung von Serum mit Apo-Transferrin (10 mg/ml) und destilliertem Wasser für die Proben P11 – P16 (Vorversuch Spiking).....	30
Tabelle 3: Probenaufteilung der gespikten Proben P1 – P6 mit den Vergleichsproben (Apo-Tf, Holo-Tf, Apo-Tf + HoloTf)	33
Tabelle 4: Probenaufteilung der gespikten Proben P11 – P16 mit den Vergleichsproben (Apo-Tf, Holo-Tf, Apo-Tf + HoloTf)	33
Tabelle 5: Ansätze der Probenmischungen für die Inkubation mit intravenösem Eisen (Venofer).....	37
Tabelle 6: Ansätze der Probenmischungen für die Inkubation ohne intravenöses Eisen (Kontrolle)	37
Tabelle 7: Inkubationsschema der Proben mit intravenösem Eisen bei verschiedenen Temperaturen und Zeiten	37
Tabelle 8: Inkubationsschema der Proben ohne intravenöses Eisen (Kontrollproben) bei verschiedenen Temperaturen und Zeiten	38
Tabelle 9: Auftragsschema der Proben bei der Harnstoff-Gelelektrophorese.....	41
Tabelle 10: Relative Streuung der Einzelwerte in Abhängigkeit der Temperatur und Zeit bis zur Rivanolfällung	65

6.4 Hilfsmittelverzeichnis

Hilfsmittel	Einsatzform	Betroffene Teile	Bemerkungen
Google Translate	Übersetzung von Textpassagen	Abstract Kapitel 1	Vorschläge wurden überarbeitet
Microsoft Word	Textverarbeitung Dokumenterstellung	Gesamte Arbeit	
Microsoft Word	Tabellenerstellung	5.1 5.4	
Microsoft Excel	Tabellenerstellung	2.2.2 2.3.3.1 2.4.2 2.4.3 2.4.4 3.6	
deepL	Übersetzung von Textpassagen	Abstract Kapitel 1	Vorschläge wurden überarbeitet
Chat GPT	Übersetzung von Textpassagen Sprachliche und grammatikalische Bearbeitung	Abstract Zusammenfassung Kapitel 1 Kapitel 2	Vorschläge wurden überarbeitet
Google Scholar	Literaturrecherche	Kapitel 1	
PubMed	Literaturrecherche	Kapitel 1	
Zotero, Zotero Connector	Literaturverwaltung	Kapitel 1 Kapitel 5.5	
AlphaEase FCTM Imaging Software	Quantitative Bildanalyse und Densitometrie	Kapitel 2.1.6 Kapitel 2.4.6	
Graph Pad Prism 5	Statistische Auswertung Diagrammerstellung	Kapitel 2.1.6 Kapitel 2.5.1 Kapitel 3	

6.5 Literaturverzeichnis

Die Verwaltung der Literaturquellen wurde mit der Open Source Software Zotero durchgeführt.

Aarons, L. and Ogungbenro, K. (2010) 'Optimal Design of Pharmacokinetic Studies', *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 106(3), pp. 250–255. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1742-7843.2009.00533.x>.

Ajayi, N.D. *et al.* (2024) 'A Review of Literature on Transferrin: Deciphering its Complex Mechanism in Cellular Iron Regulation and Clinical Implications', *Asian Journal of Research in Infectious Diseases*, 15(1), pp. 9–23. Available at: <https://doi.org/10.9734/ajrid/2024/v15i1321>.

Alleyne, M., Horne, M.K. and Miller, J.L. (2008) 'Individualized Treatment for Iron-deficiency Anemia in Adults', *The American Journal of Medicine*, 121(11), pp. 943–948. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2008.07.012>.

Auerbach, M. and Ballard, H. (2010) 'Clinical Use of Intravenous Iron: Administration, Efficacy, and Safety', *Hematology*, 2010(1), pp. 338–347. Available at: <https://doi.org/10.1182/asheducation-2010.1.338>.

Auerbach, M. and Macdougall, I. (2017) 'The available intravenous iron formulations: History, efficacy, and toxicology', *Hemodialysis International. International Symposium on Home Hemodialysis*, 21 Suppl 1, pp. S83–S92. Available at: <https://doi.org/10.1111/hdi.12560>.

Danielson, B.G. *et al.* (1996) 'Pharmacokinetics of iron(III)-hydroxide sucrose complex after a single intravenous dose in healthy volunteers', *Arzneimittel-Forschung*, 46(6), pp. 615–621.

Davy, P. *et al.* (1982) 'Estimation of the Saturation of Serum Transferrin by an Electrophoretic Technique', *Annals of Clinical Biochemistry: International Journal of Laboratory Medicine*, 19(1), pp. 57–59. Available at: <https://doi.org/10.1177/000456328201900112>.

- Elstrott, B. *et al.* (2020) 'The role of iron repletion in adult iron deficiency anemia and other diseases', *European Journal of Haematology*, 104(3), pp. 153–161. Available at: <https://doi.org/10.1111/ejh.13345>.
- Evans, R.W. and Williams, J. (1980) 'The electrophoresis of transferrins in urea/polyacrylamide gels', *The Biochemical Journal*, 189(3), pp. 541–546. Available at: <https://doi.org/10.1042/bj1890541>.
- Geisser, P. and Burckhardt, S. (2011) 'The pharmacokinetics and pharmacodynamics of iron preparations', *Pharmaceutics*, 3(1), pp. 12–33. Available at: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics3010012>.
- Jansen, E.H.J.M., Beekhof, P.K. and Schenk, E. (2013) 'Long-term stability of biomarkers of the iron status in human serum and plasma', *Biomarkers*, 18(4), pp. 365–368. Available at: <https://doi.org/10.3109/1354750X.2013.781223>.
- Kumar, A. *et al.* (2022) 'Iron deficiency anaemia: pathophysiology, assessment, practical management', *BMJ Open Gastroenterology*, 9(1), p. e000759. Available at: <https://doi.org/10.1136/bmjgast-2021-000759>.
- Luck, A.N. and Mason, A.B. (2012) 'Transferrin-Mediated Cellular Iron Delivery', in *Current Topics in Membranes*. Elsevier, pp. 3–35. Available at: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394390-3.00001-X>.
- Macdougall, I.C. *et al.* (2020) 'Iron Sucrose: A Wealth of Experience in Treating Iron Deficiency', *Advances in Therapy*, 37(5), pp. 1960–2002. Available at: <https://doi.org/10.1007/s12325-020-01323-z>.
- Nemeth, E. and Ganz, T. (2021) 'Hepcidin-Ferroportin Interaction Controls Systemic Iron Homeostasis', *International Journal of Molecular Sciences*, 22(12), p. 6493. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms22126493>.
- Nemeth, E. and Ganz, T. (2023) 'Hepcidin and Iron in Health and Disease', *Annual Review of Medicine*, 74(1), pp. 261–277. Available at: <https://doi.org/10.1146/annurev-med-043021-032816>.

- Nikraves, N. *et al.* (2020) 'Factors influencing safety and efficacy of intravenous iron-carbohydrate nanomedicines: From production to clinical practice', *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 26, p. 102178. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.nano.2020.102178>.
- Pai, A. *et al.* (2017) 'Performance of Redox Active and Chelatable Iron Assays to Determine Labile Iron Release From Intravenous Iron Formulations', *Clinical and Translational Science*, 10(3), pp. 194–200. Available at: <https://doi.org/10.1111/cts.12443>.
- Perewusnyk, G. *et al.* (2002) 'Parenteral iron therapy in obstetrics: 8 years experience with iron–sucrose complex', *British Journal of Nutrition*, 88(1), pp. 3–10. Available at: <https://doi.org/10.1079/BJN2002577>.
- Pfeiffer, C.M. and Looker, A.C. (2017) 'Laboratory methodologies for indicators of iron status: strengths, limitations, and analytical challenges', *The American Journal of Clinical Nutrition*, 106(Suppl 6), pp. 1606S-1614S. Available at: <https://doi.org/10.3945/ajcn.117.155887>.
- Ponka, P. (1999) 'Cellular iron metabolism', *Kidney International*, 55, pp. S2–S11. Available at: <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.1999.055Suppl.69002.x>.
- Roemhild, K. *et al.* (2021) 'Iron metabolism: pathophysiology and pharmacology', *Trends in Pharmacological Sciences*, 42(8), pp. 640–656. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.tips.2021.05.001>.
- Ru, Q. *et al.* (2024) 'Iron homeostasis and ferroptosis in human diseases: mechanisms and therapeutic prospects', *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 9(1), p. 271. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41392-024-01969-z>.
- Sprenger, K.B.G. *et al.* (1987) 'Nomograms for the prediction of patient's plasma volume in plasma exchange therapy from height, weight, and hematocrit', *Journal of Clinical Apheresis*, 3(3), pp. 185–190. Available at: <https://doi.org/10.1002/jca.2920030313>.

Vogt, A.-C.S. *et al.* (2021) 'On Iron Metabolism and Its Regulation', *International Journal of Molecular Sciences*, 22(9), p. 4591. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms22094591>.