

Aus dem Institut für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie des  
Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf  
Abteilung für Molekulare Zellbiologie  
Direktorin: Prof. Dr. Dr. U. Beisiegel

**Methode zur Bestimmung von Vitamin E in Erythrozyten und die  
Bedeutung für eisenüberladene Patienten**

**Dissertation**

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg vorgelegt von

Marianne Frost  
aus Rostock

Hamburg 2002

Angenommen vom Fachbereich Medizin  
der Universität Hamburg am: 28.02.2003

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs  
Medizin der Universität Hamburg

Dekan: Prof. Dr. C. Wagener

Referent: Priv. Doz. Dr. P. Nielsen

Korreferent: Prof. Dr. Dr. U. Beisiegel

# **Inhaltsverzeichnis**

## **1. Einleitung**

### 1.1. Eisenstoffwechsel und Eisenüberladung

- 1.1.1. Intestinale Eisenabsorption **1**
- 1.1.2. Transferrin **2**
- 1.1.3. Depoteisen **3**
- 1.1.4. Eisenmetabolismus in Säugerzellen **4**

### 1.2. Vitamin E

- 1.2.1. Resorption, Transport, Stoffwechsel **5**
- 1.2.2. Funktion des Vitamin E **6**
- 1.2.3. Rolle des Vitamin E in den Erythrozyten **7**
- 1.2.4. Lokalisation in den Erythrozytenmembranen **8**

### 1.3. Thalassämie

- 1.3.1. Pathologie **11**
- 1.3.2. Lipidperoxidation, Eisenstatus und Vitamin E **12**

### 1.4. Hämochromatose **15**

### 1.5. Problemstellung **17**

### 1.6. Ziel der Arbeit **17**

## **2. Material und Methoden**

### 2.1. Probanden **18**

### 2.2. Gewinnung und Lagerung der Probe **19**

### 2.3. Aufarbeitung der Proben **20**

2.4. Bestimmung von $\alpha$ - und $\gamma$ -Tocopherol und Retinol mittels HPLC	21
2.5. Bestimmung von Serumeisen, totaler Eisenbindungskapazität, Transferrinsättigung und Serumferritin	24
2.6. Bestimmung des nicht-transferringebundenen Eisens	24
2.7. Bestimmung der Eisenaufladung von Leber und Milz	25
2.8. Auswertung und Berechnung	25
<b>3. Ergebnisse</b>	
3.1. Methode zur Bestimmung der $\alpha$ -Tocopherolkonzentration in den Erythrozytenmembranen	28
3.2. Vitaminkonzentrationen in der Probandengruppen	31
3.3. Vergleich der Vitaminkonzentrationen und der Eisenparameter	42
3.4. Vitamin E-Substitution von Hämochromatosepatienten	45
<b>4. Diskussion</b>	
4.1. Methodische Ergebnisse zur Messung der $\alpha$ -Tocopherolkonzentration in den Erythrozytenmembranen	47
4.2. Vitamin E und Eisenparameter in den Probandengruppen	
4.2.1. Kontrollgruppe	51
4.2.2. Hereditäre Hämochromatose	51
4.2.3. $\beta$ -Thalassämie major	52
4.3. Bedeutung von Vitamin E in den Erythrozytenmembranen als Parameter für den Ernährungsstatus	56
<b>5. Zusammenfassung</b>	61
<b>6. Literaturverzeichnis</b>	62
<b>7. Danksagung</b>	76
<b>8. Lebenslauf</b>	77

## Abkürzungsverzeichnis

$\alpha$ -TTP	$\alpha$ -Tocopherol Transfer Protein ( $\alpha$ -Tocopherol-bindendes Protein)
Å	Ångström
AAS	Atomabsorptionspektrometrie
BHT	Butylhydroxytoluen
D	Dalton
DNS	Desoxyribonucleinsäure
EDTA	Ethylendiamidtetraaceticacid
HPLC	High pressure liquid chromatography (Hochdruckflüssigkeitschromatography)
IQB	Interquartilenbereich
LDL	Low Density Lipoprotein
MHC	Major Histocompatibility Complex
NTA	Nitrilotriessigsäure
NTBI	Non-transferrin-bound Iron (Nicht-transferrin-gebundenes Eisen)
NADH	Nicotinsäureamid-adeninucleotid
SDS	Sodiumdodecylphosphat
TEBK	totale Eisenbindungskapazität
UEBK	ungesättigte Eisenbindungskapazität

# 1. Einleitung

## 1.1. Eisenstoffwechsel und Eisenüberladung

Eisen spielt eine wichtige Rolle im menschlichen Organismus. Der gesamte Eisengehalt beträgt beim Mann etwa 50 mg/kg Körpergewicht und bei der Frau etwa 35 mg/kg Körpergewicht. Der geringere Eisenbestand der Frau wird auf den erhöhten Verlust durch Menstruation, Schwangerschaft und Stillzeit zurückgeführt. Das Eisen befindet sich zu 67 % im Hämoglobin, zu ca. 30 % im Ferritin, 3 - 4 % im Myoglobin, ca. 0,1 % in Enzymen (Katalase, Cytochrom c) und im Plasma 0,1 - 0,2 % an Transferrin gebunden. Das Plasma des Gesunden enthält kein freies Eisen. Neben seiner essentiellen Bedeutung als Spurenelement hat Eisen auch toxische Wirkungen. Diese bestehen in erster Linie in der katalytischen Funktion bei der Bildung von Sauerstoffradikalen, auf die später näher eingegangen wird. Die eiseninduzierten Radikale reagieren mit DNA, Proteinen und Lipiden (Imlay et al, 1988, Stadtmann,1992).

### 1.1.1. Intestinale Eisenabsorption

Die Absorption des Nahrungseisens erfolgt vor allem im Duodenum und im oberen Jejunum auf verschiedenen Wegen: als porphyrin-gebundenes Eisen, als wasserlösliche  $\text{Fe}^{2+}$ -Chelate sowie als freie  $\text{Fe}^{2+}$ -Ionen.

Das Häm-Molekül wird im Magen unter Proteinasewirkung vom Protein abgetrennt und das Eisen zu  $\text{Fe}^{3+}$  oxidiert, so dass Hämin entsteht, welches als intaktes Molekül in die Mukosazelle gelangt, wo der Porphyrinring durch Hänoxigenase gespalten und das Eisen freigesetzt wird. Ein kleiner Teil des Hämins passiert unverändert die Zelle und wird im Blutplasma an Hämopexin gebunden.

Zweiwertige Eisenionen werden von den Mukosazellen rascher aufgenommen als dreiwertige. Im Zytoplasma wird das Eisen an ein Protein, das dem Transferrin ähnlich ist, gebunden.

Die intestinale Absorptionsrate wird durch erniedrigtes Depoteisen und stimulierte Erythropoese gesteigert.

Ein Teil des Eisens, das über die Mukosa aufgenommen wird, wird innerhalb weniger Stunden an das Plasma abgegeben, ein Teil durch Ferritin aufgenommen. Ferritin-gebundenes Eisen wird entweder an das Zytoplasma abgegeben oder über den Darm ausgeschieden.

### **1.1.2. Transferrin**

Eisen wird im Plasma überwiegend an Transferrin gebunden transportiert. Transferrin wird vorwiegend in den Hepatozyten synthetisiert. Es besteht aus einer glykolysierten Polypeptidkette mit einer Molekülmasse von ca. 90000 Dalton. Es bindet 2 Atome  $\text{Fe}^{3+}$  je Molekül und dient dem Transport des Eisens von der intestinalen Absorptionsstelle bzw. den Orten des Hämoglobinabbaus zum Knochenmark und anderen eisenverbrauchenden und -speichernden Geweben. Transferrinrezeptoren finden sich auf allen sich teilenden Zellen. Die Expression des Transferrinrezeptors steigt bei Zellproliferation und wird als Maß für das Wachstumspotential von in-vivo Tumoren genutzt (Kühn, 1989). Der Transferrinrezeptor besteht aus zwei identischen Untereinheiten mit einer molekularen Masse von 95000 Dalton. Die Expression von Transferrinrezeptoren steigt mit abnehmender Verfügbarkeit von Eisen und sinkt bei zunehmendem Eisenbestand.

Die Gesamtmenge des Plasmatransferrins 3 bis 4 ng muß täglich bis zu 10 mal an die hämoglobinbildenden Zellen herangeführt werden, da täglich 25 bis 30 mg Eisen für die Hämoglobinsynthese benötigt werden. Die Transportkapazität des Transferrins wird nur zu weniger als einem Drittel genutzt.

Die Konzentration des Transferrins beträgt 2,5 - 3,95 mg/l (Gabbe et al., 1982). Konzentrationserniedrigungen können z.B. durch Leberzellinsuffizienz,

Malnutrition, Proteinverlust und kongenitale Atransferrinämie bedingt sein. Außerdem kommt es im Rahmen von Entzündungen, Traumata, Verbrennungen zur Transferrinerniedrigung. Bei Eisenmangel steigt die Serumtransferrinkonzentration, bei endogener oder exogener Eisenüberladung sinkt sie.

### **1.1.3. Depoteisen**

Eisen wird intrazellulär an Ferritin und Hämosiderin gebunden gespeichert. Ferritin ist ein sphärisches hochmolekulares Protein (Molmasse 450000 D), welches aus einer Hülle von 20 bis 24 glykosylierten Proteinuntereinheiten besteht, die einen Kern aus Eisenhydroxidphosphat umgeben. Pro Molekül Ferritin können 4500 Atome Eisen aufgenommen werden. Bindung und Ablösung des Eisens vom Ferritin gehen mit einer Reduktions- bzw. Oxidationsreaktion einher.  $\text{Fe}^{2+}$  wird während oder nach der Bindung an Ferritin zu  $\text{Fe}^{3+}$  oxidiert und dadurch am Molekül fixiert. Die Ablösung erfolgt durch Reduktion.

Die physiologische Bedeutung besteht in Speicherung, Transport und Abbau des Eisens. Da die Höhe des Serumferritins mit der Höhe des Gesamtkörpereisen-Pools korreliert, hat das Serumferritin hierin seine klinische Bedeutung. Serumferritin unterscheidet sich von Ferritin aus Gewebe durch seine verlängerte Halbwertszeit, die für Serumferritin 30 Stunden beträgt im Gegensatz zu 3 bis 30 Minuten im Gewebe. Bei erschöpfte Eisenspeichern durch Eisenmangel finden sich weniger als 12  $\mu\text{g/l}$  Ferritin, bei Eisenüberladung mehr als 300  $\mu\text{g/l}$ .

Hämosiderin ist ebenfalls ein Eisen-Protein-Komplex, der im Vergleich mit Ferritin kaum wasserlöslich ist und die weniger verfügbare Form des Speichereisens darstellt. Es entsteht wahrscheinlich aus Ferritin nach prolongierter zellulärer Eisenspeicherung.



#### **1.1.4. Eisenmetabolismus in Säugerzellen**

An Transferrin gebundenes Eisen wird nach vorübergehender Bindung an Zellmembranrezeptoren durch Pinozytose aufgenommen. Intaktes eisenfreies Transferrin wird durch Exozytose nach extrazellulär abgegeben. Bei Passage durch die Mitochondrienmembran wird Eisen reduziert und an Strukturen der mitochondrialen Matrix gebunden, von wo es während der Hämsynthese in den Erythroblasten freigesetzt wird. Andere Mechanismen der Eisenaufnahme in Säugerzellen sind Absorption, Flüssigphasenendozytose oder Aufnahme von nicht-transferrin-gebundenem Eisen, insbesondere wenn Transferrin mit Eisen gesättigt ist. Diese Mechanismen spielen besonders bei der Eisenaufnahme in die Hepatozyten und der eiseninduzierten Organschädigung bei Eisenüberladung eine wichtige Rolle.

## 1.2. Vitamin E

Seitdem das Vitamin E 1922 entdeckt wurde, ist viel über diesen Stoff bekannt geworden. Als Vitamin E werden 8 natürlich vorkommende chemisch nahe verwandte Verbindungen bezeichnet, die aus einem Chromanolring mit zwei bis vier Methylgruppen und einer gesättigten oder ungesättigten C<sub>16</sub>-Seitenkette bestehen. Die acht natürlichen Vitamin-E-Verbindungen gliedern sich in vier Tocopherole ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - und  $\delta$ -Tocopherol) mit ungesättigter Seitenkette und vier Tocotrienole ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - und  $\delta$ -Tocotrienole). All-rac- $\alpha$ -Tocopherol ist das total-synthetische Vitamin E bestehend aus acht Stereoisomeren, von denen RRR- $\alpha$ -Tocopherol das wirksamste ist. RRR- und SRR- $\alpha$ -Tocopherol sind verschiedene Konfigurationen des  $\alpha$ -Tocopherol. Vitamin E ist lipidlöslich.

### 1.2.1. Resorption, Transport und Stoffwechsel

Vitamin E wird im Darm hydrolysiert, so dass nur freie Tocopherole mit den Fetten in die Lymphe gelangen. Es werden 25–30 % des  $\alpha$ -Tocopherols resorbiert (Bieri, 1983). Von dort gelangt es als Bestandteil der Chylomikronen ins Blut und wird rasch an die Plasmalipoproteine abgegeben. Vitamin E ist eine lipophile Substanz, die zusammen mit den Plasmalipiden im Blutkreislauf transportiert wird. Ein spezifischer Carrier im Plasma wurde nicht gefunden. Man fand eine hochgradige Korrelation zwischen dem Tocopherol-Plasmaspiegel und den Gesamtplasmalipiden, dem Gesamtplasmacholesterin und LDL (Bieri, 1983, Chow, 1985, Kayden, 1983). Traber (1990) beobachtete, dass sich RRR- $\alpha$ -, SRR- $\alpha$ - und  $\gamma$ -Tocopherol direkt nach der Gabe in gleichen Konzentrationen im Plasma fanden und 24 Stunden nach der Gabe RRR- $\alpha$ -Tocopherol dominierte. In einer weiteren Arbeit wurde gezeigt, dass bei Patienten mit familiärem Vitamin E-Mangel die Fähigkeit fehlte,  $\alpha$ -Tocopherol, das in den

Chylomikronen und im Plasma rasch nach der intestinalen Absorption anstieg, in die durch die Leber gebildeten Lipoproteine (VLDL) einzubauen. Damit wurde vermutet, dass diesen Patienten ein Tocopherol-bindendes Protein der Leber fehlt, das in der Lage wäre RRR- $\alpha$ -Tocopherol an die VLDL (very low density lipoproteins) abzugeben (Traber, 1990(2)).

Für die Rattenleber wurde ein  $\alpha$ -Tocopherol-bindendes Protein ( $\alpha$ -TTP) von Sato (1991) und Yoshida (1992) identifiziert. Im Jahre 1995 wurde dann die cDNA des  $\alpha$ -Tocopherol-bindenden Proteins des Menschen durch Arita et al. identifiziert. Dieses Protein bestehend aus 278 Aminosäuren und entspricht zu 94 % dem  $\alpha$ -TTP der Ratte. Es wurde bisher nur in den Leberzellen gefunden. Außerdem wurde bei Patienten mit der seltenen autosomal rezessiven Ataxie, die mit Vitamin E-Mangel einhergeht (AVED, Ataxia with isolated vitamin E deficiency), Mutationen des  $\alpha$ -TTP identifiziert (Ouahchi et al, 1995).

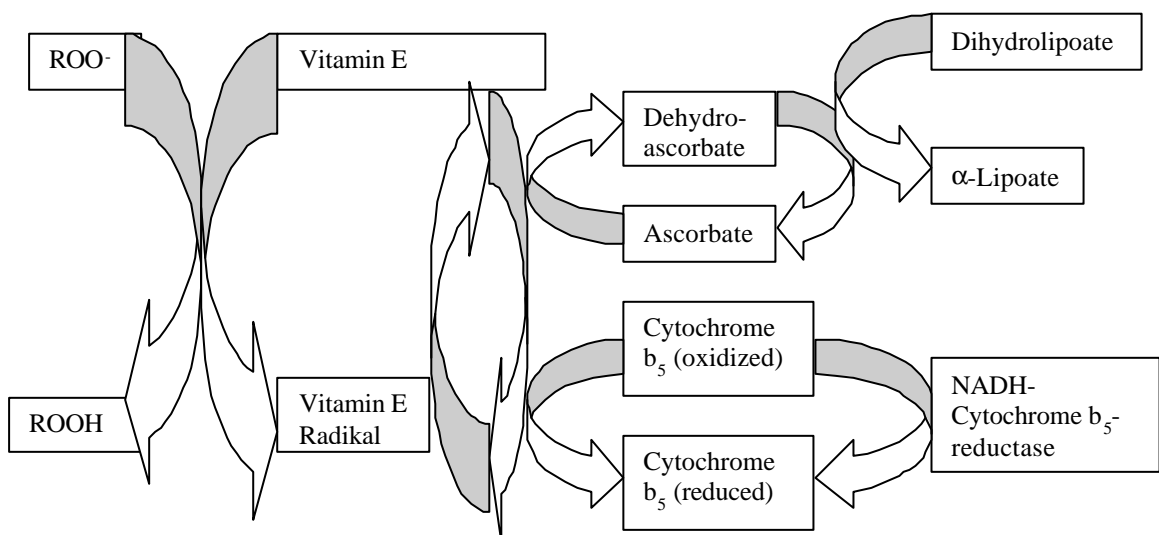
### **1.2.2. Funktion des Vitamin E**

Die wichtigste Funktion des Vitamin E besteht in dem Schutz der Zelle vor Lipidperoxidation. Dabei handelt es sich um eine Kettenreaktion, die durch die Radikale des Sauerstoffs ausgelöst werden kann und die Lipide und Proteine von zellulären Membranen angreift. Metallionen, wie z.B. Eisen, können diese Kettenreaktion katalysieren. Zum Schutz vor Lipidperoxidation dienen zelluläre Abwehrsysteme, wie das Glutathion-Peroxidase-System, die Superoxid-Dismutase und die Katalase sowie die Vitamine E und C. Dabei ist Vitamin E das einzige lipidlösliche kettenabbrechende Antioxidant (Burton et al., 1983, Ingold et al., 1987), das sich in den Membranen befindet, während die anderen im Zytoplasma wirken.

### 1.2.3. Rolle des Vitamin E in den Erythrozyten

Erythrozyten sind Sauerstoff und seinen Radikalen besonders ausgesetzt. Aus dem Zellinneren führt die kontinuierliche Umwandlung von Oxyhämoglobin zu Methämoglobin zur Entstehung des Superoxidanions (Carrel et al., 1975). Von außen können Hydrogenperoxid und Superoxidanion, die durch Granulozyten und Macrophagen abgegeben werden, potentiell schädlich für die Erythrozyten sein (Salin, 1975, Weiss 1980 und 1981).

Eine neuere Arbeit (Belizzi et al., 1996) zeigte, dass die Bindung von  $\alpha$ -Tocopherol an Erythrozyten reversibel ist und gesättigt werden kann. Der Tocopherol-Transport in den Rattenerthrozyten findet mit einem stündlichen Transport von 26 % statt. Dabei wird das Vitamin E vom Erythrozyt zum



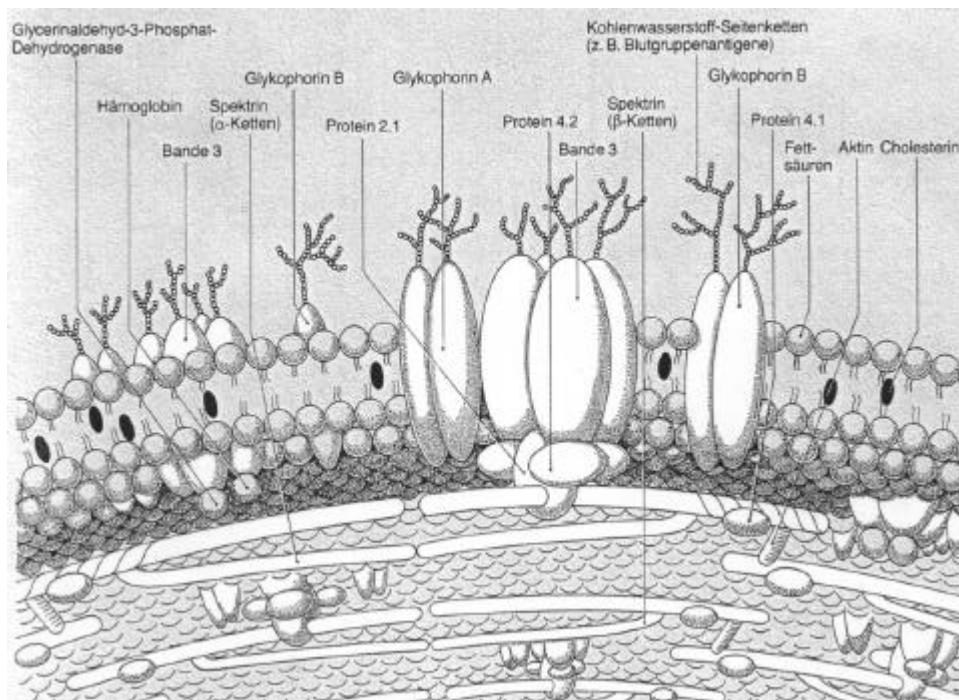
**Abb. 1** Enzymatische und nichtenzymatische Wege des Vitamin E-Recycling in menschlichen Erythrozytenmembranen (modifiziert nach Constantinescu et al., 1993)

LDL abgegeben (Silber, 1969). Außer durch Auffüllung aus dem Plasmalipidpool kann Vitamin E in den Membranen auf enzymatischem Wege wieder zur Verfügung gestellt werden.

Durch Reaktion mit Fettsäuren entsteht aus Vitamin E das Vitamin E Radikal.

Abbildung 1 zeigt verschiedene Wege, wie das Vitamin E Radikal wieder in Vitamin E zurückreduziert werden kann. Einer davon ist der Abbau von Ascorbinsäure, die sich wiederum durch Umbau von Dihydrolipoat in  $\alpha$ -Liponsäure reduziert (Kagan et al., 1992). Ein anderer Weg ist der enzymatische durch die membrangebundene NADH-abhängige Cytochrom- $b_5$ -Reduktase, die in den Erythrozytenmembranen vorhanden ist (Constantinescu et al., 1993).

#### 1.2.4. Lokalisation von Vitamin E in Erythrozytenmembranen



**Abb. 2** Aufbau einer Erythrozytenmembran (mit freundlicher Genehmigung des Thieme-Verlages, Siegenthaler, 1998)

Um die Effekte, die die Lipidperoxidation auf die Erythrozytenmembranen haben könnte, zu verstehen, ist es notwendig, die Struktur der Erythrozytenmembran zu kennen. Die Erythrozytenmembran besteht aus einer Phospholipiddoppelschicht, die sich aus ca. 1,3 mg Cholesterol und 3 mg Phospholipiden pro  $10^{10}$  Zellen zusammensetzt. In die Doppelmembran integriert sind verschiedene Proteine (Abb. 2). Das besondere an Erythrozytenmembranen ist, dass die Fähigkeit durch Oxidation geschädigte Proteine und Lipide zu ersetzen, limitiert ist. Dafür existieren in allen Zellen wirksame Mechanismen zum Schutz vor Radikalen, wie Katalase, Glutathionperoxidase, Superoxiddismutase sowie die Vitamine E und C.

Ein wichtiger Abwehrmechanismus gegen oxidative Schäden ist die Membranstruktur. Bei Krankheiten, die mit Erythrozytenmembrandefekten einhergehen, reagierten die Erythrozyten empfindlicher auf die Lipidperoxidation als normale Erythrozyten (Stocks et al., 1971 und 1972).

Lipidperoxidation verändert die Membranpermeabilität so, dass sie durchlässiger für Kaliumionen wird, dem folgt eine erhöhte Wasserpermeabilität, die in der Lyse der Erythrozyten resultiert (Chiu et al., 1989). Außerdem führt die Lipidperoxidation zu Zellmembrandeformierung (Chiu et al., 1989) und vermehrter Rigidität der Phospholipiddoppelmembran (Dobretsov et al., 1977).

Vitamine E ist Bestandteil von Erythrozytenmembranen. Dabei geht die Hydroxylgruppe nahe der wasserlöslichen Seite eine Hydrogenbindung mit der Carbonylgruppe der Phospholipide ein und die hydrophobe Phytlyseitengruppe ist im Inneren der Membran eingebettet (Ekiel et al., 1988). Dies erhöht die Aufnahme und Abgabe in die Membranen, verringert aber die Beweglichkeit innerhalb und zwischen den Membranen. Es wurde nachgewiesen, dass die Effektivität der Inhibition der Lipidperoxidation durch Vitamin E in Membranen und LDL geringer ist, als in homogener Lösung (Niki, 1993). Die laterale Beweglichkeit des  $\alpha$ -Tocopherol ist im Gegensatz zur vertikalen sehr hoch (Ekiel et al., 1988), was dafür spricht, dass der sehr kleine Anteil an  $\alpha$ -Tocopherol im Vergleich zu den

Phospholipiden deren Oxidation effektiv unterdrücken kann (Niki, 1993). Alpha-Tocopherol ist in beiden Hälften einer Lipiddoppelmembran lokalisiert, mit der hydrophileren Seite näher der Lipid-Wasser-Überganges. Die Methylgruppe an Position 5 in der inneren Schicht muß mindestens 40 Å vom Wasserübergang der äußeren Schicht entfernt sein (Perly et al., 1985).

## 1.3. Thalassämie

### 1.3.1. Pathologie

Bei der Thalassämie handelt es sich um eine heterogene Krankheitsgruppe, der eine genetisch bedingte Synthesehemmung einer bezüglich der Aminosäuresequenz normalen  $\alpha$ - oder  $\beta$ -Kette des Hämoglobins, zu Grunde liegt. Die Thalassämien resultieren aus der Interaktion unterschiedlicher molekularer Defekte. Die Klassifikation erfolgt danach, welche Globinketten vermindert gebildet werden, in die Subtypen  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\delta\beta$ -,  $\delta$ - und  $\gamma\delta\beta$ -Thalassämien. Die  $\beta$ -Thalassämien sind in Italien und Griechenland am häufigsten, die  $\alpha$ -Thalassämien in Südostasien. Die Erythrozytenlebensdauer ist in der Regel verkürzt. Ursache hierfür sind die im Überschuß vorhandenen komplementären Polypeptidketten, die als Di- und Tetramere instabile, rasch denaturierende Hämoproteine bilden. Je nach klinischem Schweregrad werden die Thalassämien in eine Thalassämia major (homozygote  $\beta$ -Thalassämie), intermedia (häufig homozygote oder doppelt heterozygote Anlage einer leichten  $\beta$ -Thalassämie) und minor (leichte oder keine Anämie bei morphologisch auffälligen Erythrozyten) eingeteilt. Die  $\beta$ -Thalassämie major entwickelt sich einige Monate nach der Geburt, wenn HbF durch HbA<sub>1</sub> ersetzt werden sollte. Es entsteht eine schwere hypochrome Anämie mit hochgradiger Aniso- und Poikilozytose, Schießscheibenzellen und vereinzelt Normoblasten als Zeichen eines erhöhten Erythrozytenumsatzes im Blutausschlag. Die Milz nimmt an Größe stark zu. Röntgenologisch ist ein Büstenschädel als Folge der Knochenmarkhyperplasie bei ineffektiver Erythropoese sichtbar. Die Kinder sind in ihrer Entwicklung gehemmt und infektanfällig. Ohne Transfusionstherapie sterben mehr als 80 % der Kinder in den ersten 5 Lebensjahren. Durch regelmäßige Bluttransfusionen werden Hämoglobinkonzentrationen über 9 g/dl angestrebt. Diese sind alle drei bis vier Wochen notwendig. Durch den erhöhten Anfall der Erythrozytenabbauprodukte kommt es zur Eisenüberladung mit schwerwiegenden Organschädigungen. Als Therapie wird subkutan



Desferrioxamin oder oral Deferiprone verabreicht. Außerdem profitieren die Patienten von Splenektomie und allogener Knochenmarkstransplantation.

### **1.3.2. Lipidperoxidation, Eisenstatus und Vitamin E**

In verschiedenen Studien wurden niedrige Vitamin E-Serumspiegel bei  $\beta$ -Thalassämiepatienten bestimmt (Zannos-Mariaola et al, 1974, 1978, Stocks et al, 1972, Rachmilewitz et al, 1976). Es wurde ein schützender Effekt des Vitamin E gegen Erythrozytenhämolyse beobachtet (Bieri, 1983, Vatanavicharn, 1985). Therapie mit einem der Chelatoren reduziert die Eisenablagerungen, die in der cytoplasmatischen Oberfläche der Erythrozytenmembranen bei Thalassämie deponiert sind (Shalev, 1995).

Bei den thalassämischen Erythrozyten kommt es zu Veränderungen an den Membranen. Die Unterdrückung der Bildung der  $\beta$ -Ketten führt zu einer Akkumulation der  $\alpha$ -Ketten, die normal ausgebildet sind. Diese präzipitieren und bilden intrazelluläre Einschlüsse, die Heinz-Innenkörper genannt werden (Polliack, 1973). Die Innenkörper interagieren mit der Membran und bilden starre Membranabschnitte, die die Verformbarkeit der Erythrozyten verringern. Membranzerstörende Wirkung der unpaarigen Ketten wurden durch Einschluß von Hämoglobinketten in normale Erythrozyten demonstriert (Repka, 1993, Scott, 1990 und 1993). In diesen Modell-Erythrozyten, die  $\beta$ -Thalassämie-Erythrozyten entsprachen, konnte die Freigabe geringer Mengen freien Eisens von den unpaarigen Hämoglobinketten Redoxreaktionen initiieren, die gleichzeitig das Zellreduktionspotential vermindern, weiteres Hämoglobin reduzieren und den Erythrozytenabbau fördern. Die eisenvermittelte Oxidation von Hämoglobin kann durch einen Eisenchelator vollständig inhibiert werden (Scott, 1995). Für Vitamin E zeigte Scott (1993), dass der Einschluß von  $\alpha$ -Hämoglobin-Ketten in Abwesenheit eines exogenen Oxidants keinen Effekt auf die Membran-Vitamin E-Konzentration im Vergleich zu Kontrollzellen hatte. Wenn die Zellen exogenen Oxidantien ausgesetzt waren, nahm die Vitamin E-Konzentration in den mit  $\alpha$ -

Hämoglobin-Ketten beladenen Zellen schneller ab, als in den Kontrollen. Geringe Konzentrationen an exogenen Oxidantien führten zur schnellen Oxidation der Membranlipide, Verminderung von Membran-Vitamin E, und erhöhte Oxidation cytoplasmatischer Proteine. Der Verlust der Zellstabilität resultierte in verkürzter Lebenszeit der Retikulozyten und Erythrozyten.

Das un stabile Hämoglobin der thalassämischen Erythrozyten, in dem Globinketten defekt oder nicht vorhanden sind, wird zum Hämichrom oxidiert, noch bevor es intrazellulär eingeschlossen wird. Die Bildung der Einschlusskörperchen verursacht oxidativen Stress als Resultat der vermehrten Produktion von Sauerstoff-Radikalen. Die einzelnen Globinketten autooxidieren viel schneller als das Hämoglobin-Tetramer und produzieren dabei oxidierte Hämoglobinketten und Superoxid-Radikale (Brunori, 1975). Dies zeigt, dass sich hinter der Tetramerform des Hämoglobins ein Schutzmechanismus gegen die Oxidantien der Erythrozyten, wie Hydrogen-Peroxid und Superoxid-Anion, verbirgt, der bei der Thalassämie deutlich vermindert ist.

Eisenüberladung wird durch Abbau der unreifen Erythrozytenformen und durch regelmäßige überhöhte Eisenaufnahme durch Bluttransfusionen verursacht (Pearson, 1975, Risdon, 1975).

Die Toxizität des Eisens im Blut entsteht durch unterschiedliche Mechanismen: die Erhöhung des nicht-transferrin-gebundenen Eisens bei gesättigtem Plasmatransferrin (Worwood, 1983), durch die Akkumulation von Hämichrom nahe der Membranoberfläche der Erythrozyten (Rachmilewitz, 1985), durch von seiner Globinbindung gelöstes Hämin (Shaklai, 1985) und durch die Anwesenheit dem Ferritin ähnelnder Eisenresiduen der thalassämischen Erythrozyten (Bauminger, 1979). Diese Faktoren führen zum beschleunigten Abbau der Erythrozyten (Advani, 1992). Folgende biochemische Veränderungen wurden beobachtet: erhöhte intrazelluläre Calciumkonzentration (Rachmilewitz, 1985), verminderte Kaliumkonzentration mit Verlust von Wasser und Verminderung des Zellvolumens und osmotischer Hämolyse (Kahane, 1976). Das Resultat ist das Schrumpfen der Zelle, das die Rigidität der Membran erhöht.

De Franchesi et al. (1999) zeigten, dass freies Eisen in Erythrozytenmembranen eine Rolle für den KCl-Cotransport spielt. Deferiprone verringerte freies Eisen der Membranen der  $\beta$ -Thalassämie-Erythrozyten, gefolgt von verringerter KCl-Cotransport-Aktivität und vermehrtem Kalium-Zellinhalt.

Die Heinz-Innenkörperchen der Zellen können in der Milz durch Ausschneiden des umliegenden Membranmaterials entfernt werden. Dies erniedrigt das Verhältnis von Oberflächenmaterial zum Volumen und führt zu weiterer Deformierung und damit zur Verkürzung der Lebenszeit der Zelle. Im peripheren Blut erscheinen die thalassämischen Erythrozyten dann in einer Vielzahl von pathologischen Formen, wie zum Beispiel Schießscheibenzellen, Aniso- und Poikilozytose.

In der  $\beta$ -Thalassemia major scheint die größte Bedrohung für den Erythrozyten durch eiseninduzierte oxidative Schädigung vom Eisen der Heinz-Innenkörperchen und möglicherweise auch von den Eisenkomplexen, die aus den thalassämischen Retikulozyten hervorgehen, auszugehen. Es ist vorstellbar, dass die erhöhte Produktion von aktiven oxidativen Substanzen der isolierten Globinketten zur Akkumulation der Peroxidkonzentration führen kann, die mit Hämoglobin unter Bildung von Eisenkomplexen oder reaktiverer Formen des Hämoglobins reagieren kann, die in der Lage sind, oxidative Schädigung hervorzurufen. Außerdem kann das Superoxid-Radikal mit den Ferritinresten der Retikulozyten reagieren und dabei Eisen freisetzen, welches dann die oxidative Schädigung intrazellulär und in der Membran katalysieren kann (Rice-Evans, 1990).

Die Bioverfügbarkeit von membrangebundenen Eisenkomplexen und ihre Rolle beim oxidativen Abbau thalassämischer Membranen wurde durch Messung der totalen Eisenretention in den Membranen, die Fähigkeit der membrangebundenen Eisenkomplexe die Lipidperoxidation anzuregen und die Vitamin E-Konzentration im Plasma bestimmt (Rice-Evans, 1989). Patienten mit erhöhtem membrangebundenen Eisen zeigten eine erhöhte Lipidperoxidation und erniedrigte Vitamin E-Spiegel.

## 1.4. Hämochromatose

Die primäre Hämochromatose ist eine hereditäre Erkrankung des Eisenstoffwechsels, die autosomal-rezessiv vererbt wird. Die phänotypische Ausprägung ist recht unterschiedlich und hängt vermutlich von einer Reihe von weiteren Faktoren (zum Beispiel Eisengehalt der Nahrung, Alkoholkonsum, Lebererkrankungen, Geschlecht) ab. Männer erkranken 10 mal häufiger als Frauen. Pathophysiologisch liegt der Hämochromatose eine vermehrte intestinale Eisenresorption mit nachfolgender Eisenüberladung des Gewebes zu Grunde. 1996 wurde das verantwortliche Gen, das sogenannte HFE-Gen, identifiziert. Es kodiert für einen MHC-1-ähnlichen Komplex, der für die Steuerung des zellulären Eisentransports durch Bindung an den Transferrinrezeptor verantwortlich ist (Levy et al., 1999, Bahram et al., 1999). HFE-Protein wurde in den Zellen der Krypten des Duodenums gefunden und ist assoziiert mit  $\beta_2$ -Mikroglobulin und dem Transferrinrezeptor (Parkkila et al., 1997, Waheed et al., 1999). Es wird vermutet, dass das HFE-Protein den Transferrinrezeptor-abhängigen Transport steuert und das durch die Genmutation veränderte HFE-Protein diese Funktion verliert, was zu einem relativem Eisenmangel der Zellen der Krypten führt. Dies bewirkt wiederum die vermehrte Expression des "divalent metal ion transporter 1" (DMT 1), der für die Eisenabsorption in den Zellen des oberen Dünndarms (Kühn, 1999, Andrews, 1999, Zoller et al., 1999) vermutlich verantwortlich ist.

Die Verdachtsdiagnose wird bei erhöhten Eisen- und Ferritinkonzentrationen im Serum gestellt und durch Bestimmung des Lebereisengehaltes durch Leberbiopsie oder durch Biosuszeptometrie in vivo und neuerdings durch Identifizierung des verantwortlichen Gens gesichert. Die häufigsten Symptome des Spätstadiums der Hämochromatose sind Leberzirrhose, Diabetes mellitus, Hyperpigmentierung der Haut, endokrine Störung der hypothalamisch-hypophysären Achse und Kardiomyopathie.

Auch bei der Hämochromatose kommt es zu einer Erhöhung der Eisenbeladung. Dies führt zur erhöhten Lipidperoxidation und damit zur

indirekten Schädigung der Membranen. Es wurde an Modellen der Lebereisenüberladung gezeigt, dass Lipidperoxidation zur Verminderung der membranabhängigen Mitochondrienfunktionen wie Sauerstoffmetabolismus und Calcium-Transport führt. Außerdem gibt es Wirkungen in Lysosomen auf Fluidität, Membranintegrität und in Mikrosomen auf Enzymaktivitäten und Calciumsequestration (Britton et al., 1994).

Als Therapie ist der Aderlaß am wirksamsten. Dabei werden mit 500 ml Blut dem Körper ca. 250 mg Eisen entzogen. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die eiseninduzierte Leberzirrhose durch hochdosierte Gabe von Vitamin E verzögert werden kann, indem nichtparenchymale Zellproliferation durch Hemmung der Fibrogenese gestoppt wird (Pietrangelo et al., 1995).

## **1.5. Problemstellung**

Das  $\alpha$ -Tocopherol macht den größten Anteil der Tocopherole aus. Von den sieben weiteren Formen spielt  $\gamma$ -Tocopherol die größte Rolle. Zur Bestimmung des Antioxidantienstatus wurde in unserer Abteilung bislang  $\alpha$ -Tocopherol im Plasma mittels HPLC bestimmt.

Es wurde eine Methode entwickelt, mit der die  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Tocopherolkonzentration in den Erythrozytenmembranen mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) bestimmt werden kann. Mit dieser Methode wurde  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Tocopherol in den Erythrozytenmembranen und im Plasma in einer Thalassämie-, einer Hämochromatose- und einer Kontrollgruppe bestimmt. Außerdem wurden für diese Probanden die Parameter des Eisenstoffwechsels Ferritin, Transferrinsättigung, nicht-transferringebundenes Eisen und die Lebereisenbeladung bestimmt um den Zusammenhang zu den Vitaminkonzentrationen im Plasma und in den Erythrozytenmembranen zu untersuchen.

Weiterhin wurde die Auswirkung einer Substitution mit oral verabreichtem  $\alpha$ -Tocopherolacetat bei einer Hämochromatosepatientin getestet.

## **1.6. Ziel der Arbeit**

Diese Studie untersuchte die Bestimmung der  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Tocopherolkonzentration in hämoglobinfreien Erythrozytenmembranen im Vergleich zur Plasmakonzentration in einer gesunden Kontrollgruppe sowie einer Gruppe von Patienten mit  $\beta$ -Thalassämie major und Hämochromatose.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Probanden

Alpha-Tocopherol, Gamma-Tocopherol und Retinol wurde in drei Versuchsgruppen bestimmt: einer Kontrollgruppe aus Normalpersonen, einer Gruppe aus Thalassämiepatienten und einer Gruppe aus Hämochromatosepatienten.

Die Kontrollgruppe bestand aus neun gesunden Normalpersonen, fünf weiblichen und vier männlichen, im Alter von 23 bis 53 Jahren, die alle als Blutspender geeignet waren.

Die zweite Gruppe bestand aus 14 Patienten aus Bari/Italien mit der Diagnose  $\beta$ -Thalassämie major. Die acht weiblichen und sechs männlichen Probanden waren im Alter von 10 bis 28 Jahren. Anlässlich eines Termins für die Bestimmung der Eisenaufladung der Leber und Milz mittels Biosusceptometrie (Berechnung der Eisenkonzentration durch in vivo-Bestimmung der magnetischen Eigenschaften), kamen sie nach Hamburg. Die Eisenbeladung der Leber betrug zwischen 0,91 und 9,97 mg Eisen pro Gramm Leber bzw. Milz. Am Morgen wurde jedem Patienten nüchtern Heparinblut zur Bestimmung der Eisenparameter abgenommen. Aus dieser Blutprobe wurden zur Vitaminbestimmung 500  $\mu$ l Plasma eingefroren und 1000  $\mu$ l Erythrozyten entnommen, die nach zweimaligem Waschen in physiologischer Kochsalzlösung in zwei Portionen zu je 400  $\mu$ l mit entsprechendem Zusatz (siehe unten) bei  $-70^{\circ}\text{C}$  eingefroren wurden.

Die dritte Probandengruppe waren an hereditärer Hämochromatose erkrankte Patienten, die zum Aderlaß kamen. Dabei handelte es sich um fünf männliche und fünf weibliche Patienten im Alter von 28 bis 87 Jahren. Diese Patienten zeigten nur eine mäßig erhöhte Beladung der Leber mit Eisen (0,2 bis 2,94 mg Eisen pro Gramm Leber). Ihnen wurde gleichzeitig mit dem

Aderlaß Heparinblut entnommen, das dann zügig auf unten beschriebene Art und Weise aufgearbeitet wurde.

Zusätzlich wurde einer Hämochromatosepatientin, die einmal wöchentlich zum Aderlaß erschien, mit einem Vitamin-E-Acetat-Präparat (RRR- $\alpha$ -Tocopherol-Acetat, Spondyvit, 400 mg täglich) der vom National Research Council 1989 vorgeschlagenen Menge substituiert und der Erfolg durch wöchentliche Messungen überprüft.

## **2.2. Gewinnung und Lagerung der Proben**

Als Proben zur Vitaminbestimmung wurden den Probanden das Blut in Heparinmonovetten abgenommen. Daraus wurde je ein Tropfen entnommen, um den Hämoglobingehalt mit einem Hämoglobinphotometer (Diagnostik Helsingborg Schweden) zu bestimmen. Plasma und Erythrozyten wurden dann durch Zentrifugieren bei 3500 Umdrehungen pro Minute für 5 Minuten in der Zentrifuge Sigma 4K10 getrennt. Das Plasma wurde abpipettiert und sofort bei  $-70^{\circ}\text{C}$  in Kryoröhrchen eingefroren. Für jeden Probanden wurden vier Kryoröhrchen mit Plasma eingefroren, um später jede Probe nur einmal aufzutauen.

Die Erythrozyten wurden in NaCl-Lösung (0,9%) gevortext, zentrifugiert und der Überstand aus NaCl-Lösung und Plasma abpipettiert. Dieser Vorgang wurde nochmal wiederholt. Dann wurden jeweils fünf mal 500  $\mu\text{l}$  Erythrozyten in Eppendorf-Behälter pipettiert - zusammen mit 300  $\mu\text{l}$  Ascobinsäurelösung (0,075 mmol/l) und 300  $\mu\text{l}$  EDTA-Lösung (3,75 mmol/l) - und bei  $-70^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Zur Herstellung des Zusatzes zum Einfrieren der Erythrozyten wurde Ascorbinsäure und EDTA der Firma Merck verwendet.

Zur Bestimmung der Eisenparameter wurde jeweils eine 10-ml-Monovette (Sarstedt) abgenommen. Nachdem das Serum durch Zentrifugation von den



restlichen Blutbestandteilen getrennt worden ist, wurde es bei  $-70^{\circ}\text{C}$  bis zur Analyse aufbewahrt.

Vor der Messung wurden alle Proben abgedunkelt bei  $4^{\circ}\text{C}$  im Kühlraum aufgetaut und zügig weiterverarbeitet.

### **2.3. Aufarbeitung der Proben**

#### ***Plasma***

In ein Glasreagenzglas wurden  $400\ \mu\text{l}$  Heparinplasma und  $400\ \mu\text{l}$  eines Internen Standards aus einer  $\alpha$ -Tocopherol-Acetat-Lösung gegeben und 15 Sekunden gevortext. Nach Hinzufügen von  $800\ \mu\text{l}$  *n*-Hexan wurde für eine weitere Minute gevortext und dann zwei Minuten bei 2000 Umdrehungen pro Minute in der Zentrifuge Sigma 2-15 zentrifugiert. Von der oberen Phase, die aus *n*-Hexan und den darin gelösten Lipiden bestand, wurden  $400\ \mu\text{l}$  abpipettiert und mit Stickstoff zu einer trockenen Masse eingengt. Durch Zugabe von  $400\ \mu\text{l}$  Methanol-Wasser-Gemisch wurden die lipidlöslichen Stoffe zurückgelöst. Nach kurzem Vortexen wurden hiervon  $200\ \mu\text{l}$  mit der Hamiltonspritze in die HPLC eingespritzt.

#### ***Erythrozytenmembranen***

Die Erythrozytenmembranen wurden gewonnen, indem  $500\ \mu\text{l}$  gepackte Erythrozyten in Eppendorfgefäße mit  $300\ \mu\text{l}$  Ascorbinsäure- und  $300\ \mu\text{l}$  EDTA-Lösung und  $400\ \mu\text{l}$  Wasser hämolysiert wurden. Hämolysat und Membranen wurden durch Zentrifugation bei  $14800\ \text{g}$  für 5 Minuten in der Eppendorfszentrifuge getrennt. Der Überstand wurde abdekantiert, die Membranen noch zwei weitere Male auf diese Weise gewaschen. Dann war der Überstand klar. Der Bodensatz hatte eine dunkelrote Farbe. Da diese kompakte Masse nur mit sehr großem Fehler mit der Pipette überführt

werden konnte, erfolgte die Weiterverarbeitung im gleichen Eppendorfgesäß, der jeweils mit und ohne Inhalt gewogen wurde.

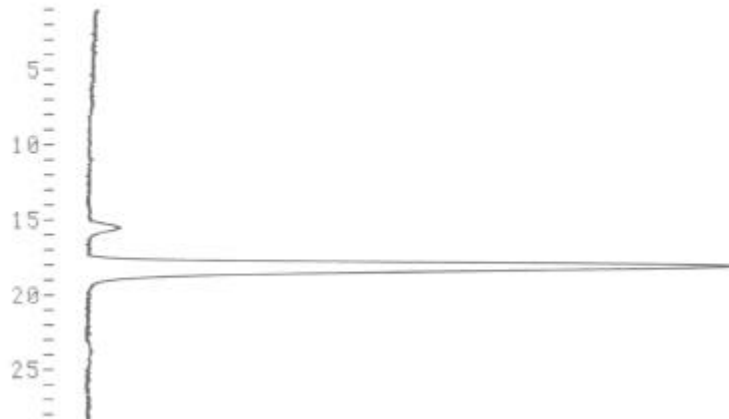
Das exakte Volumen der Membranen wurde ermittelt, indem das Eppendorfgesäß mitsamt Inhalt gewogen und davon das Gewicht des Eppendorfgesäßes subtrahiert wurde. Da das maximale Volumen der Eppendorfgesäße nur 1500 µl betrug, wurden 300 µl Ethanol, das den Internen Standard enthält, und 600 µl *n*-Hexan zugesetzt. Mit einer Tischzentrifuge wurde die Hexanphase vom Ethanol getrennt und 400 µl in ein Glasreagenzglas überführt, mit Stickstoff eingeeengt und mit dem Methanol-Puffer zurückgelöst. Nach kurzem Vortexen wurden 200 µl mit der Hamiltonspritze in die HPLC eingespritzt.

#### **2.4. Bestimmung von $\alpha$ - und $\gamma$ -Tocopherol und all-trans-Retinol mittels HPLC**

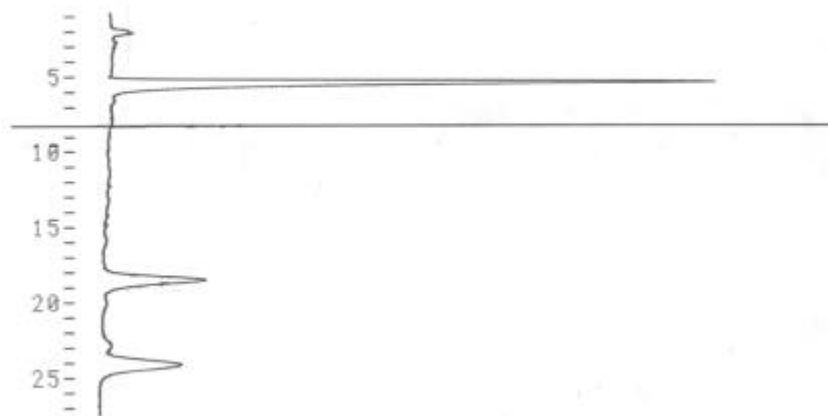
Alpha- und Gamma-Tocopherol und all-trans-Retinol wurden synchron mit der HPLC-Methode (Hochdruckflüssigkeits-Chromatographie) gemessen. Es wurde eine Intersil-ODS 2-Säule der Firma GAT benutzt. Die Säulenlänge betrug 250,4 mm und der Durchmesser 5 µm. Die Gradient Pumpe 2249 von Pharmazia LKB arbeitete mit einer Geschwindigkeit von 0,7 ml/min, der einem Druck von 18 MPa entsprach. Als Laufmittel diente ein Gemisch aus 99,5 Prozent Methanol und 0,5 Prozent dreifach destilliertem Wasser.

Zur Messung von  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Tocopherol wurde ein Fluoreszenzdetektor (RF-530 von Shimadzu) bei einer Emission von 325 nm und einer Extinktion von 295 nm verwendet (Abb. 3).

Mit einem UV-Wellenlängen-Monitor (Knauer) wurden all-trans-Retinol in den ersten zehn Minuten bei einer Absorbtion von 323 nm und der Interne Standard in den folgenden zwanzig Minuten bei einer Absorbtion von 275 nm gemessen (Abb. 4). Die Laufzeit betrug 30 Minuten.



**Abb.3** HPLC-Chromatogramm mit Fluoreszenz-Detektion von  $\gamma$ -Tocopherol bei 15,55 Minuten und  $\alpha$ -Tocopherol bei 18,63 Minuten



**Abb. 4** HPLC-Chromatogramm mit UV-Detektion von Retinol bei 5,55 Minuten, Interner Standard bei 24 Minuten,  $\alpha$ -Tocopherol bei 18,6 Minuten

Kalibration:

Vor Beginn und nach jeweils 100 Meßwerten wurde neu kalibriert. Zur  $\alpha$ -Tocopherol-Kalibration wurde die Stocklösung aus 0,283 g DL- $\alpha$ -Tocopherol (Merck, 8282;  $M=430,72$  g/mol) in 50 ml Ethanol 1:1000, 1:1500 1:2000 und 1:5000 in 99,5prozentigem Methanol-Wasser-Gemisch verdünnt. Aus der 1:5000-Verdünnung wurden weitere Verdünnungen von 1:1, 1:2, 1:3 und 1:4 hergestellt und jeweils 3 mal gemessen. Daraus wurde die lineare Eichkurve ermittelt. Die  $\gamma$ -Tocopherolkalibration erfolgte analog dem  $\alpha$ -Tocopherol.

Zur all-trans-Retinol-Kalibration wurde die Stocklösung aus 0,1 g all-trans-Retinol (Sigma;  $M=286,5$  g/mol) in 50 ml Ethanol 1:1000 in 99,5prozentigem Methanol-Wasser(tridest)-Gemisch verdünnt. Von dieser Lösung werden jeweils drei mal 200  $\mu$ l, 150  $\mu$ l, 100  $\mu$ l, 50  $\mu$ l eingespritzt und aus den Meßwerten die lineare Eichkurve ermittelt. Dabei entsprechen 100  $\mu$ l der Verdünnung 1:1000 und 200 $\mu$ l 1:500 etc.

Die  $\alpha$ -Tocopherol- bzw. all-trans-Retinol-Konzentration der Stocklösung wurde jedesmal photometrisch anhand einer 1:10 Verdünnung mit einem UV-Spektrometer Pharmacia LBK Biochrom 4060 überprüft.

Bei jeder Messung lief ein Interner Standard mit. Der Interne Standard bestand aus einer Stocklösung von 0,6085 g DL- $\alpha$ -Tocopherol-Acetat (Merck, 8284;  $M=472,76$  g/mol) in 100 ml Ethanol, die nochmal 1:1000 in Ethanol verdünnt wurde. Zur 100-Prozent-Bestimmung wurden 200  $\mu$ l dieser Lösung vier mal eingespritzt.

Methanol, Ethanol und *n*-Hexan hatten die Qualität LiChrosolv.

Die Richtigkeit der Kalibration konnte mit dem Serum Control Vitamins A and E No. 036 (Chromsystems) durch einen Ringversuch bestätigt werden.

## **2.5. Bestimmung von Serumeisen, totaler Eisenbindungs- kapazität, Transferrinsättigung und Serumferritin**

Serumeisen wurde mittels Bathophenanthrolindisulfonat-Standardmethode (International Committee for Standardization in Haematology, 1978) bestimmt. Ebenfalls mit Bathophenanthrolindisulfonat als Chromogen wurde die ungesättigte Eisenbindungskapazität (UEBK) gemessen.

Totale Eisenbindungskapazität (TEBK) ist die Summe aus Serumeisen und UEBK (Gabbe et al., 1982).

Transferrinsättigung wurde aus dem Verhältnis von Serumeisen zur totalen Eisenbindungskapazität berechnet.

Das Serumferritin wurde mit Hilfe einer standardisierten immunradiometrischen Untersuchungsmethode (RIA; Hermann Biermann GmbH Bad Nauheim) quantitativ bestimmt.

## **2.6. Bestimmung des nicht-transferringebundenen Eisens**

Zur Bestimmung des nicht-transferringebundenen Eisens (NTBI, Non-transferrinbound iron) mittels Atomabsorptionsspektrometrie (AAS) werden zu 360 µl Serum 40 µl einer 800 mM Nitrioloessigsäure (NTA)-Lösung gegeben, 15 Minuten stehengelassen und dann 3,5 Stunden bei 3000 Umdrehungen pro Minute in der Ultrafiltrationshülse zentrifugiert. Dabei passieren alle Stoffe mit einem Molgewicht unter 10000, insbesondere der NTA-Eisenkomplex, die Membran und sammeln sich als Ultrafiltrat. Die Proben werden 1:5 in einer 1% Triton X 100, 0,02 M HNO<sub>3</sub>-Matrixlösung verdünnt. Vor dem Messen der Proben erstellte das Atomabsorptionsspektrometer eine Standardkurve, die es selbständig aus der Matrixlösung und einem Eisenstandard (100 µg Fe/ml in 1% HCl, Sigma) pipettierte. Die Standardkurve umfaßte einen Konzentrationsbereich von 30

– 120 µg/l Eisen ( $R^2=0,997$ ). Die Präzision wurde mit zwei Kontrollen von 20 µg/l und 100 µg/l geprüft. Ein Autosampler pipettierte jeweils drei mal 20 µl der vorbereiteten Probe in ein Graphitrohr, indem die Probe aufgeheizt wurde, wobei sie eine Hohlkathode bedampfte. Diese lieferte eine elementspezifische Linie bei 248,3 nm, deren Lichtintensität dann von einem Photomultiplier gemessen wurde. Das Ergebnis der Messung wurde als Extinktion angegeben, die das Verhältnis der Intensität mit und ohne Probe beschreibt, und sich proportional zur Eisenkonzentration verhielt.

## **2.7. Bestimmung der Eisenaufladung von Leber und Milz**

Mittels nichtinvasiver Biosuszeptometrie wurde die Eisenkonzentration der Leber und der Milz bestimmt, die sich aus Hämosiderin und Ferritineisen zusammensetzt. Dabei wurde der wesentlich größere paramagnetische Effekt dieser Eisenverbindungen gegenüber den diamagnetischen Eigenschaften von biologischen Geweben (vor allem Wasser) ausgenutzt und aus den gemessenen magnetischen Eigenschaften die Lebereisenkonzentration berechnet (Paulson, 1991; Fischer, 1998).

## **2.8. Auswertung und Berechnung**

Die Meßwerte wurden mit einem Merck D-2000 Integrator, der die Kanäle 1 (UV-Wellenlängen-Monitor) und 2 (Fluoreszenzdetektor) synchron speichert, bei Abschwächungen von 2 bis 7 aufgezeichnet und manuell anhand der Peakhöhen in Zentimetern ausgewertet. Da bei niedrigen Attenuation der Untergrund bis zu 5 mm betrug, wurde die Peakbasis über dem „Rauschen“ angelegt.

### *Vitaminkonzentrationen im Plasma*

Die  $\alpha$ -Tocopherol-Konzentration im Plasma  $c_{E\alpha}$  [ $\mu\text{mol/l}$  Plasma bzw. gepackte Erythrozyten] errechnet sich, wie Gleichung 1 zeigt, aus dem geeichten Internen Standard  $S_E$  [cm], dem aktuellen Peak des internen Standards  $S_M$  [cm], dem Peak des  $\alpha$ -Tocopherols  $PH$  [cm], der Steigung der Eichgeraden  $ST$  [ $\text{cm}^*/\mu\text{mol}$ ], den dimensionslosen Verdünnungsfaktoren für den internen Standard  $VF_s$ , für das Plasma- oder Erythrozytenvolumen  $VF_E$  und für die Verdünnung der Einspritzmenge im HPLC-System  $VF_{EM}$  sowie die Umrechnungsfaktoren der Abschwächung des Meßwerts zur Abschwächung der Eichung für den Standard  $F_1$  und für  $\alpha$ -Tocopherol  $F_2$ .

[1]

$$c_{E\alpha} = \frac{S_E \times PH \times F_2 \times VF_E}{S_M \times ST \times VF_s \times VF_{EM} \times F_1}$$

Die Konzentrationen von  $\gamma$ -Tocopherol  $c_{E\gamma}$  [ $\mu\text{mol/l}$ ] und Retinol  $c_A$  [ $\mu\text{mol/l}$ ] errechnen sich analog unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Peakhöhen  $PH$  [cm].

### *Vitaminkonzentrationen in Erythrozytenmembranen*

In Gleichung 2 ergibt sich die  $\alpha$ -Tocopherol-Konzentration der Erythrozytenmembranen  $c_{E\alpha}$  [ $\mu\text{mol/l}$  gepackte Erythrozyten] aus dem geeichten internen Standard  $S_E$  [cm], dem aktuellen Peak des internen Standards  $S_M$  [cm], dem Peak des  $\alpha$ -Tocopherols  $PH$  [cm], der Steigung der

Eichgeraden  $ST$  [ $\text{cm} \cdot \text{l} / \mu\text{mol}$ ], den Verdünnungsfaktoren für den internen Standard  $VF_s$ , das Plasma- oder Erythrozytenvolumen  $VF_E$  und für die Verdünnung der Einspritzmenge im HPLC-System  $VF_{EM}$  sowie die Umrechnungsfaktoren der Attenuation des Meßwerts zur Attenuation der Eichung für den Standard  $F_1$  und für  $\alpha$ -Tocopherol  $F_2$  und einem Umrechnungsfaktor  $VF_{mem}$ , der den Volumenanteil der Membranen am vorausgegangen Volumen der Erythrozyten wiedergibt.

[2]

$$c_{Ea} = \frac{S_E \times PH \times F_2 \times VF_E}{S_M \times m \times VF_s \times VF_{EM} \times F_1} \times VF_{mem}$$

Die Konzentrationen von  $\gamma$ -Tocopherol  $c_{E\gamma}$  [ $\mu\text{mol/l}$ ] und Retinol  $c_A$  [ $\mu\text{mol/l}$ ] errechnen sich analog unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Peakhöhen  $PH$  [ $\text{cm}$ ].

Die Erstellung der Eichkurven sowie die statistische Auswertung der Meßwerte erfolgte mit dem Tabellenkalkulationsprogramm Microsoft Excel 7.0. Für die Standardkurven wurde das Bestimmtheitsmaß verwendet.

Es wurde Mittelwerte sowie die Standardabweichungen verwendet. Im Falle einer Nichtstandardverteilung wurde der Medianwert und der Interquartilenbereich angegeben, sowie der U-Test nach Wilcoxon, Mann & Whitney (Sachs, 1985) verwendet und  $p < 0,05$  als signifikant angesehen, wenn nicht anders angegeben.



## 3. Ergebnisse

### 3.1. Methode zur Bestimmung der $\alpha$ -Tocopherolkonzentration in den Erythrozytenmembranen

Bevor mit dieser Methode  $\alpha$ -Tocopherol in den Patientenkollektiven gemessen wurden, wurde ein Methodennachweis durchgeführt. Die unter 2.3. beschriebene Methode ist eine Modifikation der Methode durch Rodriguez et al. (1996).

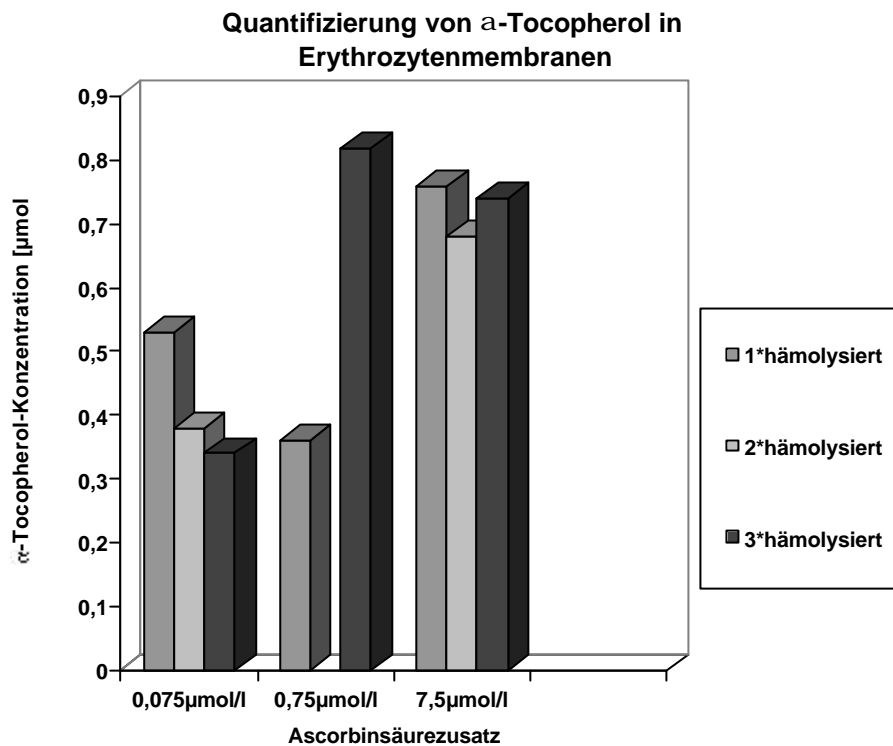
Für die Methode zur Messung von  $\alpha$ -Tocopherol in den Erythrozytenmembranen wurden folgende Konzentrationen der Zusätze an EDTA und Ascorbinsäure empirisch gefunden. Der optimale EDTA-Zusatz hatte die Konzentration 0,375 mmol/l. Bei höheren Konzentrationen fällten EDTA-Rückstände aus.

Einen Versuch mit unterschiedlichen Ascorbinsäurekonzentrationen zeigt die Abbildung 5. Bei der minimalen Ascorbinsäurekonzentration des Zusatzes sinkt die  $\alpha$ -Tocopherolkonzentration mit jeder weiteren Zentrifugation, während sie bei der höchsten Konzentration relativ konstant bleibt. Deshalb wurde angenommen, dass eine Ascorbinsäurekonzentration des Zusatzes von mindestens 7,5  $\mu\text{mol/l}$  notwendig ist, um das  $\alpha$ -Tocopherol der Erythrozytenmembranen vor Verlusten während der Aufarbeitung zu schützen.

In zwei Versuchen wurde nachgewiesen, dass mit dieser Methode alpha-Tocopherol in den Erythrozytenmembranen gemessen werden kann. Beide Versuche wurden Vitamin E mit gepackten Erythrozyten durchgeführt. Hierbei waren die Ergebnisse aber nicht reproduzierbar.

Zur alpha-Tocopherol-Messung in den Membranen stand die gleiche Anlage zur Verfügung, die auch zur Messung im Plasma genutzt wurde. Durch Eichung auf alpha-Tocopherol-Konzentrationen von 0,8  $\mu\text{mol/l}$  bis 6,8  $\mu\text{mol/l}$  konnte nachgewiesen werden, dass derart kleine Mengen genau

gemessen werden können ( $SD \pm 4,2\%$ ,  $R^2=0,98$ ). All-trans-Retinol wurde erwartungsgemäß nicht gefunden.

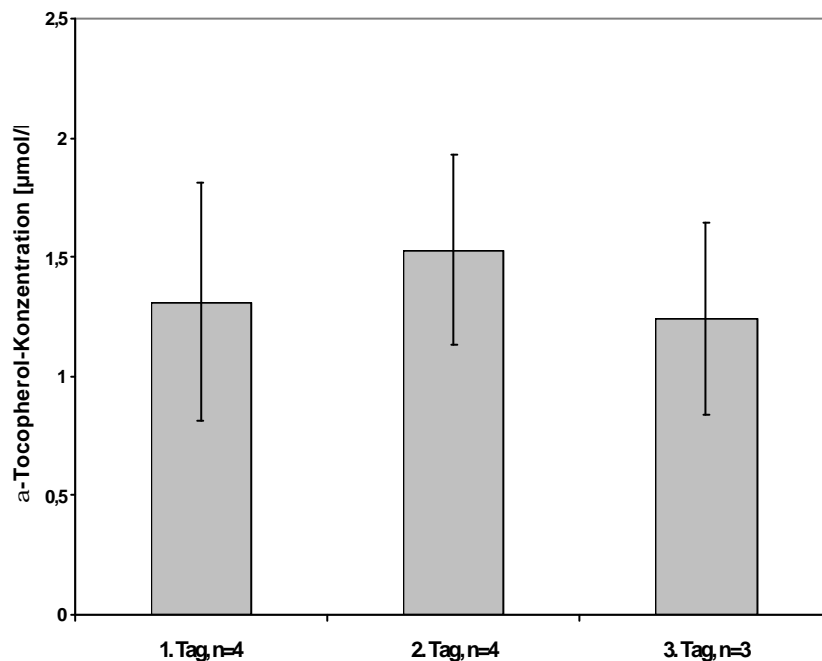


**Abb. 5**  $\alpha$ -Tocopherol-Messung in Proben, denen eine bestimmte Konzentration Ascorbinsäure zugefügt wurde, um die Konstanz der  $\alpha$ -Tocopherol-Konzentration bei 1, 2 und 3maliger Zentrifugation bei 14800 g zu überprüfen. Bei einem Ascorbinsäurezusatz von 7,5  $\mu\text{mol/l}$  war die  $\alpha$ -Tocopherolkonzentration konstant, unabhängig davon ob 1, 2 oder 3 mal hämolysiert wurde. Bei niedrigeren Ascorbinsäurekonzentrationen wurden starke Schwankungen gefunden.

Im ersten Versuch zu Überprüfung der Genauigkeit der Methode wurde in 14 Proben Erythrozytenmembranen eines Probanden die alpha-Tocopherolkonzentration gemessen. Der Mittelwert war 3,37  $\mu\text{mol/l}$  und die Standardabweichung 1,6  $\mu\text{mol/l}$ . Die  $\alpha$ -Tocopherolkonzentration im Plasma dieses Probanden betrug 67,3  $\mu\text{mol/l}$ . Damit wurde ein Verhältnis von 0,04 der  $\alpha$ -Tocopherolkonzentration in den Erythrozytenmembranen zum Plasma

ermittelt. Der Interne Standard für die Bestimmung in den Erythrozytenmembranen wurde zu 86,4 Prozent wiedergefunden.

In einem weiteren Versuch wurden insgesamt elf Proben eines weiteren Probanden an drei unterschiedlichen Tagen gemessen. Der Mittelwert der  $\alpha$ -Tocopherolkonzentration für alle Proben betrug 1,4  $\mu\text{mol/l}$  und die Standardabweichung 0,4  $\mu\text{mol/l}$ . Die Konzentrationen an den einzelnen Tagen sind in Abbildung 6 dargestellt. Die  $\alpha$ -Tocopherolkonzentration im Plasma betrug 36,7  $\mu\text{mol/l}$ . Somit betrug das Verhältnis der alpha-Tocopherolkonzentration in den Erythrozytenmembranen zum Plasma 0,04. Der Interne Standard zur Bestimmung in den Erythrozytenmembranen betrug zu 85,9 Prozent der zugegebenen Konzentration.

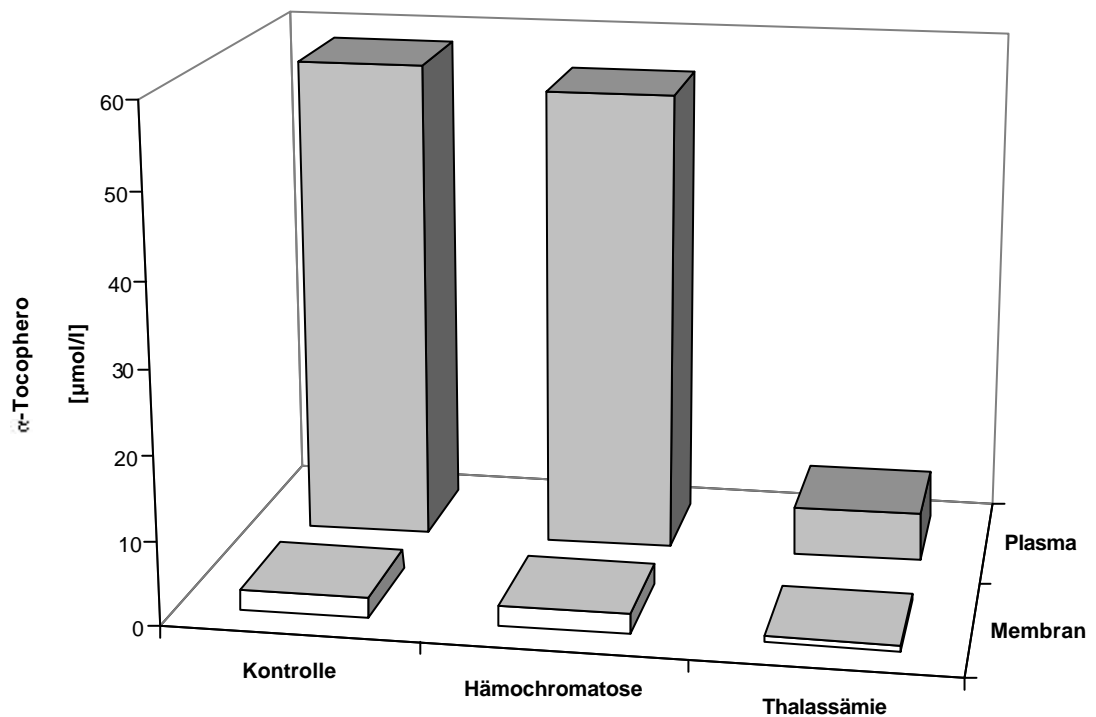


**Abb. 6**  $\alpha$ -Tocopherol-Konzentration eines Probanden gemessen an drei unterschiedlichen Tagen. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte und die Standardabweichungen

### 3.2. Vitaminkonzentrationen in den Probandengruppen

Die Abbildung 7 zeigt die  $\alpha$ -Tocopherol-Konzentration der Erythrozytenmembranen und des Plasmas im Vergleich.

Die Abweichungen der Medianwerte und weitere Ergebnisse erscheinen in den Tabellen 1 bis 3.



**Abb. 7** Darstellung der  $\alpha$ -Tocopherolkonzentrationen im Plasma und in den Erythrozytenmembranen in Kontroll-, Hämochromatose- und Thalassämiegruppe

**Tabelle 1** Vitaminkonzentrationen in der Kontrollgruppe (IQB: Interquartilenbereich)

	$\alpha$ -Tocopherol [ $\mu\text{mol/l}$ ]		$\gamma$ -Tocopherol [ $\mu\text{mol/l}$ ]		Retinol [ $\mu\text{mol/l}$ ]
	Plasma	Membran	Plasma	Membran	Plasma
Anzahl	9	9	9	8	9
Median	58,04	2,37	3,31	0,42	6,02
IQB	41,12	2,03	5,26	0,10	6,35
Maximum	82,85	5,79	11,60	0,67	10,67
Minimum	16,46	1,32	1,55	0,21	1,88

Die Tabelle 1 zeigt die Konzentration an  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Tocopherol sowie Retinol in den Membranen der Erythrozyten und im Plasma der Kontrollgruppe. Die  $\alpha$ -Tocopherolkonzentration in den Erythrozytenmembranen betrug vier Prozent der Plasmakonzentration. Die  $\gamma$ -Tocopherol-Konzentration betrug zehn Prozent der  $\alpha$ -Tocopherolkonzentration. Dabei betrug die Konzentration der Erythrozytenmembranen 13 Prozent der Plasmakonzentration. Bei einem Patienten wurde  $\gamma$ -Tocopherol in den Membranen nicht gefunden. Retinol wurde im Plasma gefunden wie angegeben.

**Tabelle 2** Vitaminkonzentrationen im Patientenkollektiv mit Hämochromatose, U-Test gegen Kontrollkollektiv (IQB: Interquartilenbereich)

	$\alpha$ -Tocopherol [ $\mu\text{mol/l}$ ]		$\gamma$ -Tocopherol [ $\mu\text{mol/l}$ ]		Retinol [ $\mu\text{mol/l}$ ]
	Plasma	Membran	Plasma	Membran	Plasma
Anzahl	10	10	9	9	10
Median	55,34	2,46	5,98	0,26	7,46
IQB	15,86	1,08	2,60	0,12	2,05
Maximum	66,44	4,02	12,51	0,67	12,45
Minimum	25,57	1,09	3,62	0,16	4,35
P(U-Test)	0,25	0,62	0,23	0,05	0,68

Für die Vitaminkonzentrationen der Hämochromatosepatienten, wie in Tabelle 2 dargestellt, zeigt sich im U-Test nach Wilcoxon, Mann und Whitney, dass die Medianwerte aller Konzentrationen, nicht signifikant verschieden von denen der Kontrollgruppe sind. Die  $\alpha$ -Tocopherolkonzentration in den Erythrozytenmembranen betrug vier Prozent der Plasmakonzentration. Die  $\gamma$ -Tocopherolkonzentration entsprach jeweils zehn Prozent der  $\alpha$ -Tocopherolkonzentration, wobei die Membrankonzentration vier Prozent der Plasmakonzentration betrug. Bei einer Patientin wurde kein  $\gamma$ -Tocopherol gemessen. Retinol wurde bei allen Probanden im Plasma gefunden.

**Tabelle 3** Vitaminkonzentrationen im Patientenkollektiv mit  $\beta$ -Thalassämie major, U-Test gegen Kontrollkollektiv (IQB: Interquartilenbereich)

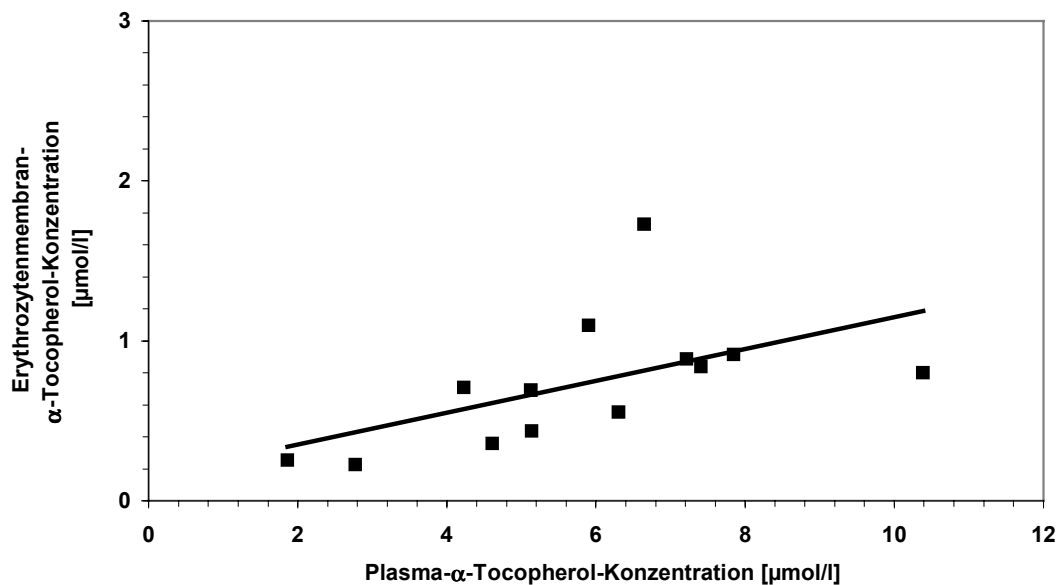
	$\alpha$ -Tocopherol [ $\mu\text{mol/l}$ ]		$\gamma$ -Tocopherol [ $\mu\text{mol/l}$ ]		Retinol [ $\mu\text{mol/l}$ ]
	Plasma	Membran	Plasma	Membran	Plasma
Anzahl	13	14	13	14	13
Median	5,90	0,75	1,38	0,17	0,92
IQB	2,60	0,41	0,69	0,17	0,42
Maximum	10,38	1,73	3,95	0,46	1,22
Minimum	1,86	0,23	0,82	0,04	0,45
P(U-Test)	0,0001	0,0001	0,0015	0,0021	0,0001

Tabelle 3 zeigt die Vitaminkonzentrationen in den Erythrozytenmembranen und im Plasma des  $\beta$ -Thalassämiekollektivs. Bei einem Patienten stand kein Plasma zur Verfügung. Wie man leicht sieht, lagen hier die Vitaminkonzentrationen weit unter denen der anderen Probandengruppen. Der U-Test für die fünf Meßgrößen zeigte, dass die Gruppe der  $\beta$ -Thalassämiepatienten signifikant verschieden ( $p < 0,05$ ) von den beiden anderen Probandengruppen war, außer für  $\gamma$ -Tocopherol im Plasma. Die  $\alpha$ -Tocopherolkonzentration der Membranen betrug 13 Prozent der Plasmakonzentration, während die Erythrozytenmembran- $\gamma$ -Tocopherolkonzentration der Membranen 12 Prozent der Plasma- $\gamma$ -Tocopherolkonzentration und 23 Prozent der Membran- $\alpha$ -Tocopherolkonzentration entsprach. Die  $\gamma$ -Tocopherolkonzentration im Plasma betrug 23 Prozent der Plasma- $\alpha$ -Tocopherolkonzentration. Damit war hier die  $\gamma$ -Tocopherolkonzentration im Plasma im Verhältnis zur  $\alpha$ -Tocopherolkonzentration doppelt so hoch wie in der Hämochromatose- und

Kontrollgruppe. Die Retinolkonzentration im Plasma war kleiner als in den anderen Probandengruppen.

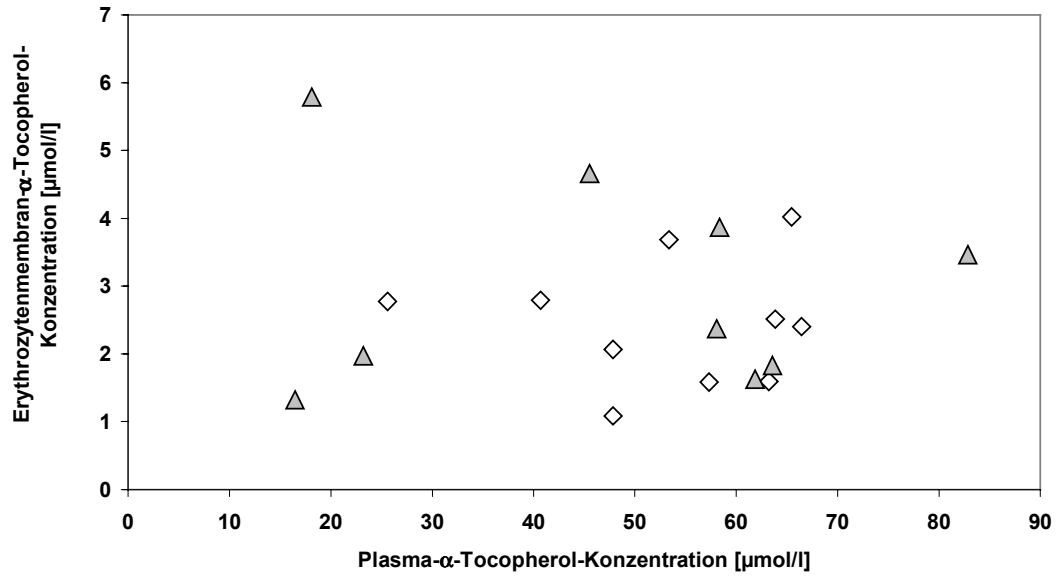
Im folgenden werden die Gruppen untereinander hinsichtlich Ihrer Vitaminspiegel verglichen.

Die Abbildungen 8 und 9 zeigen den Zusammenhang zwischen den Konzentrationen an  $\alpha$ -Tocopherol in Erythrozytenmembranen und im Plasma für alle drei Gruppen. Dabei zeigte sich, dass die Parameter für die Thalassämiepatienten signifikant korrelierten ( $r=0,55$ ,  $p<0,05$ ,  $n=19$ ). Für die höheren Konzentrationen an  $\alpha$ -Tocopherol in der Kontroll- und in der Hämochromatosegruppe ( $n=19$ ) bestand kein statistisch signifikanter Zusammenhang.

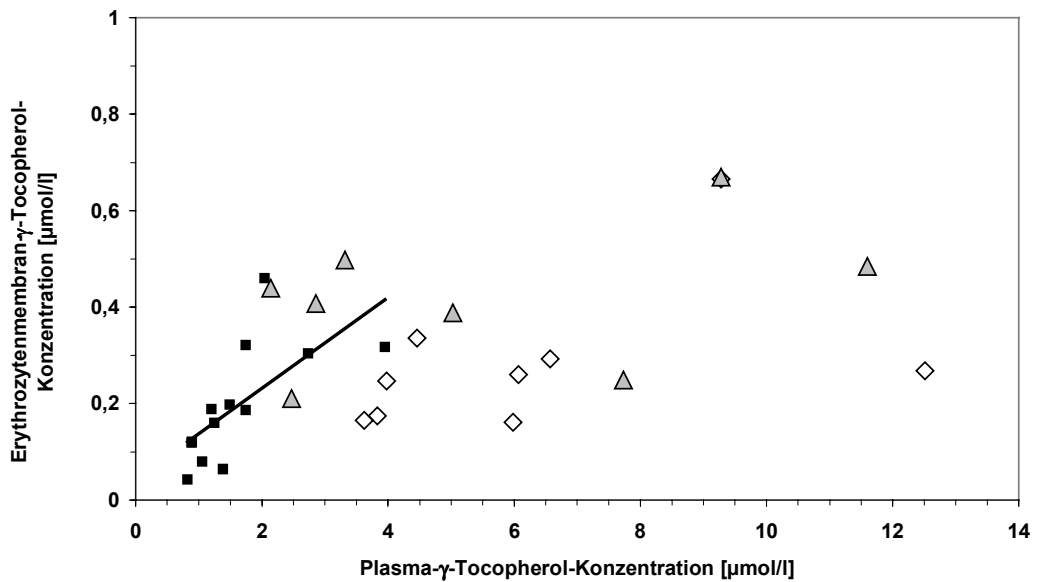


**Abb. 8** Zusammenhang der  $\alpha$ -Tocopherol-Konzentration in den Erythrozytenmembranen und im Plasma für die Thalassämiegruppe (■), die  $\alpha$ -Tocopherol-Konzentration in den Erythrozytenmembranen und im Plasma korreliert signifikant für die Thalassämiegruppe ( $r=0,55$ ,  $p<0,05$ ,  $n=13$ ).



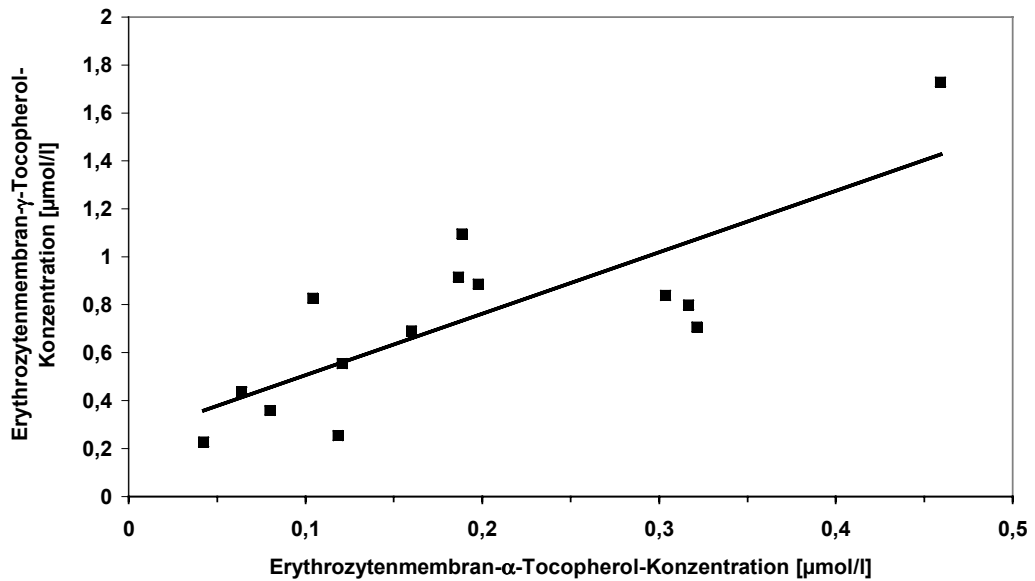


**Abb. 9** Zusammenhang der  $\alpha$ -Tocopherol-Konzentration in den Erythrozytenmembranen und im Plasma für die Kontroll-( $\Delta$ ) und Hämochromatosegruppe( $\diamond$ ). Es bestand keine lineare Korrelation für Kontroll- und Hämochromatosegruppe.



**Abb. 10** Zusammenhang der  $\gamma$ -Tocopherol-Konzentration in den Erythrozytenmembranen und im Plasma für die Kontroll-( $\Delta$ ), Hämochromatose-( $\diamond$ ) und Thalassämiegruppe( $\blacksquare$ ). Es besteht eine lineare Regression (Linie,  $r=0,68$ ,  $p<0,05$ ,  $n=12$ ) für die Thalassämiegruppe. Es besteht keine lineare Korrelation für Kontroll- und Hämochromatosegruppe

Ein Vergleich der die Membran- $\gamma$ -Tocopherol-Konzentration mit der Plasma- $\gamma$ -Tocopherol-Konzentration zeigte, wie auch schon für  $\alpha$ -Tocopherol in der Gruppe der Thallassämiepatienten, einen statistisch signifikanten Zusammenhang ( $r=0,68$ ,  $p<0,05$ ,  $n=12$ ). Für die Kontroll- und die Hämochromatosegruppe wurde kein statistisch signifikanter Zusammenhang gefunden (Abb. 10).



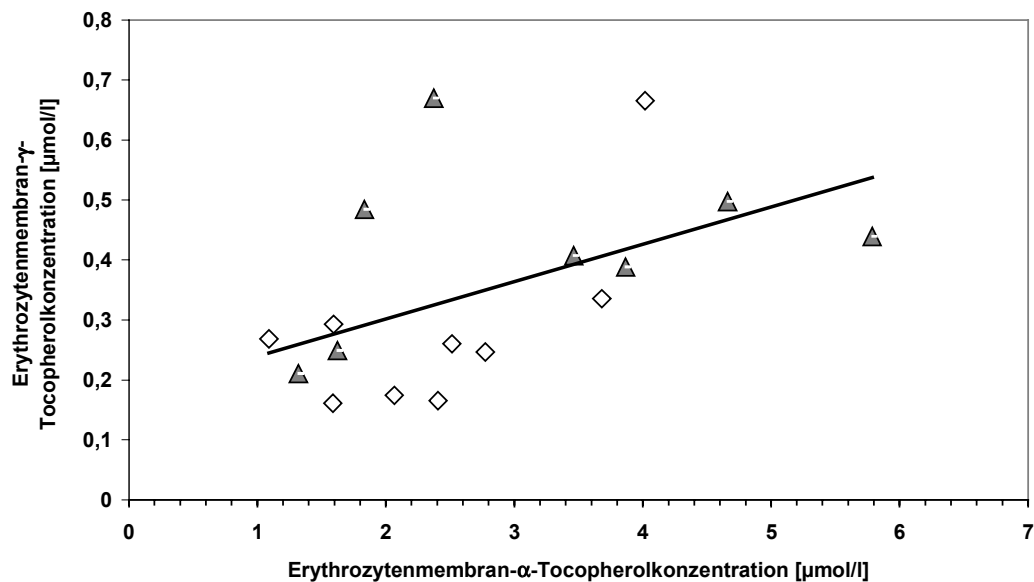
**Abb. 11** Zusammenhang der  $\gamma$ - und  $\alpha$ -Tocopherolkonzentration in den Erythrozytenmembranen der Thalassämiegruppe. Es besteht eine lineare Regression ( $r=0,79$ ,  $p<0,05$ ,  $n=14$ )

Die Abbildungen 11 bis 14 zeigen den Zusammenhang der  $\gamma$ - und  $\alpha$ -Tocopherolkonzentration in den Erythrozytenmembranen und im Plasma für die drei Probandengruppen.

Für die Kontrollgruppe betrug die  $\gamma$ -Tocopherolkonzentration der Erythrozytenmembranen 10 Prozent und im Plasma 6 Prozent der  $\alpha$ -Tocopherolkonzentration. Die  $\gamma$ -Tocopherolkonzentration der Hämochromatosegruppe betrug 10 Prozent der  $\alpha$ -Tocopherolkonzentration für Plasma und Erythrozytenmembranen.

Für die Thalassämiegruppe betrug die  $\gamma$ -Tocopherolkonzentration der Erythrozytenmembranen 12 Prozent der Plasmakonzentration und 23

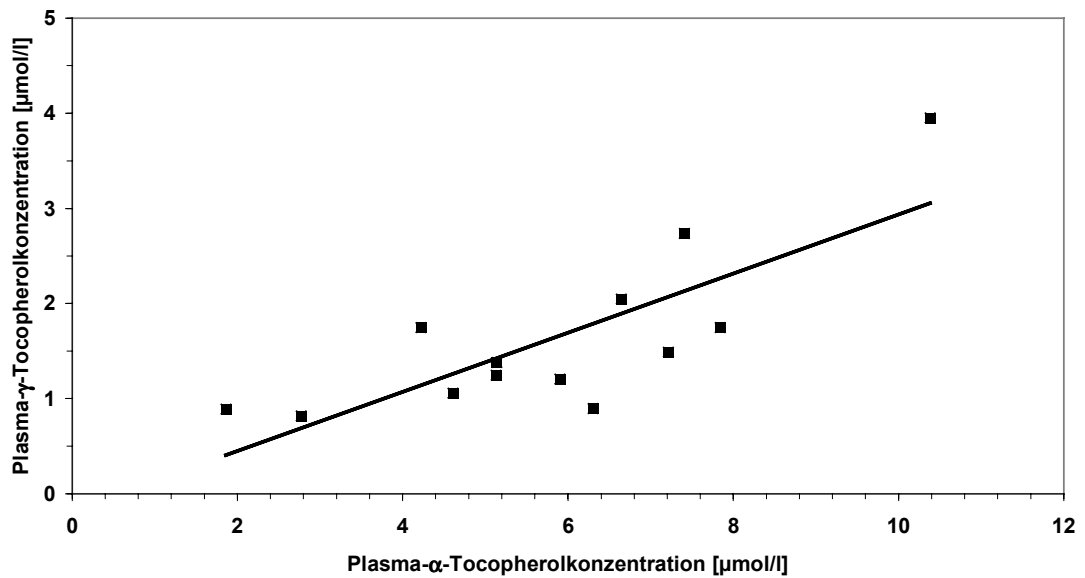
Prozent der Membran- $\alpha$ -Tocopherolkonzentration. Die  $\gamma$ -Tocopherolkonzentration im Plasma betrug 23 Prozent der Plasma- $\alpha$ -Tocopherolkonzentration. Damit war im Plasma die  $\gamma$ -Tocopherolkonzentration im Verhältnis zur  $\alpha$ -Tocopherolkonzentration doppelt so hoch wie im Hämochromatose- und Kontrollkollektiv.



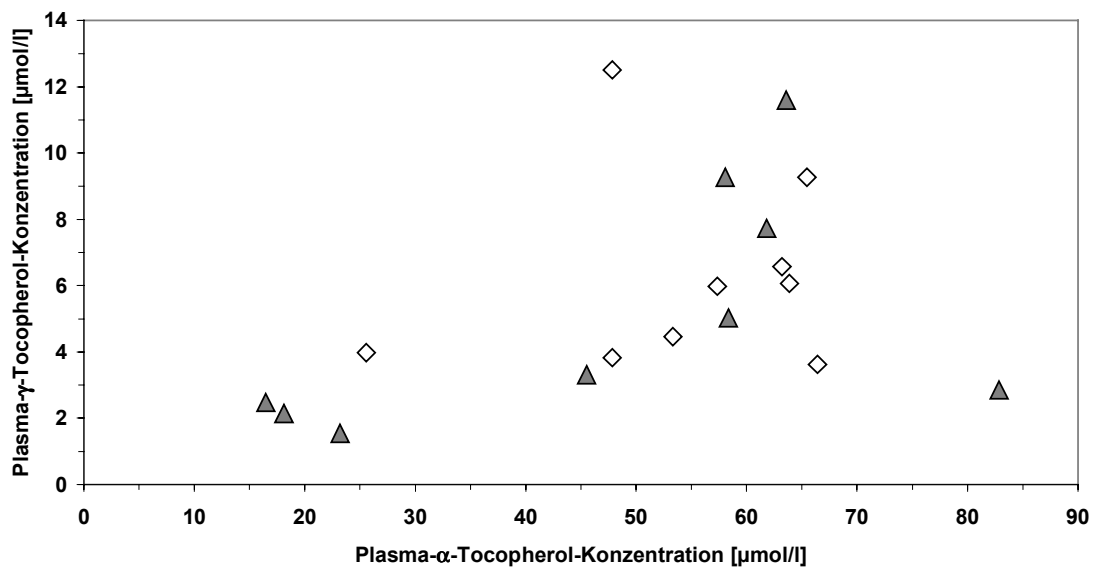
**Abb. 12** Zusammenhang der  $\gamma$ - und  $\alpha$ -Tocopherolkonzentration in den Erythrozytenmembranen der Kontroll-( $\Delta$ ) und Hämochromatosegruppe( $\diamond$ ). Es besteht eine lineare Korrelation in der Hämochromatosegruppe ( $r=0,68$ ,  $n=9$ ,  $p<0,05$ ) und für beide Gruppen ( $r=0,51$ ,  $n=17$ ,  $p<0,05$ ). Für die Kontrollgruppe ( $r=0,31$ ,  $n=8$ ) findet sich keine signifikante Korrelation. Die Linie entspricht der linearen Regression für beide Gruppen.

Eine signifikante Korrelation der  $\gamma$ - zur  $\alpha$ -Tocopherolkonzentration fand sich für die Erythrozytenmembranen der Thalassämiegruppe ( $r=0,79$ ,  $n=14$ ,  $p<0,05$ ) und der Hämochromatosegruppe ( $r=0,68$ ,  $n=9$ ,  $p<0,05$ ) sowie die Gesamtheit aus Hämochromatose- und Kontrollgruppe ( $r=0,51$ ,  $n=17$ ,  $p<0,05$ ). Für die Kontrollgruppe ( $r=0,31$ ,  $n=8$ ) allein fand sich keine signifikante Korrelation. Die  $\gamma$ - zur  $\alpha$ -Tocopherolkonzentration im Plasma korrelierten für die Thalassämiegruppe ( $r=0,79$ ,  $n=13$ ,  $p<0,05$ ) signifikant,

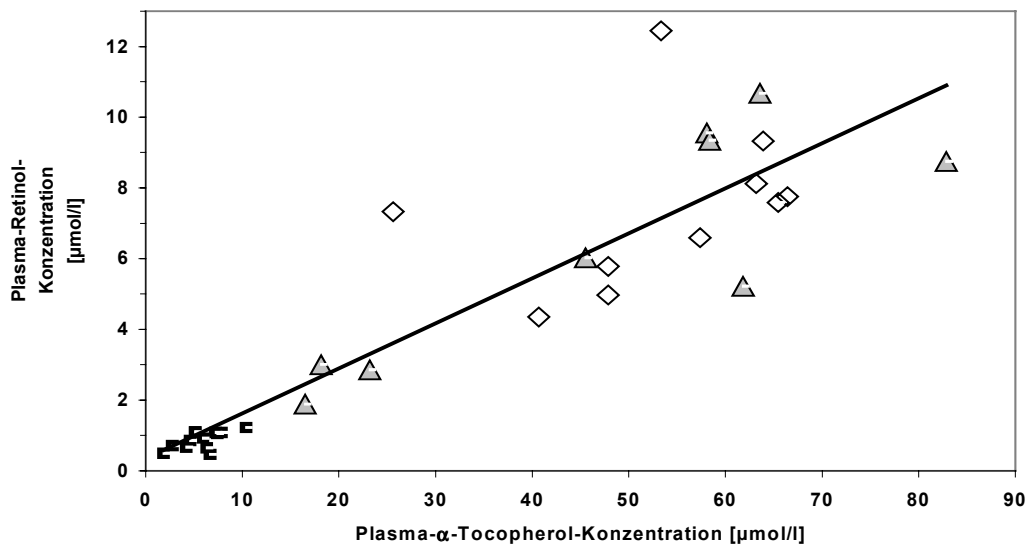
für die Hämochromatose- ( $r=0,54$ ,  $n=10$ ) und die Kontrollgruppe ( $r=0,17$ ,  $n=10$ ) jedoch nicht.



**Abb. 13** Zusammenhang zwischen der  $\gamma$ - und  $\alpha$ -Tocopherolkonzentration im Plasma für die Thalassämiegruppe. Es besteht eine signifikante lineare Korrelation ( $r=0,79$ ,  $p<0,05$ ,  $n=13$ )

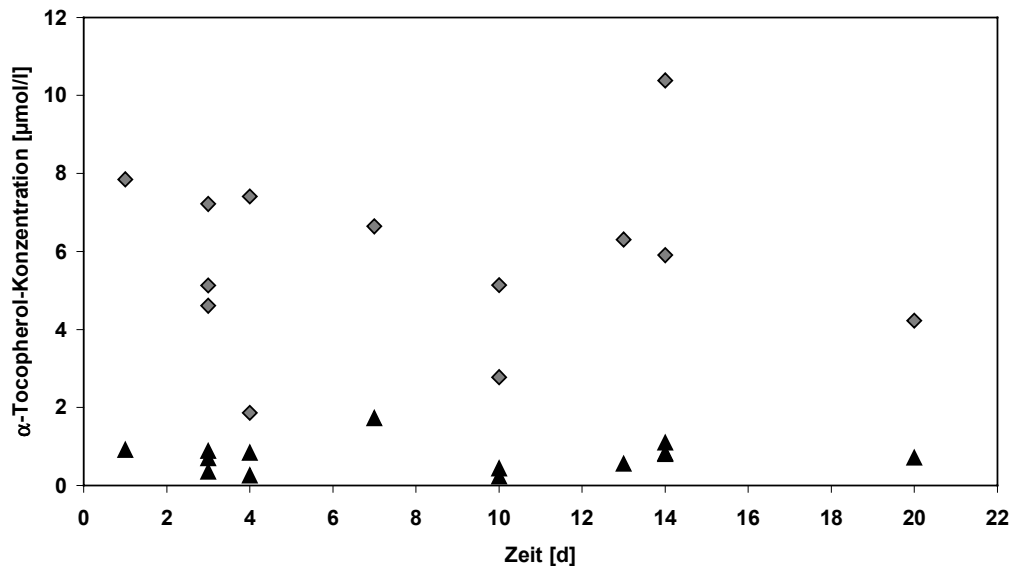


**Abb. 14** Zusammenhang der  $\gamma$ - und  $\alpha$ -Tocopherolkonzentration im Plasma der Kontroll- ( $\Delta$ ) und Hämochromatosegruppe ( $\diamond$ ). Es besteht keine signifikante Korrelation in der Hämochromatosegruppe ( $n=10$ ) und in der Kontrollgruppe ( $n=8$ ).



**Abb. 15** Zusammenhang zwischen der  $\alpha$ -Tocopherol-Konzentration und der Retinolkonzentration im Plasma für die Kontroll-( $\Delta$ ), Hämochromatose-( $\diamond$ ) und Thalassämiegruppe( $\blacksquare$ ), Linie=lineare Regression ( $r=0,91$ ,  $p<0,001$ ,  $n=32$ ) für alle Probanden

Die  $\alpha$ -Tocopherol-Konzentration und die Retinolkonzentration im Plasma bezogen auf alle Probanden korrelierten signifikant miteinander ( $r=0,91$ ,  $p<0,001$ ,  $n=32$ ) (Abb. 15).



**Abb. 16**  $\alpha$ -Tocopherol-Konzentration in Membranen( $\blacktriangle$ ) und im Plasma( $\blacklozenge$ ) der Thalassämiegruppe in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der letzten Transfusion

Die Patienten mit  $\beta$ -Thalassämie major erhielten regelmäßig im Abstand von einigen Wochen Bluttransfusionen. Demnach handelte es sich bei den Erythrozyten dieses Kollektivs zu einem nicht unerheblichen Teil um Spendererythrozyten, deren  $\alpha$ -Tocopherol-Konzentration im Normbereich liegen sollte, während diese Probanden erniedrigte  $\alpha$ -Tocopherol-Konzentrationen der Erythrozytenmembranen hatten. Die Abbildung 16 zeigt, dass die  $\alpha$ -Tocopherol-Konzentration in den Erythrozytenmembranen nicht vom Zeitpunkt der letzten Transfusion abhing. Für die  $\alpha$ -Tocopherol-Konzentration im Plasma war ein leichter Abfall, je länger die letzte Transfusion zurücklag, zu sehen. Dieser war aber nicht statistisch signifikant.

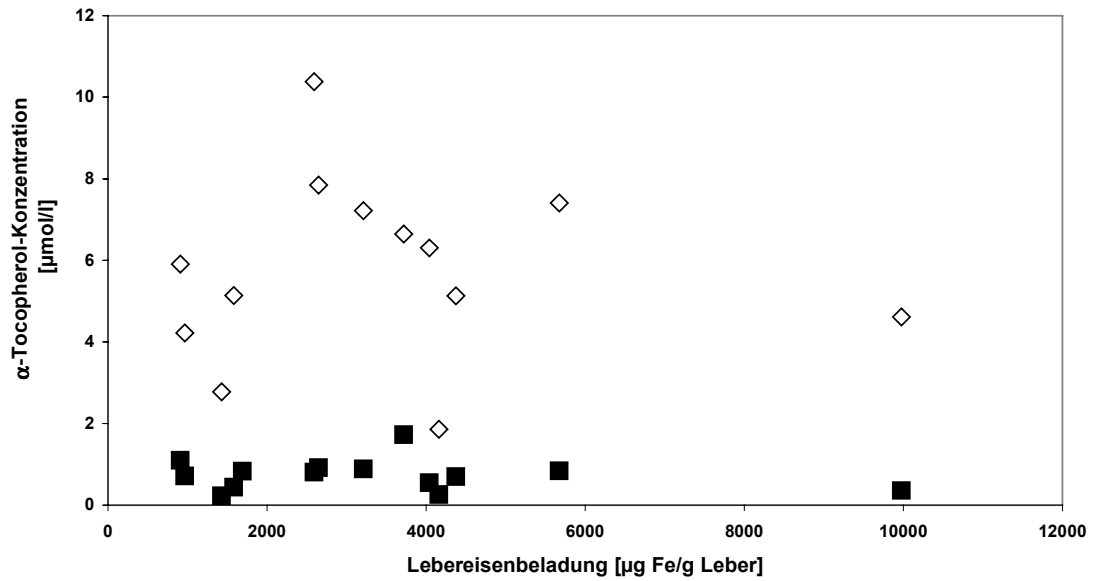
### **3.3. Vergleich der Vitaminkonzentrationen und der Eisenparameter**

Für alle Probanden wurden die Eisenparameter Transferrinsättigung, Serumferritin, nicht-transferrinebundenen Eisen (NTBI) und für die eisenüberladenen Probanden die Lebereisenbeladung bestimmt.

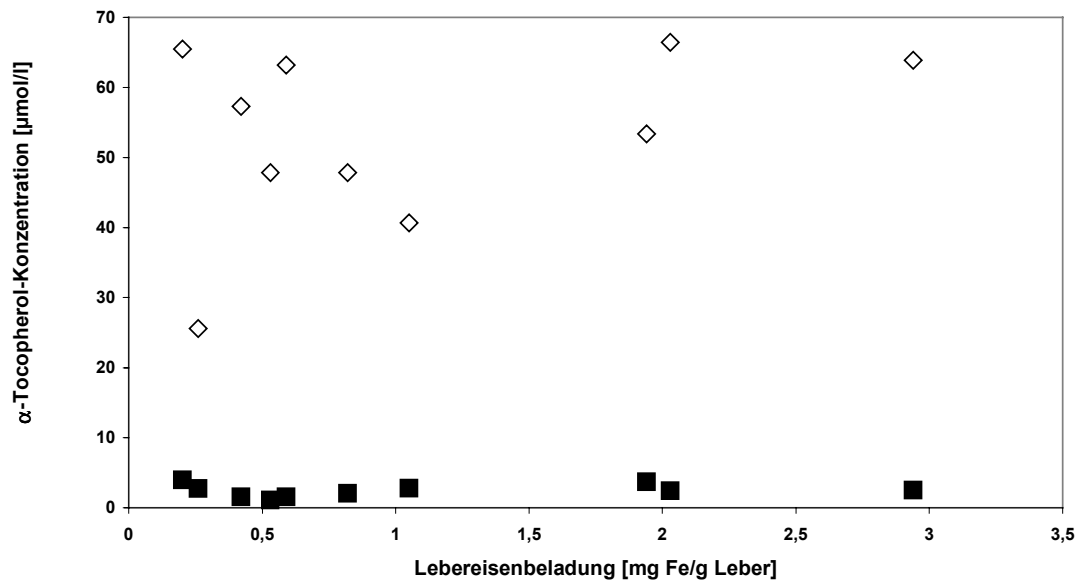
In der Kontrollgruppe waren Transferrinsättigung (20,0 bis 34,0 %, Normbereich 20 - 52 %) und Serumferritin (35 - 150 ng/ml, Normbereich 35 - 235 ng/ml) nicht erhöht. NTBI wurde erwartungsgemäss nicht gefunden.

Die an hereditärer Hämochromatose erkrankten 10 Probanden hatten eine Transferrinsättigung von 12 bis 91 Prozent (Mittelwert 46,6 %, SD  $\pm$  27,3 %, Normbereich 20 - 52 %). Für 4 Probanden war die Transferrinsättigung erhöht, für 2 erniedrigt. Die Serumferritinkonzentration betrug 6 bis 795 ng/ml Sie war für 3 Probanden erhöht und für 4 erniedrigt. Die Lebereisenbeladung war bei allen Probanden erhöht (0,2 bis 2,94 mg Fe/g Leber, Mittelwert 1,08 mg Fe/g Leber, SD  $\pm$  0,87 mg Fe/g Leber). NTBI wurde bei 3 Probanden gefunden (1,51, 2,4 und 4,55  $\mu$ mol/l).

Alle 14 an Thalassämie erkrankten Probanden hatten stark erhöhte Eisenparameter. Die Transferrinsättigung war mit 75 - 98 Prozent (Mittelwert 87,3 %, SD  $\pm$  5,3 %, Normbereich 20 - 52 %) und die Serumferritinkonzentration mit 1563 bis 9460 ng/ml (Mittelwert 3902 ng/ml SD  $\pm$  2120 ng/ml, Normbereich 35 - 235 ng/ml) stark erhöht. Die Lebereisenbeladung betrug 0,91 bis 9,97 mg Fe/g Leber (Mittelwert 2,93 mg Fe/g Leber, SD  $\pm$  2,23 mg Fe/g Leber). NTBI betrug 0,75 bis 5,52  $\mu$ mol/l.



**Abb. 17** Zusammenhang der  $\alpha$ -Tocopherol-Konzentration in den Erythrozytenmembranen(■) (n=14) und im Plasma(◇) (n=14) mit der Eisenbeladung der Leberzellen für die Thalassämiegruppe. Es gibt keine signifikante lineare Korrelation

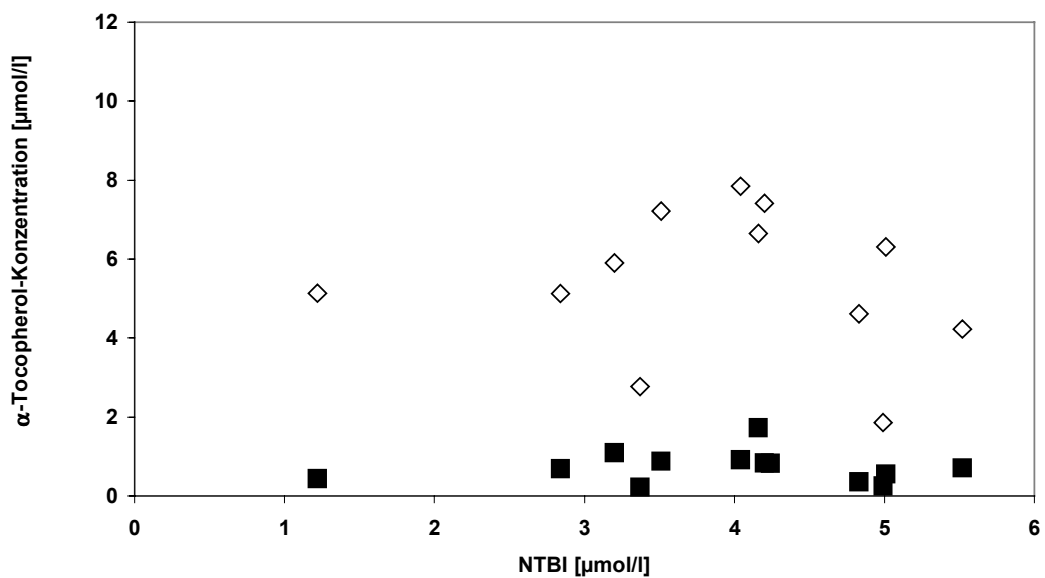


**Abb. 18** Zusammenhang der  $\alpha$ -Tocopherol-Konzentration in den Erythrozytenmembranen(■) (n=10) und im Plasma(◇) (n=10) mit der Eisenbeladung der Leberzellen (BLS) für die Hämochromatosegruppe. Es gibt keine signifikante Korrelation



Weder für die Thalassämie- noch für die Hämochromatosegruppe konnte ein Zusammenhang zwischen der Eisenaufladung der Leberzellen und der  $\alpha$ -Tocopherol-Konzentration der Erythrozytenmembranen und des Plasmas gezeigt werden (Abb. 17 und 18). Auch die Serumferritinkonzentration und die Transferrinsättigung korrelierten nicht mit der  $\alpha$ -Tocopherol-Konzentration.

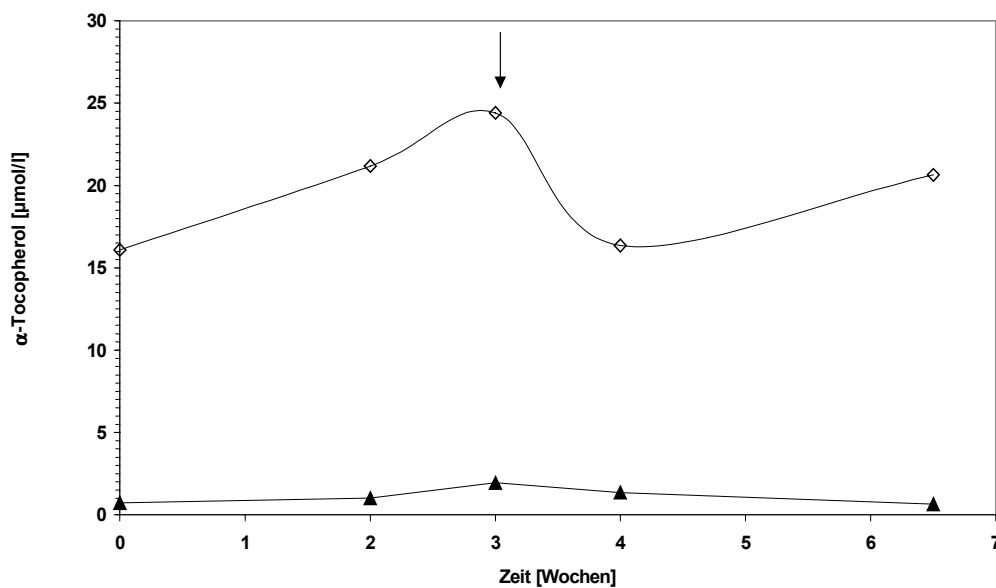
Für alle Thalassämiepatienten wurden erhöhte NTBI-Konzentrationen gemessen. Diese betragen maximal 5,52  $\mu\text{mol/l}$ . Die Plasma- und Membran- $\alpha$ -Tocopherol-Konzentration zeigten keinen Zusammenhang mit den NTBI-Konzentrationen (Abb. 19).



**Abb. 19** Zusammenhang der  $\alpha$ -Tocopherol-Konzentration mit der Konzentration an nichttransferringebundenes Eisen (NTBI) für Membranen( $\blacksquare$ ) (n=12) und Plasma( $\diamond$ ) (n=12) in der Thalassämiegruppe

### 3.4. Vitamin E-Substitution von Hämochromatosepatienten

Eine Hämochromatosepatientin, die ca. einmal wöchentlich durch Aderlaß therapiert wurde, erhielt ein  $\alpha$ -Tocopherol-Acetat-Präparat (RRR- $\alpha$ -Tocopherol-Acetat, Spondyvit, 400 mg täglich oral) für drei Wochen. Vor Gabe, nach zwei, drei, vier und 6,5 Wochen wurde die  $\alpha$ -Tocopherol-Konzentration in Plasma und in den Erythrozytenmembranen gemessen. Vor Beginn der Vitamin E-Substitution lag die  $\alpha$ -Tocopherol-Konzentration in den Erythrozytenmembranen 0,71  $\mu\text{mol/l}$  weit unter der Kontrollgruppe von 1,55 - 11,6  $\mu\text{mol/l}$ . Die Abbildung 20 zeigt die Entwicklung nach oraler Gabe des Vitamin E-Präparates. Deutlich zu sehen war, dass sowohl im Plasma, als auch in den Erythrozytenmembranen die  $\alpha$ -Tocopherol-Konzentration



**Abb. 20** Zeitlicher Verlauf der  $\alpha$ -Tocopherol-Konzentration einer mit RRR- $\alpha$ -Tocopherol-Acetat substituierten Patientin im Plasma( $\diamond$ ) und in den Erythrozytenmembranen( $\blacktriangle$ ). Das Präparat wurde für 3 Wochen eingenommen.

nach drei Wochen im Vergleich zum Beginn deutlich angestiegen war. Die  $\alpha$ -Tocopherol-Konzentration im Plasma stieg um 51,7 Prozent und in den Erythrozytenmembranen um 165,0 Prozent. Nach drei Wochen entsprach die  $\alpha$ -Tocopherol-Konzentration mit 1,95  $\mu\text{mol/l}$  der Kontrollgruppe. Nach Absetzen des Präparates sank die  $\alpha$ -Tocopherol-Konzentration wieder, im Plasma innerhalb einer Woche bis auf den Ausgangswert, in den Erythrozytenmembranen langsamer. 3,5 Wochen nach Absetzen des Präparates, war in den Erythrozytenmembranen die  $\alpha$ -Tocopherol-Konzentration auf den Ausgangswert gesunken.

## **4. Diskussion**

### **4.1. Methodische Ergebnisse zur Bestimmung der $\alpha$ -Tocopherolkonzentration in Erythrozytenmembranen**

Es wurden verschiedene Methoden beschrieben, um  $\alpha$ -Tocopherol in nicht hämolysierten Erythrozyten (Gonzalez-Corballa et al., 1994) und in hämoglobinfreien Membranen der Erythrozyten (Acuff et al., 1994, Bieri et al., 1979, Burton et al., 1982 und 1985, Dodge et al., 1962, Ingold et al., 1987, Kayden et al., 1973, Lehmann et al., 1983 und 1988, Vatassery et al., 1993, Rodriguez, et al., 1996) zu bestimmen. Bis auf wenige Ausnahmen wurde  $\alpha$ -Tocopherol mittels HPLC bestimmt. Nur Kayden (1973) benutzte eine Dünnschichtchromatographie.

Allen Methoden gemeinsam ist, dass die Erythrozyten nach Zentrifugation der Blutprobe durch Aspiration vom Plasma befreit und drei Mal in isotoner Kochsalzlösung gewaschen wurden. Gonzalez-Corballa et al. (1994) lösten mittels Ethanol-Pyrogallol-Gemisch die gepackten Erythrozyten, um darin  $\alpha$ -Tocopherol mittels HPLC zu bestimmen. Alle anderen Autoren befreiten die Erythrozytenmembranen vom Hämoglobin, in dem sie die gepackten Erythrozyten lysierten. Dies geschah durch Lyse in destilliertem Wasser, dem Zusätze beigefügt waren, die den Verlust von  $\alpha$ -Tocopherol verhindern sollten. Nach jeder Lyse wurden die Proben zentrifugiert und der Überstand abdekantiert. Dieser Vorgang mußte ein bis zwei Mal wiederholt werden, um hämoglobinfreie Membranen zu erhalten. Diese konnten dann auf bewährte Weise - durch Lösung in einem Alkohol - der Messung durch HPLC oder eine andere der oben angeführten Meßmethoden zugeführt werden. Die angeführten Methoden unterschieden sich im wesentlichen durch die verwendeten Zusätze. Verwendet wurden Ascorbinsäure, Ethylendiaminsäure (EDTA), Butylenhydroxytoluen (BHT) und Sodiumdodecylsulfat (SDS) in unterschiedlichen Mischungen und Konzentrationen. Unsere Methode zur Isolierung der Membranen erfolgte in Anlehnung an die Beschreibung von

Rodriguez et al. (1996), die Ascorbinsäure und EDTA als Zusätze verwendeten. In dieser Studie wurde EDTA in einer Konzentration von 0,375 mmol/l verwendet, da bei dieser Konzentration augenscheinlich vollständige Hämolyse ohne Ablagerung von ausgefällttem EDTA ablaufen konnte. Für die Ascorbinsäure wurde eine Konzentration von 7,5 µmol/l ermittelt. Mit diesen Zusätzen wurden die plasmafreien Erythrozyten 3 mal zentrifugiert. Dann war der Bodensatz deutlich entfärbt, so dass von vollständig abgelaufener Hämolyse ausgegangen werden konnte. Aus dieser Masse wurde nun α-Tocopherol extrahiert und der Bestimmung mittels HPLC zugeführt.

Unsere Methode bestimmte die alpha-Tocopherolkonzentration in den Erythrozytenmembranen mit hinreichender Genauigkeit und war reproduzierbar. Leider war die Laufzeit in der HPLC mit 30 Minuten sehr lang. Andere Autoren erreichten zehn Minuten (Lehmann, 1981, Kayden, 1973). Dafür wurde hier Vitamin A und E gleichzeitig gemessen, was wiederum Zeit zur Aufarbeitung einer weiteren Probe spart. Da die Aufarbeitung der Erythrozyten zur Eingabe in die HPLC zirka zwanzig Minuten dauerte, gingen wiederum nur wenige Minuten verloren, da auf Grund der Licht- und Wärmeempfindlichkeit des Vitamin E die Proben nach dem Auftauen zügig aufgearbeitet werden mussten und vor dem Einspritzen in die HPLC nicht lange stehen durften. Somit war diese Methode zwar langwierig, aber nicht uneffizient. Mit der in dieser Arbeit beschriebenen Methode konnten bis zu zwanzig Proben am Tag gemessen werden.

Andere Autoren beschrieben ähnliche Methoden mit ähnlichen Fehlergrößen. Zum Vergleich sei hier die Methode von Bieri et al (1979) erwähnt. Er fand eine alpha-Tocopherolkonzentration von  $4,41 \mu\text{mol/l} \pm 0,39 \mu\text{mol/l}$  in Erythrozyten, die er aus zehn Proben eines Probanden ermittelte. In diesem Fall wurden die Erythrozyten nach dreimaligem Waschen in isotoner Kochsalzlösung in einer 1:1 Lösung mit isotoner Kochsalzlösung, die 5 Prozent Pyrogallol enthielt, überführt und der weiteren Aufarbeitung zur HPLC-Methode zugeführt.

Andere Autoren benutzten mehr als eine antioxidative Substanz. Vatassery et al. (1993) zeigten zum Beispiel, dass der geringste Verlust an alpha-Tocopherol und Tocopherolquinone, gemessen in Erythrozyten, erzielt werden konnte, wenn BHT und Ascorbinsäure gleichzeitig verwendet wurden. Der Verlust an alpha-Tocopherol wurde durch Bestimmung des Anstiegs von Tocopherolquinone, dem Oxidationsprodukt des alpha-Tocopherols bestimmt. Dieser war am geringsten bei Verwendung aller drei Antioxidantien.

Während der Analyse von Erythrozytenproben können größere Verluste an alpha-Tocopherol entstehen. Dies entsprach sowohl unserer Beobachtung als auch der von anderen Autoren. Der Grund für den oxidativen Verlust von alpha-Tocopherol könnte die Anwesenheit von Eisen (Miller et al, 1990) und den Hämkomponenten (Dix et al., 1985) in den Erythrozyten sein.

Kayden et al. (1973) beschrieben eine Methode, die alpha-Tocopherol in Erythrozyten mittels Dünnschichtchromatographie und Spectrophotometrie bestimmte. Hierbei wurde Ascorbinsäure als Antioxidants verwendet. Dabei betrug die Ausbeute des Internen Standards im Durchschnitt von jeweils sechs Proben 79 und 70 Prozent bei Bestimmung des alpha-Tocopherols in den Erythrozyten, während sie 89 und 92 Prozent im entsprechenden Plasma betrug.

Mit der von Gonzalez-Corballa et al. (1994) beschriebenen Methode wurde Vitamin E in den plasmafreien Erythrozyten bestimmt, ohne sie vorher zu lysieren. Dabei wurden 150 µl Erythrozyten in einen Milliliter Ethanol mit 1 % Pyrogallol überführt und dann wie üblich weiter zur Bestimmung in der HPLC aufgearbeitet. Die Genauigkeit der Methode wurde bestimmt durch zehnmalige Messung einer Probe. Dabei betrug die alpha-Tocopherol-Konzentration im Plasma 12,53 µmol/l und in den Erythrozyten 8,7 µmol/l. Die Standardabweichung betrug 3,85 % im Plasma und 3,80 % in den Erythrozyten. Gemessen an zehn aufeinanderfolgenden Tagen betrug die Standardabweichung 7,8 % im Plasma und 7,1 % in Erythrozyten. Die Wiederentdeckung des Internen Standards betrug 92,84 % im Plasma und 94,08 % in Erythrozyten.

In dieser Studie konnte bei der Bestimmung der  $\alpha$ -Tocopherolkonzentration in den hämoglobinfreien Erythrozytenmembranen der Internen Standard zu 86,4 Prozent für 14 Proben eines Probanden wiedergefunden und zu 85,9 Prozent bei Messung von 11 Proben eines weiteren Probanden an drei aufeinanderfolgenden Tagen. Diese Ergebnisse sind mit den Ergebnissen von Kayden et al. (1973) und Gonzalez-Corballa et al. (1994) vergleichbar.

Die Messungen von 14 Proben eines Probanden ergaben 3,17  $\mu\text{mol/l}$   $\alpha$ -Tocopherol in den Erythrozytenmembranen mit einer Standardabweichung von 1,6  $\mu\text{mol/l}$ . Für einen weiteren Probanden fanden wir 1,47  $\mu\text{mol/l} \pm 0,4$   $\mu\text{mol/l}$  gemessen an drei aufeinanderfolgenden Tagen (s. Kap. 3.1.).

Rachmilewitz et al. (1979) fanden in hämoglobinfreien Erythrozytenmembranen und ganzen Erythrozyten  $\alpha$ -Tocopherolkonzentrationen die signifikant übereinstimmten. Ein Versuch  $\alpha$ -Tocopherol in nicht hämolysierten Erythrozyten zu bestimmen, brachte nicht ausreichend reproduzierbare Ergebnisse.

## **4.2. Vitamin E und Eisenparameter in den Probandengruppen**

### **4.2.1. Kontrollgruppe**

Für die Kontrollgruppe bestehend aus 9 gesunden Personen betrug der Medianwert der  $\alpha$ -Tocopherolkonzentration 58,04  $\mu\text{mol/l}$  im Plasma und liegt damit oberhalb des Normbereichs von 16 - 44  $\mu\text{mol/l}$  (Arnaud et al, 1991), während  $\gamma$ -Tocopherol mit einem Medianwert von 3,31  $\mu\text{mol/l}$  innerhalb des Normbereiches von 2,33 – 4,65  $\mu\text{mol/l}$  (Chow, 1985) liegt und Retinol mit einem Medianwert von 6,02  $\mu\text{mol/l}$  liegt ebenfalls oberhalb des Normbereichs von 1,0 – 3,5  $\mu\text{mol/l}$  (Arnaud et al, 1991). Die Erhöhung der Meßwerte über den Normbereich für  $\alpha$ -Tocopherol betraf sechs der neun Probanden, während die anderen drei Probanden Vitaminspiegel im unteren Normbereich gemessen wurden. Dies mag auf die ausgewogenen Ernährung der Probanden zurückzuführen sein.

Für die Vitaminspiegel in den Erythrozytenmembranen wurde gefunden, dass der Medianwert der  $\alpha$ -Tocopherolkonzentration mit 2,37  $\mu\text{mol/l}$  innerhalb des Normbereiches von 1,16 – 4,65  $\mu\text{mol/l}$  (Chow, 1985) und der Medianwert der  $\gamma$ -Tocopherolkonzentration mit 0,42  $\mu\text{mol/l}$  innerhalb des Normbereiches von 0,23 – 0,93  $\mu\text{mol/l}$  (Chow, 1985) liegt.

### **4.2.2. Hereditäre Hämochromatose**

Wie bereits in Kapitel 3.4. erwähnt handelt es sich bei der Gruppe der an hereditärer Hämochromatose erkrankten Probanden um gering eisenüberladene Patienten. Trotz des weiten Altersspektrums von 28 bis 87 Jahren wurde kein altersabhängiger oder geschlechtsspezifischer Zusammenhang gefunden. Alle Patienten waren über Jahre sehr gut compliant und kamen regelmäßig zum therapeutischen Aderlaß.



Über die Vitaminspiegel der Probanden mit hereditärer Hämochromatose im Plasma ließen sich folgende Aussagen machen: der Medianwert der  $\alpha$ -Tocopherolkonzentration lag mit 55,34  $\mu\text{mol/l}$  oberhalb des Normbereichs von 16 - 44  $\mu\text{mol/l}$  (Arnaud et al., 1991), während  $\gamma$ -Tocopherol mit einem Medianwert von 5,98  $\mu\text{mol/l}$  oberhalb des Normbereiches von 2,33 – 4,65  $\mu\text{mol/l}$  (Chow, 1985) lag und Retinol mit einem Medianwert von 7,46  $\mu\text{mol/l}$  lag ebenfalls oberhalb des Normbereichs von 1,0 – 3,5  $\mu\text{mol/l}$  (Arnaud et al., 1991).

Für die Vitaminspiegel in den Erythrozytenmembranen wurde gefunden, dass der Medianwert der  $\alpha$ -Tocopherolkonzentration mit 2,46  $\mu\text{mol/l}$  innerhalb des Normbereiches von 1,16 – 4,65  $\mu\text{mol/l}$  (Chow, 1985) und der Medianwert der  $\gamma$ -Tocopherolkonzentration mit 0,26  $\mu\text{mol/l}$  innerhalb des Normbereiches von 0,23 – 0,93  $\mu\text{mol/l}$  (Chow, 1985).

Für diese gering eisenüberladenen Hämochromatosepatienten waren die Vitamin E- und A-Spiegel nicht erniedrigt. Es wurde kein Zusammenhang zwischen der Lebereisenaufladung und den Vitaminspiegeln festgestellt (siehe Abb. 18). Hier bestand ebenso wie für die Kontrollgruppe kein Zusammenhang zwischen  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Tocopherolkonzentration im Plasma zur jeweiligen Konzentration in den Erythrozytenmembranen (siehe Abb. 9 und 10)

#### **4.2.3. b-Thalassämie major**

Alle Thalassämiepatienten hatten die Diagnose  $\beta$ -Thalassämia major. Sie waren transfusionspflichtig und wurden nicht mit einem Vitamin E-Präparat substituiert. Zum Untersuchungszeitpunkt waren sie stark eisenüberladen wie in Kapitel 3.4. beschrieben. Die Vitamin E-Spiegel waren sowohl im Plasma als auch in den Erythrozytenmembranen erniedrigt. Alle Patienten erhielten einmal täglich, meistens über Nacht eine subcutane Infusion des Eisenchelators Desferrioxamin.

Der Medianwert der  $\alpha$ -Tocopherolkonzentration im Plasma lag mit 5,9  $\mu\text{mol/l}$  unterhalb des Normbereichs von 16 - 44  $\mu\text{mol/l}$  (Arnaud et al, 1991) und auch unterhalb der von Ingold et al. (1987) angegebenen unteren Grenze des Normbereichs von 11,5  $\mu\text{mol/l}$ , während  $\gamma$ -Tocopherol mit einem Medianwert von 1,38  $\mu\text{mol/l}$  unterhalb des Normbereiches von 2,33 – 4,65  $\mu\text{mol/l}$  (Chow, 1985) lag und Retinol mit einem Medianwert von 0,92  $\mu\text{mol/l}$  liegt ebenfalls unterhalb des Normbereichs von 1,0 – 3,5  $\mu\text{mol/l}$  (Arnaud et al, 1991).

Für die Vitaminspiegel in den Erythrozytenmembranen wurde gefunden, dass der Medianwert der  $\alpha$ -Tocopherolkonzentration mit 0,75  $\mu\text{mol/l}$  unterhalb des Normbereiches von 1,16 – 4,65  $\mu\text{mol/l}$  (Chow, 1985) und der Medianwert der  $\gamma$ -Tocopherolkonzentration mit 0,17  $\mu\text{mol/l}$  unterhalb des Normbereiches von 0,23 – 0,93  $\mu\text{mol/l}$  (Chow, 1985) lag. Alle Vitaminspiegel waren auch gegenüber unserer Kontrollgruppe erniedrigt.

Diese Ergebnisse wurden auch von anderen Autoren bestätigt. Erniedrigte Serum-Vitamin E-Spiegel wurden für an  $\beta$ -Thalassämia major erkrankte Patienten gefunden (Zannos-Mariolea et al., 1974 und 1978, Stocks et al., 1972, Rachmilewitz et al., 1976 und 1979, Gardini et al., 1981, De Luca et al., 1999). Im Gegensatz dazu wurde in einer Studie trotz erniedrigter Plasmaspiegel für die Erythrozyten von drei  $\beta$ -Thalassämia major-Patienten normale Vitamin E-Konzentrationen gefunden (Rachmilewitz et al., 1979).

In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass die hochdosierte orale Gabe von Vitamin E zu einem Anstieg der Serum-Vitamin E-Konzentration (Fuchs et al, 1996, Rachmilewitz et al., 1979, Hyman, 1974) und auch zu einem Anstieg der Vitamin E-Konzentration der Erythrozyten (Rachmilewitz et al., 1979) führte. Dahingegen zeigten Giardini et al (1981) in einer Studie an 30 Patienten mit  $\beta$ -Thalassämia major, dass nur die parenterale Gabe von Vitamin E zu einer signifikanten Steigerung der Vitamin E-Konzentration im Serum und in den Erythrozyten führte, die orale Gabe hingegen führte zu keiner relevanten Veränderung der Vitamin E-Konzentrationen. Sowohl Rachmilewitz et al. (1979) als auch Giardini et al (1981) beobachteten kein

signifikant verlängertes Zeitintervall für den Transfusionsbedarf unter Vitamin E-Substitution.

Deutlicher konnte der Effekt von oraler Vitamin E-Substitution an Patienten mit  $\beta$ -Thalassämie intermedia, einer milderen Verlaufsform der Thalassämie, bei der die Patienten nicht regelmäßig transfusionspflichtig sind, gezeigt werden. Nach 6 Monaten war die Vitamin E-Konzentration der Erythrozyten normalisiert und eine Verbesserung der Resistenz der Erythrozyten gegen osmotische Lyse wurde beobachtet, obwohl sich die Hämoglobinkonzentration nicht geändert hatte (Tesoriere et al., 2001).

In unserer Studie fand sich kein Zusammenhang zwischen der Vitamin E-Konzentration im Plasma und in den Erythrozyten zur Zeit nach der letzten Bluttransfusion (Abbildung 16). Da die Vitamin E-Konzentration der Spendererythrozyten denen normaler Kontrollen entsprechen dürfte, wäre eine erhöhte Vitamin E-Konzentration der Erythrozyten kurz nach der Transfusion zu erwarten. Rachmilewitz et al. (1979) fanden für 5 mit Vitamin E behandelte und 5 unbehandelte Patienten vor und nach der Transfusion keinen Unterschied in der Serum-Vitamin E-Konzentrationen. Dies zeigt, dass Vitamin E-Substitution den großen Schaden, der an Spendererythrozyten durch die Eisenüberladung entsteht, nicht abwenden kann.

In dieser Studie besteht ein mäßig signifikanter Zusammenhang zwischen der Erythrozytenmembran- und Plasma-Vitamin E-Konzentration der Thalassämiepatienten für sowohl für  $\alpha$ - als auch für  $\gamma$ -Tocopherol (siehe Abbildung 8 und 10). Frühere Studien zeigten, dass niedrige Plasma-Vitamin E-Konzentrationen nicht unbedingt ein Defizit an Vitamin E in Zellen zeigt, sondern auch auf erniedrigte Serumlipide zurückgeführt werden kann (Horwitt et al., 1972). Die totalen Lipidkonzentrationen waren für Patienten mit  $\beta$ -Thalassämia major in mehreren Studien signifikant erniedrigt (Zannos-Mariolea et al., 1978, De Luca et al., 1999).

Für alle Thalassämiepatienten wurden erhöhte NTBI-Konzentrationen gemessen. Diese betragen maximal 5,52  $\mu\text{mol/l}$ . Die Plasma- und Membran-

$\alpha$ -Tocopherol-Konzentrationen zeigten keinen Zusammenhang mit den NTBI-Konzentrationen. Dies wurde auch durch die Medizinische Dissertation von Reller (1998) gezeigt, die erst einen signifikanten Abfall der Plasma- $\alpha$ -Tocopherolkonzentration bei NTBI-Konzentrationen über 5,5  $\mu\text{mol/l}$  in 120 Thalassämiepatienten fand. De Luca et al. (1999) fanden eine signifikante Korrelation zwischen Vitamin E und NTBI in einem Kollektiv aus 48 transfusionspflichtigen  $\beta$ -Talassämie-Patienten. Ein Zusammenhang zwischen Vitamin E und Ferritin konnte sowohl in unserer als auch in den o.g. Studien (Reller, 1998, De Luca et al., 1999) nicht gefunden werden. Porter et al., (1996) zeigten, dass durch die subcutane Desferrioxamin-Infusion, die über nacht gegeben wurde, die NTBI-Konzentration auf fast normale Konzentrationen sank, aber nach 2 bis 4 Stunden wieder anstieg.

### **4.3. Bedeutung von Vitamin E in den Erythrozyten als Parameter für den Ernährungsstatus**

Um den Vitamin E-Status zu untersuchen, wurde in den meisten Studien  $\alpha$ -Tocopherol im Plasma oder Serum, aber auch in Erythrozyten, Lymphozyten, Thrombozyten, Lipoproteinen, Fettgewebe und Zellen der Wangenschleimhaut bestimmt. Weiterhin wurde  $\gamma$ -Tocopherol im Plasma bestimmt, um einen Vitamin E-Status zu erhalten.

Die Erythrozyten- $\alpha$ -Tocopherol-Konzentrationen wurden in vielen Patientengruppen genutzt, um einen Vitamin E-Status zu bestimmen, zum Beispiel an Patienten mit Cystischer Fibrose (Farrell et al., 1977), an Früh-, und Neugeborenen und Kindern (Mino et al., 1985) sowie an Hypertonikern (Wen et al., 1996).

Über den Metabolismus des Vitamin E zwischen Erythrozyten und Plasma ist wenig bekannt. Bei Ratten war der Austausch vom Plasma- $\alpha$ -Tocopherol zu den Erythrozyten innerhalb weniger Stunden abgeschlossen (Silber, 1969, Poukka, 1970, Bjornson, 1975). Zwei neuere Arbeiten untersuchten den Mechanismus der Bindung von  $\alpha$ -Tocopherol aus dem Plasma an Erythrozyten in vivo an gesunden Menschen. Bei einem Versuch mit 30 gesunden Probanden, die 75 mg [ $^3$ H] $\alpha$ -Tocopherol mit einer Mahlzeit eingenommen hatten, wurde im Verlauf der folgenden 51 Stunden keine Korrelation zwischen dem neu aufgenommenen  $\alpha$ -Tocopherol und der Erythrozyten- $\alpha$ -Tocopherol-Konzentration beobachtet. Dies zeigte, dass die Fähigkeit der Erythrozyten Vitamin E aufzunehmen, unabhängig von der bestehenden Erythrozyten- $\alpha$ -Tocopherol-Konzentration war. Allerdings korrelierte die Zunahme an  $\alpha$ -Tocopherol im Plasma mit der Erythrozyten- $\alpha$ -Tocopherol-Konzentration invers, so dass hier ein Zusammenhang anzunehmen war (Roxborough et al., 2000). Belizzi et al. (1996) konnten

zeigen, dass die Bindung von [<sup>3</sup>H]α-Tocopherol an menschlichen Erythrozyten reversibel war und einer Sättigung unterlag.

Es gab mehrere Studien, die die Sensitivität der Bestimmung von α-Tocopherol vergleichend untersuchten.

Lehmann et al. (1988) fanden, dass Thrombozyten sensitivere Marker für die Vitamin E-Aufnahme sind, als Erythrozyten. Für die Erythrozyten und Plasma war die Sensitivität annähernd gleich. Dahingegen fanden Yaoi et al. (1984) eine enge Korrelation zwischen der α-Tocopherolkonzentration der Erythrozyten und Thrombozyten bei gesunden Erwachsenen.

Kaempf et al. (1994) untersuchten den Vitamin E-Status an 28 Neugeborenen und 92 Kindern in Plasma, Erythrozyten, Thrombozyten, Leukozyten und in Zellen der Wangenschleimhaut. Die Plasma-, Leukozyten- und Wangenschleimhautzellen-α-Tocopherol-Konzentrationen der Neugeborenen stiegen in der ersten Lebenswoche signifikant an. Dahingegen veränderten sich die α-Tocopherol-Konzentrationen der Erythrozyten und der Thrombozyten nicht. Dies wurde auch für die älteren Kinder über einen längeren Zeitraum beobachtet. Die Autoren schlugen vor, dass Zellen, die LDL-Rezeptoren besitzen, wie Leukozyten und die Zellen der Wangenschleimhaut, bessere Marker für den Vitamin E-Status sind, als Thrombozyten und Erythrozyten.

Zwischen gesunden Personen sind erhebliche Unterschiede in der Aufnahme von α-Tocopherol in Plasma und Erythrozyten bekannt. Die Aufnahme von α-Tocopherol variiert dahingegen intraindividuell wenig und ist auch über längere Zeiträume hinweg konstant (Roxborough et al., 2000, Traber et al., 1998).

In dieser Studie wurde α-Tocopherol in Erythrozyten und im Plasma für eine Kontrollgruppe sowie Patienten mit Hämochromatose und β-Thalassämie major bestimmt. In unserer Kontrollgruppe bestand keine Korrelation zwischen der α-Tocopherolkonzentration im Plasma und in den Erythrozytenmembranen.

In der Hämochromatosegruppe unterschieden sich die  $\alpha$ -Tocopherolkonzentrationen im Plasma und in den Erythrozytenmembranen nicht von denen der Kontrollgruppe und zeigten keine Korrelation zwischen der  $\alpha$ -Tocopherolkonzentration im Plasma und der in den Erythrozytenmembranen. In dieser Studie wurde kein Zusammenhang zwischen den Eisenparametern Ferritin, Transferrinsättigung, nicht-transferringebundenes Eisen und Lebereisenbeladung zur  $\alpha$ -Tocopherolkonzentration im Plasma und in den Erythrozytenmembranen gefunden.

Davon abweichend wurde bei einer Hämochromatosepatientin eine erniedrigte  $\alpha$ -Tocopherolkonzentration in der Erythrozytenmembran trotz normwertiger Plasma- $\alpha$ -Tocopherolkonzentration gemessen. Die Probandin zeigte erhöhte Eisenparameter (Transferrinsättigung 85 %, Serum-Ferritin 1072 mg/l, BLS 0,9 mg Fe/g Leber).

Auf Grund der erniedrigten  $\alpha$ -Tocopherol-Konzentration in den Erythrozytenmembranen wurde ein Substitutionsversuch mit RRR- $\alpha$ -Tocopherol-Acetat 400 mg täglich oral als Einmalgabe für 3 Wochen durchgeführt. Da RRR- $\alpha$ -Tocopherol-Acetat die höchste Bioverfügbarkeit unter den oral verfügbaren Tocopherolpräparaten (Dimitrov et al., 1996, Horwitt et al, 1984, Leth, 1977, Ames, 1979, Mason, 1947) besitzt, wurde dieses ausgewählt.

Die  $\alpha$ -Tocopherol-Konzentration im Plasma stieg innerhalb von drei Wochen um 51,7 Prozent und in den Erythrozyten um 165,0 Prozent. Damit reichte die erhöhte Konzentration im Plasma offenbar aus, um die Konzentration in den Erythrozyten auf Werte zu steigern, die der Kontrollgruppe entsprachen. Nach Absetzen des Präparates sank die  $\alpha$ -Tocopherol-Konzentration im Plasma und in den Erythrozytenmembranen wieder ab. Im Plasma wurde innerhalb einer Woche der Ausgangswert gemessen, in den Erythrozytenmembranen erst nach 3,5 Wochen. Dies sollte in größeren Studien validiert und näher untersucht werden.

In der Thalassämiegruppe waren die  $\alpha$ -Tocopherolkonzentrationen im Plasma und in den Erythrozytenmembranen im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erniedrigt. Die  $\alpha$ -Tocopherolkonzentrationen im Plasma korrelierte mit der der Erythrozytenmembranen. Die  $\alpha$ -Tocopherolkonzentration im Plasma und in den Erythrozytenmembranen korrelierte zwar nicht mit den einzelnen Eisenparametern, diese waren insgesamt aber pathologisch erhöht.

Solange der Stoffwechsel des Vitamin E nicht vollständig geklärt ist, bietet die Bestimmung von Vitamin E in Erythrozyten eine sinnvolle Ergänzung zur Bestimmung im Plasma.

Obwohl 10 mal mehr  $\gamma$ -Tocopherol mit der Nahrung aufgenommen wird (Bieri et al., 1974), fand man  $\alpha$ -Tocopherol in 5 bis 10 mal höheren Konzentrationen im Plasma (Traber et al., 1989). Dem  $\gamma$ -Tocopherol wird auf Grund seiner Struktur eine bedeutende Rolle beim Schutz der Zelle vor reaktiven Stickstoffmetaboliten zugeschrieben. Diese Funktion kann  $\alpha$ -Tocopherol strukturell nicht wahrnehmen (Christen et al., 1997). El-Sohemy et al. (2001) zeigten in einer Studie mit 531 gesunden Probanden, dass die Plasma- und Fettgewebs- $\gamma$ -Tocopherolkonzentration ein besserer Parameter für die  $\gamma$ -Tocopherol-Aufnahme mit der Nahrung ist, als die  $\alpha$ -Tocopherolkonzentration im Plasma für die Aufnahme von  $\alpha$ -Tocopherol. Gamma-Tocopherol korrelierte mit  $\alpha$ -Tocopherol im Plasma und im Fettgewebe. Dass die  $\alpha$ -Tocopherolkonzentration im Plasma nicht die Aufnahme von  $\alpha$ -Tocopherol widerspiegelt, wurde auf die Regulation der  $\alpha$ -Tocopherolkonzentration im Plasma durch das  $\alpha$ -Tocopherol-bindende Protein ( $\alpha$ -TTP) zurückgeführt.

Unsere Ergebnisse zeigten, dass die Erythrozytenmembran- $\gamma$ -Tocopherolkonzentration mit der Erythrozytenmembran- $\alpha$ -Tocopherolkonzentration in der Thalassämiegruppe, in der Hämochromatosegruppe und in der Kontrollgruppe korrelierte. Die Plasma- $\gamma$ -



Tocopherolkonzentration korrelierte nur in der Thalassämiegruppe mit der Plasma- $\alpha$ -Tocopherolkonzentration, nicht dagegen für Hämochromatose- und Kontrollgruppe. Die Erythrozytenmembran- $\gamma$ -Tocopherolkonzentration betrug 10 bis 12 Prozent der Erythrozytenmembran- $\alpha$ -Tocopherolkonzentration in allen Probandengruppen. Im Plasma betrug die  $\gamma$ -Tocopherolkonzentration 23 Prozent der Plasma- $\alpha$ -Tocopherolkonzentration für die Thalassämiegruppe, 10 Prozent für die Hämochromatosegruppe und 6 Prozent für die Kontrollgruppe. Dies bestätigt die Ergebnisse von Traber et al. (1989), die fanden, dass die Plasma- $\gamma$ -Tocopherolkonzentration 10 bis 20 Prozent der Plasma- $\alpha$ -Tocopherolkonzentration betrug. Auch El-Sohemy et al. (2001) gaben an, dass die  $\gamma$ -Tocopherolkonzentration 10 Prozent der  $\alpha$ -Tocopherolkonzentration im Plasma betrug. Die  $\gamma$ -Tocopherolkonzentration in Erythrozytenmembranen und im Plasma ist ein zusätzlicher Parameter zur Bestimmung der Vitamin E-Status.

## 5. Zusammenfassung

Vitamin E ist das wichtigste lipidlösliche Antioxidant, das die Zellmembranschädigung durch Oxidantien, wie Eisen, unterbinden kann. Diese Funktion des Vitamin E spielt für Krankheiten mit vermehrter Eisenablagerung im Gewebe, wie  $\beta$ -Thalassämie major und Hämochromatose, eine besondere Rolle. Vitamin E wird häufig im Plasma bestimmt.

Es wurde eine Methode entwickelt, die häufigsten Formen des Vitamin E,  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Tocopherol, in isolierten Erythrozytenmembranen mittels HPLC zu bestimmen. Diese wurden für eine Kontrollgruppe (1,32 - 5,79  $\mu\text{mol/l}$   $\alpha$ -Tocopherol, 0,21 - 0,67  $\mu\text{mol/l}$   $\gamma$ -Tocopherol) sowie Patienten mit  $\beta$ -Thalassämie major (0,23 - 1,73  $\mu\text{mol/l}$  bzw. 0,04 - 0,46  $\mu\text{mol/l}$ ) und Hämochromatose (1,09 - 4,02  $\mu\text{mol/l}$  bzw. 0,16 - 0,67  $\mu\text{mol/l}$ ) bestimmt. Außerdem wurden die  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Tocopherol-Konzentration im Plasma sowie nichttransferringebundenes Eisen, Ferritin, Transferrinsättigung und die Lebereisenbelastung bestimmt.

Für die durch regelmäßige Transfusionen sekundär stark eisenbeladenen Patienten der Thalassämiegruppe war die Vitamin E-Konzentration in den Erythrozytenmembranen und im Plasma im Vergleich zur Kontrollgruppe stark vermindert. Es bestand eine Korrelation zwischen den Vitamin E-Konzentrationen in den Erythrozytenmembranen und im Plasma. Die Vitamin E-Konzentration in Plasma und Erythrozytenmembranen war unabhängig vom Zeitpunkt der letzten Transfusion.

Die Vitamin E-Konzentrationen in den Erythrozytenmembranen und im Plasma der gering eisenüberladenen Hämochromatosepatienten entsprachen denen der Kontrollgruppe. In der Kontroll- und Hämochromatosegruppe fand sich keine Korrelation zwischen Vitamin E im Plasma und in den Erythrozytenmembranen. Eine Hämochromatosepatientin, die eine erniedrigte Vitamin E-Konzentration in den Erythrozytenmembranen trotz normwertiger Vitamin E-Konzentration im Plasma hatte, wurde mit einem oralen Vitamin E-Präparat substituiert. Nach drei Wochen Substitution war die Vitamin E-Konzentration in den Erythrozytenmembranen normwertig.

## 6. Alphabetisches Literaturverzeichnis

Acuff RV, Thedford SS, Hidioglou NN, Papas AM, Odom TA (1994) Relative bioavailability of RRR- and all-rac- $\alpha$ -tocopheryl acetate in humans: studies using deuterated components. *Am J Clin Nutr* 60:397-402

Advani R, Sorensen S, Shihar E, Londe W, Rachmilewitz E, Schrier SL (1992) Characterization and comparison of the RBCM damage in severe human  $\alpha$ - and  $\beta$ -thalassemia. *Blood* 79:1058-63

Ames SR (1979) Biopotencies in rats of several forms of  $\alpha$ -Tocopherol. *J Nutr* 109:2198-2204

Andrews NC (1999) Disorders of iron metabolism. *N Engl J Med* 344:1986-1995

Arita M, Sato Y, Miyata A, Tanabe T, Takahashi (1995) Human  $\alpha$ -tocopherol transfer protein: cDNA cloning expression and chromosomal localisation. *Biochem J* 306:437-443

Arnaud J, Fortis I, Blachier S, Kia D, Favier A (1991) Simultaneous determination of retinol,  $\alpha$ -tocopherol and  $\beta$ -carotene in serum by isocratic HPLC. *J Chromatogr* 572:103-116

Bahram S, Gilfillan S, Kuhn LC, Moret R, Schulze JB, Lebeau A, Schumann K (1999) Experimental hemochromatosis due to MHC class I HFE deficiency: immune status and iron metabolism. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:13312-13317

Bauminger ER, Cohen SG, Offer S, Rachmilewitz EA (1979) Quantitative studies of ferritin-like iron in erythrocytes of thalassemia, sickle cell anemia

and haemoglobin Hammersmith by Mossbauer spectroscopy. Proc Natl Acad Sci USA 76:939-946

Bellizi MC, Dutta-Roy AK, James WPT (1996) Alpha-tocopherol binding activity of human red blood cells: implication in nutritional assessment of vitamin E status. Biochem Soc Trans 24:201S

Bieri JG, Evarts RP (1974) Gamma-tocopherol: metabolism, biological activity and significance in human nutrition. Am J Clin Nutr 27:980-986

Bieri JG, Evarts RP, Throp S (1977) Factors affecting the exchange of tocopherol between red blood cells and plasma. Am J Clin Nutr 30:686-690

Bieri JG, Tolliver TJ, Catignani GL (1979) Simultaneous determination of  $\alpha$ -tocopherol and retinol in plasma and red cells by high pressure liquid chromatography. Am J Clin Nutr 32:2143-2149

Bieri JG, Corash L, Hubbard VS (1983) Medical uses of vitamin E. N Engl J Med 308:1063-1071

Bjornson LK, Gniekowski C, Kayden HJ (1975) Comparison of exchange of alpha tocopherol and free cholesterol between rat plasma lipoproteins and erythrocytes. J Lipid Res 16:39-53

Britton RS, Bacon BR (1994) Role of free radicals in liver diseases and hepatic fibrosis. Hepato-Gastroenterol 41:343-348

Brunori M, Falcioni G, Fioreti E, Giardina B, Rotilio G (1975) Formation of superoxid in the autoxidation of of isolated  $\alpha$  and  $\beta$  chains of human haemoglobin and its involvement in haemichrome precipitation. Eur J Biochem 53:99-104

Burton GW, Ingold KU, Thompson KE (1981) An improved procedure for the isolation of ghost membranes from human red blood cells. *Lipids* 16:946

Burton GW, Joyce A, Ingold KU (1982) First proof that vitamin E is the major lipid-soluble, chain-breaking antioxidant in human blood plasma. *Lancet* 8293:327

Burton GW, Joyce A, Ingold KU (1983) Is Vitamin E the only lipid-soluble, chain-breaking antioxidant in human blood plasma and erythrocyte membranes? *Arch Biochem Biophys* 221:281-290

Burton GW, Webb A, Ingold KU (1985) A mild, rapid, and efficient method of lipid extraction for use in determining vitamin E/lipid ratios. *Lipids* 20:29-39

Burton GW, Cheng SC, Webb A, Ingold KU (1986) Vitamin E in young and old human red blood cells. *Biochem Biophys Acta* 860:84-90

Carrel RW, Winterbourn CC, Rachmilewitz EA (1975) Activated oxygen and hemolysis. *Br J Haematol* 30:259-264

Chiu D, Kuypers F, Lubin B (1989) Lipid peroxidation in human red cells. *Semin Hematol* 26:257-276

Chow CK (1985) Vitamin E and blood. *World Rev Nutr Diet* 45:133-66

Christen S, Woodall AA, Shigenaga MK, Southwell-Keely PT, Duncan MW, Ames BN (1997)  $\gamma$ -tocopherol traps mutagenic electrophiles such as  $\text{NO}_x$  and complements  $\alpha$ -tocopherol: physiological implications. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:3217-3222

Constantinescu A, Han D, Packer L (1993) Vitamin E recycling in human erythrocyte membranes. *J Biol Chem* 268:10906-10913

De Franchesi L, Shalev O, Piga A, Collell M, Olivieri O, Corrocher R, Hebbel RP, Brugnara C (1999) Deferiprone therapy in homozygous human  $\beta$ -thalassemie removes erythrocyte membrane free iron and reduces KCl cotransport activity. *J Lab Clin Med* 133:64-69

De Luca C, Filosa A, Grandinetti M, Maggio F, Lamba M, Passi S (1999) Blood antioxidant status and urinary levels of catecholamine metabolites in  $\beta$ -thalsassemia. *Free Rad Res* 30:453-462

Dimitrov NV, Meyer-Leece C, McMillan J, Gilliland D, Perloff M, Malone W (1996) Plasma  $\alpha$ -tocopherol concentrations after supplementation with water- and fat-soluble vitamin E. *Am J Clin Nutr* 64:329-335

Dix TA, Fontana R, Panthani A, Marnett LJ (1985) Hematin-catalyzed epoxidation of 7,8-dihydroxy-7,8-dihydrobenzo[a]pyrene by polyunsaturated fatty acids hydroperoxids. *J Biol Chem* 260:5358-5365

Dobretsov GE, Borschevskaya TA, Petrov VA (1977) The increase of phospholipid bilayer rigidity after lipid peroxidation. *FEBS Lett* 84:125-128

Dodge JT, Mitchell C, Hanahan DJ (1962) The preparation and chemical characteristics of hemoglobin-free ghosts of human erythrocytes. *Arch Biochem Biophys* 100:119-130

Ekiel IH, Hughes L, Burton GW, Jovall PA, Ingold KU, Smith ICP (1988) Structure and dynamics of  $\alpha$ -tocopherol in model membranes and in solution: Abroad-line and high-resolution NMR study. *Biochem* 27:1432-1440

El-Sohemy A, Baylin A, Ascherio A, Kabagambe E, Spiegelman D, Campos H (2001) Population-based study of  $\alpha$ - and  $\gamma$ -tocopherol in plasma and adipose tissue as biomarkers of intake in Costa Rican adults. *Am J Clin Nutr* 74:356-363

Farrell PM, Bieri JG, Franttoni JF, Woods RE, Di Sant'Agnes PA (1977) The occurrence and effects of human vitamin E deficiency. *J Clin Invest* 60:233-241

Fischer R, Eich G, Engelhardt R, Heinrich HC, Kessler M, Nielsen P (1989) The calibration problems in liver iron susceptometry. In: Williamson SJ, Hoke M, Stroink K, Kotani M (eds.) *Advances in Biomagnetism*. New York Plenum Press: 501-504

Fischer R (1998) Liver Iron Suspectometry. In: *Magnetism in Medicine*. Wiley-VCH, Berlin, Weinheim, New York, p. 286

Fuchs GJ, Tienboom P, Linpisarn S, Nimsakul S, Leelepat P, Tovanabutra S, Tubtong V, de Wier M, Suskind RM (1996) Nutritional factors in thalassemia major. *Arch Dis Child* 74:224-227

Gabbe EE, Heinrich HC, Icgic F (1982) Proposal for the standardization of the serum unsaturated iron binding capacity assay, and results in groups of subjects with normal iron stores and with prelatent, latent, and manifest iron deficiency. *Clin Chem Acta* 119:51-63

Giardini O, Cantani A, Donfrancesco A (1981) Vitamin E therapy in homozygous  $\beta$ -thalassemia. *N Engl J Med* 305:644

Gonzales-Corbella MJ, Lloberas-Blanch N, Castellote-Bargallo AI, Lopez-Sabater MC, Rivero-Urgell (1994) Determination of  $\alpha$ -tocopherol in plasma and erythrocytes by HPLC. *J Chromat* 660:395-400

Horwitt MK, Harvey CC, Dahm CH, Searcy MT (1972) Relationship between tocopherol and serum lipid levels for determination of nutritional adequacy. *Ann NY Acad Sci* 203:223-236

Horwitt MK, Elliott WH, Kanjananggulpan P, Fitch CD (1984) Serum concentration of  $\alpha$ -tocopherol after ingestion of various vitamin E preparations. *Am J Clin Nutr* 40:240-245

Hyman CB, Landing B, Alfin-Slater R, Kozak L, Weitzman J, Ortega JA (1974) D $\alpha$ -tocopherol, iron, and lipofuscin in thalassemia. *Ann NY Acad Sci* 232:211-220

Imlay JA, Chin SM, Linn S (1988) Toxic DNA damage by hydrogen peroxide through Fenton reaction in vivo and in vitro. *Science* 240:640-642

Ingold KU, Webb AC, Witter D, Burton GW, Metcalfe TA, Muller DPR (1987) Vitamin E remains the major lipid-soluble, chainbreaking antioxidant in human plasma even in individuals suffering severe vitamin E deficiency. *Arch Biochem* 259:224-225

International Committee for Standardization in Haematology (1978) Recommendations for measurements of serum iron in human blood. *Br J Haematol* 38:291-294

Kaempf DE, Miki M, Ogihara T, Okamoto R, Konishi M, Mino M (1994) Assessment of vitamin E nutritional status in neonates, infants and children - on



the basis of  $\alpha$ -tocopherol levels in blood components and buccal mucosal cells.  
Int J Vitam Nutr Res 64:185-191

Kagan VE, Serbinova EA, Forte T, Scita G, Packer L (1992) Recycling of vitamin E in human LDL. J Lipid Res 33:385-397

Kahane I, Rachmilewitz EA (1976) Alteration of the red blood cell membrane and the effect of vitamin E on osmotic fragility in thalassemia major. Isr J Med Sci 12:11-15

Kahane I, Shifter A, Rachmalewitz EA (1978) Cross-linking of RBCM proteins induced by oxidative stress in  $\beta$ -thalassemia. FEBS Lett 85:267

Kayden HJ, Chow CK, Bjornson L (1973) Spectrophotometric method for determination of tocopherol in RBC. J Lipid Res 14:533-540

Kayden HJ (1983) In: Porter R, Whelan H (Hrsg.) Biology of vitamin E, CIBA symposium. Pitman, London. S. 70

Kühn LC (1989) The transferrin receptor: A key function in iron metabolism. Schweiz Med Wochenschr 119:1319-1326

Kühn LC (1999) Iron overload: molecular clues to its cause. Trends Biochem Sci 24:164-166

Lehmann J (1981) Comparative sensitivities of tocopherol levels of platelets, red blood cells, and plasma for estimating vitamin E nutritional status in the rat. Am J Clin Nutr 34:2104-2110

Lehmann J, Martin HL (1983) Liquid-Chromatographic determination of  $\alpha$ - and  $\gamma$ -Tocopherol in erythrocytes, with fluorescence detection. *Clin Chem* 29:1840-1842

Lehmann J, Rao DD, Canary JJ, Judd JT (1988) Vitamin E and relationships among tocopherols in human plasma, platelets, lymphocytes, and red blood cells. *Am J Clin Nutr* 47:470-474

Leth T, Sondergaard H (1977) Biological activity of vitamin E compounds and natural material by resorptions-gestations test, and chemical determination of the vitamin E activity in food and feeds. *J Nutr* 107:2236-2243

Levy JE, Montross LK, Cohen DE, Fleming MD, Andrews NC (1999) The C282Y mutation causing hereditary haemochromatosis does not produce a null allele. *Blood* 94:9-11

Mason KE, Harris PL (1947) Bioassay of vitamin E. *Biol Symp* 12:459-483

Miller DM, Buettner GR, Aust SD (1990) Transition metals as catalysts of autoxidation reaction. *Free Rad Biol Med* 8:95-108

Mino M, Kitagawa M, Nakagawa S (1985) Red blood cell tocopherol concentrations in a normal population of Japanese children and premature infants in relation to the assessment of vitamin E status. *Am J Clin Nutr* 41:631-638

National research council (1989) Recommended dietary allowances. 10<sup>th</sup> edition. Washington DC: National Academy of Sciences

Niki E (1993) Function of vitamin E as antioxidant in the membranes. In: Mino M et al (eds.) Vitamin E – It's usefulness in health and curing disease. Japan sciences society press. Tokyo, Basel. p23-30

Ouahchi K, Arita M, Kayden H, Hentati F, Ben Hamida M (1995) Ataxia with isolated vitamin E deficiency is caused by mutations in the  $\alpha$ -tocopherol transfer protein. Nat Genet 9:141-145

Parkkila S, Waheed A, Britton RS, Feder JN, Tsuchihashi Z, Schatzmann RC, Bacon BR, Sly WS (1997) Immunohistochemistry of HLA-H, the protein defective in patients with hereditary haemochromatosis, reveals unique pattern of expression in gastrointestinal tract. Proc Natl Acad Sci USA 94:2534-2539

Paulson DN, Fagaly RL, Toussaint RM, Fischer R (1991) Biomagnetic susceptometer with SQUID instrumentation. IEEE Trans Magn 27:3249-3252.

Pearson HA, O'Brien TR (1975) The management of thalassemia major. Semin Haematol 12:255-265

Perly B, Smith ICP, Hughes L, Burton GW, Ingold KU (1985) Estimation of the location of natural  $\alpha$ -tocopherol in lipid bilayers by  $^{13}\text{C}$ -NMR spectroscopy. Biochim Biophys Acta 819:131-135

Pietrangelo A, Gualdi R, Casalgrandi G, Montosi G, Ventura E (1995) Molecular and cellular aspects of iron-induced hepatic cirrhosis in rodents. J Clin Invest 95:1824-1831

Polliack A, Rachmilewitz EA (1973) Ultrastructurell studies in thalassemia major. Br J Haematol 24:319-326

Porter JB, Abeyasinghe RD, Marshall L, Hider RC, Singh S (1996) Kinetics of removal and reappearance of non transferrin bound plasma iron with desferrioxamine therapy. *Blood* 88:705-713

Poukka RKH, Bieri JG (1970) Blood alpha tocopherol: erythrocyte and plasma relationships in vitro and in vivo. *Lipids* 5:757-761

Rachmilewitz EA, Lubin BH, Shohet SB (1976) Lipid membrane peroxidation in  $\beta$ -thalassemia major. *Blood* 47:495-507

Rachmilewitz EA, Shifter A, Kahane I (1979) Vitamin E deficiency in  $\beta$ -thalassemia major: changes in haematological and biochemical parameters after a therapeutic trial with  $\alpha$ -tocopherol. *Am J Clin Nutr* 32:1850-1858

Rachmilewitz EA (1985) Erythrocyte membrane alterations in  $\beta$ -thalassemia. *Clin Haematol* 14:163-182

Reller K (1998) Eisenüberladung und Antioxidantienstatus bei Patienten mit  $\beta$ -Thalassämie. Medizinische Dissertation. Universität Hamburg

Repka T, Shalev O, Reddy R, Yuan J, Abrahamov A, Rachmilewitz EA (1993) Non random association of free iron with membranes of sickle,  $\alpha$ - and  $\beta$ -thalassemic erythrocytes. *Blood*. 82:3204-10

Rice-Evans C, Hartley A (1989) Free radicals erythrocyte disorders and iron decompartmentalisation. In: Hayaishi O et al (hrsg) *Medical, biochemical and chemical aspects of free radicals*. Elsevier, Amsterdam. p1185-1194

Rice-Evans C (1990) Iron-mediated oxidative stress and erythrocytes. In: Harris JR (Hrsg) *Blood cell biochemistry*. Bd 1, New York, London, p429-453

Risdon RA, Barry M, Flynn D (1975) Transfusional overload: hepatic fibrosis in thalassemia. *J Pathol* 116:83-95

Rodriguez MC, Saiz MP, Muntane J, Mitjavila MT (1996) Fatty acid composition of erythrocyte membranes affects iron absorption in rats. *J Nutr* 126:3109-3117

Roxborough HE, Burton GW, Kelly FJ (2000) Inter- and intra-individual variation in plasma and red blood cell vitamin E after supplementation. *Free Rad Res* 33:437-445

Sachs, Lothar (1985) *Angewandte Statistik*. Berlin, Heidelberg New York. 5. Aufl.

Salin ML, McCord JM (1975) Free radicals and inflammation. Protection of phagocytosing leucocytes by superoxide dismutase. *J Clin Invest* 56:1319-1323

Sato Y, Hagiwara K, Arai H, Inoue K (1991) Purification and characterization of the  $\alpha$ -tocopherol-binding-protein in rat liver cytosol. *FEBS Lett* 288:41-45

Scott MD, Rouyer-Fessard P, Lubin BH, Beuzard Y (1990) Entrapment of purified alpha-hemoglobin chains in normal erythrocytes. A model for  $\beta$ -thalassemia. *J Biol Biochem* 265:17953-9

Scott MD, van den Berg JJ, Repka T, Rouyer-Fessard P, Hebbel RP, Beuzard Y (1993) Effect of excess  $\alpha$ -hemoglobin chains on cellular and membrane oxidation in model  $\beta$ -thalassemic erythrocytes. *J Clin Invest* 91:1706-12

Scott MD, Eaton J (1995) Thalassemic erythrocytes: cellular suicide arising from iron and glutathion-dependent oxidation reactions. *Br J Haematol* 91:811-819

Shaklai N, Shivro Y, Rabizadeh E, Kirscher-Zilbe I (1985) Accumulation and drainage of haemin in the red cell membran. *Biochim Biophys Acta.* 821:355-356

Shalev O, Repka T, Goldfarb A, Grindberg L, Abrahamov A, Olivieri NF (1995) Deferiprone (L1) chelates pathological iron deposits from membranes of intact thalassemic and sickle red blood cells both in vitro and in vivo. *Blood* 86:2008-13

Siegenthaler W (1998) *Klinische Pathophysiologie*, Thieme, Stuttgart, New York, 8. Aufl., S. 450

Silber R, Winter R, Kayden HJ (1969) Tocopherol transport in the rat erythrocyte. *J Clin Invest* 48:2089-2095

Stadtman ER (1992) Protein oxidation and aging. *Science* 257:1220-1224

Stocks J, Dormandy TL (1971) The autoxidation of human red cell lipids induced by hydrogen peroxide. *Br J Haematol* 20:95-110

Stocks J, Offerman EL, Modell CB, Dormandy TL (1972) The susceptibility to autoxidation of human red cell lipids in health and disease. *Br J Haematol* 23:713-724

Tesoriere L, D'Arpa D, Butera D, Allegra M, Renda D, Maggio A, Bongiorno A, Livrea MA (2001) Oral supplements of vitamin E improve measures of oxidative stress in plasma and reduce oxidative damage to LDL and erythrocytes in  $\beta$ -thalassemia intermedia patients. *Free Rad Res* 34:529-540

Traber MG and Kayden HJ (1984) Vitamin E is delivered to cells via the high affinity receptor for LDL. *Am J Clin Nutr* 40:747-751

Traber MG, Kayden HJ (1989) Preferential incorporation of  $\alpha$ -tocopherol vs  $\gamma$ -tocopherol in human lipoproteins. *Am J Clin Nutr* 49:517-526

Traber MG, Burton GW, Ingold KU, Kayden HJ (1990) RRR- and SRR- $\alpha$ -tocopherols are secreted without discrimination in human chylomicrons, but RRR- $\alpha$ -tocopherol is preferentially secreted in very low density lipoproteins.

*J Lipid Res* 31:675-685

Traber MG, Sokol RJ, Burton GW, Ingold KU, Papas AM, Huffaker JE and Kayden HJ (1990) Impaired ability of patients with familial isolated vitamin E deficiency to incorporate alpha-tocopherol into lipoproteins secreted by the liver. *J Clin Invest* 85:397-407

Traber MG, Rader D, Acuff RV, Ramakrishnar R, Brewer HB, Kayden HJ (1998) Vitamin E dose response studies in humans with use of deuterated RRR- $\alpha$ -tocopherol. *Am J Clin Nutr* 68:847-853

Vatanavicharn S, Yenchisomanus P, Siddikhol C (1985) Vitamin E in beta- and alpha-thalassemia diseases. *Acta Haematol* 73:183

Vatassery GT, Smith WE, Quach HAT (1993) A liquid chromatographic method for the simultaneous determination of  $\alpha$ -tocopherol and tocopherolquinone. *Anal Biochem* 214:426-430

Waheed A, Parkkila S, Saarnio J, Fleming RE, Zhou XY, Tomatsu S, Britton RS, Bacon BR, Sly WS (1999) Association of HFE protein with transferrin receptor in crypt enterocytes of human duodenum. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:1579-1584

Weiss SJ (1980) The role of superoxide in the destruction of erythrocyte targets by human neutrophils. *J Biol Chem* 255:9912-9917

Weiss SJ, Young J, LoBuglio AF (1981) Role of hydrogen peroxide in neutrophil-mediated destruction of cultured endothelial cells. *J Clin Invest* 68:714-721

Wen Y, Killalea S, McGettigan S, Feely J (1996) Lipid peroxidation and antioxidant vitamins E and C in hypertensive patients. *Ir J Med Sci* 165:210-212

Worwood MJ (1983) Iron and haemochromatosis. *J Inherit Metab Dis* 6:63-69

Yaoi K, Nakagawa S, Mino M (1984) Tocopherol concentration in platelets in normal children and adults. *J Nutr Sci Vitaminol* 30:199-203

Yoshida H, Yusin M, Ren I, et al. (1992) Identification, purification, and immunochemical characterization of tocopherol-binding protein in rat liver cytosol. *J Lipid Res* 33:343-350

Zannos-Mariolea L, Tzortzatos F, Dendaki-Svolaki K, Katerellos C, Kavallari M, Mastoniotis N (1974) Serum vitamin E levels with  $\beta$ -thalassemia major: preliminary report. *Br J Haematol* 26:193

Zannos-Mariolea L, Papagregoriou-Theodoridou M, Constantzas N, Matsaniotis N (1978) Relationship between tocopherols and serum lipid levels in children with  $\beta$ -thalassemia major. *Am J Clin Nutr* 31:259-263

Zoller H, Pietrangelo A, Vogel W, Weiss G (1999) Duodenal metal transporter (DMT-1, NRAMP-2) expression in patients with hereditary hemochromatosis. *Lancet* 96:1579-1584



## **7. Danksagung**

Hiemit möchte ich mich bei den Mitarbeitern der Abteilung für Molekulare Zellbiologie des Institutes für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie des UKE für ihre Unterstützung bedanken. Besonders herzlichen Dank sage ich PD Dr. P. Nielsen, Dr. B. Dresow, Dr. R. Fischer, I. Zimmermann, R. Kongi und S. Hoppe.

Außerdem danke ich meinem Lebensgefährten F. Szabados für seine Liebe, Geduld und Unterstützung und meiner Mutter, die mir das Studium und diese Arbeit ermöglicht hat.

## 8. Lebenslauf

**Name** Marianne Frost  
**Geburtsdatum, -ort** 28.12.1974 in Rostock  
**Familienstand** ledig  
**Adresse** Schaumannskamp 1  
21465 Reinbek

### Ausbildung

1993	Abitur	Schwerin
1996	Physikum	Hamburg
1998	1. Staatsexamen	Hamburg
1999	2. Staatsexamen	Hamburg
2000	3. Staatsexamen	Hamburg

Seit 15.12.2000 ÄiP in der chirurgischen Abteilung des Krankenhaus  
Reinbek, St. Adolf-Stift  
in Reinbek, Schleswig-Holstein

Reinbek, den 18.02.2002

## **Erklärung**

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfaßt, andere als die von mir genannten Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite kenntlich gemacht habe, und dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

## Einzelwerte

Tabelle 1: Kontrolle

Nr.	Alter	Geschlecht	Hb [mg/dl]	Membran ± SD		Plasma a-Tocopherol [µmol/l]	Membran g-Tocopherol [µmol/l]	Plasma [µmol/l]	Plasma Retinol [µmol/l]	Serum-Fe [mg/dl] 64-170	TEBK [mg/dl] 250-395	Transferrin- sättigung [%] 20-52	Ferritin [µg/l] 35-235
				[µmol/l]	[µmol/l]								
1	27	w	14.3	1.97	0.18	23.2		1.55	2.85	77	383	20	43
2	23	w	12.8	4.66	0.78	45.5	0.50	3.31	6.02	89	268	33	39
3	48	m	15.4	2.37	0.56	58.0	0.67	9.28	9.54	144	368	39	150
4	46	m	15.5	1.83	0.14	63.6	0.48	11.60	10.67	93	346	27	70
5	52	m	14.3	1.62	0.69	61.8	0.25	7.73	5.21	101	300	34	83
6	23	w	13	3.87	0.67	58.3	0.39	5.03	9.35	102	401	25.5	36
7	24	w	12.8	1.32	0.44	16.5	0.21	2.47	1.88	81	330	25	40
8	47	m	14.4	3.46	0.13	82.9	0.41	2.85	8.75	83	316	26.3	62
9	26	w	12.9	3.37	1.60	67.3				78	234	33.5	35

**Tabelle 2: Hämochromatose**

Nr.	Geburts- datum	Geschlech t	Hb [mg/dl]	Membran ± SD a-Tocopherol			Membran Plasma g-Tocopherol Retinol			Serum-Fe [mg/dl] 64-170	TEBK [mg/dl] 250-395	Transferrin- sättigung [%] 20-52	Ferritin [µg/l] 35-235	Lebereisen- beladung [mg Fe/g Leber]	NTBI [µmol/l]
				[µmol/l]	[µmol/l]	[µmol/l]	[µmol/l]	[µmol/l]	[µmol/l]						
WB	25.12.44	m	14.8	2.51	2.16	63.87	0.26	6.07	9.33	159	246	65	273	2.94	
RH	19.7.41	m	13.1	1.09	0.41	47.84	0.27	12.51	5.78	43	271	16	310	0.53	
HF	7.8.35	m	13.8	4.02	4.26	65.45	0.67	9.28	7.59	66	267	25	6	0.2	
EA	21.5.39	w	13	2.41	0.50	66.44	0.17	3.62	7.76	213	234	91	795	2.03	4.55
MD	25.03.36	w	14.1	2.78	0.40	25.57	0.25	3.98	7.33	116	268	43	16	0.26	
GW	22.8.11	w	14.9	2.79	2.25	40.67			4.35	234	302	78	524	1.05	2.4
SC	27.12.61	w	12.5	1.59	1.25	57.34	0.16	5.98	6.59	131	216	61	84	0.42	1.51
MS	2.3.48	w	13.6	2.07	0.29	47.84	0.17	3.83	4.97	76	331	23	8	0.82	
RW	27.1.69	m	15.3	3.68	1.48	53.34	0.34	4.46	12.45	146	279	52	27	1.94	
BG	5.12.51	m	14.6	1.59	1.22	63.21	0.29	6.57	8.12	33	288	12	6	0.59	
CK	2.2.53	w	15.4 14.7 15.9 14.7	0.73 1.02 1.95 1.35 0.64	0.14	16.09 21.19 24.41 16.36 20.65				232 198 266	274 292	85 68	1072 853 806	0.9	

**Tabelle 3: b-Thalassämie major**

Nr.	Geburts- datum	Geschlecht	Hb [mg/dl]	Membran [µmol/l]	± SD a-Tocopherol [µmol/l]	Plasma [µmol/l]	Membran [µmol/l]	Plasma [µmol/l]	Plasma Retinol [µmol/l]	Serum-Fe [mg/dl] 64-170	TEBK [mg/dl] 250-395	Transferrin- sättigung [%] 20-52	Ferritin [µg/l] 35-235	Lebereisenk. [µg Fe/g Leber]	Milzeisenk. [µg Fe/g Milz]	NTBI [µmol/l]
536	15.9.78	m	11.9	0.25	0.06	1.9	0.12	0.89	0.04	208	250	83	4745	4162	1132	4.99
537	7.10.69	w	12.3	0.55	0.12	6.3	0.12	0.89	0.05	200	230	87	4263	4039		5.01
538	8.11.83	w	12.9	0.83	0.17		0.10			199	216	92	2054	1692		4.24
539	7.4.79	w	13.4	0.89	0.01	7.2	0.20	1.49	0.08	240	257	93	1980	3212		3.51
540	16.6.79	m	12.4							248	332	75	2320	1008		0.75
541	1.4.87	w	12	0.92	0.61	7.8	0.19	1.75	0.04	211	249	85	3103	2645		4.04
542	4.4.78	w	11.9	0.36	0.15	4.6	0.08	1.06	0.04	226	261	87	4558	9973	14070	4.83
543	20.7.80	m	11.7											3759	1152	
544	28.8.75	m	10.8	0.23	0.05	2.8	0.04	0.82	0.00	228	256	89	2347	1426		3.37
545	25.7.87	m	10.3	0.71	0.59	4.2	0.32	1.75	0.21	240	276	87	1563	967		5.52
546	4.7.75	w	12.7	1.73	0.13	6.6	0.46	2.05	0.24	199	239	83	4015	3718		4.16
547	23.8.79	w	12.4	0.84	0.66	7.4	0.30	2.74	0.20	205	245	84	7282	5674		4.2
548	6.12.81	m	12.3	1.10	1.18	5.9	0.19	1.21	0.16	160	184	87	2871	910		3.2
549	3.2.87	m	11	0.44		5.1	0.06	1.38	0.03	277	315	88	4265	1582		1.22
550	27.6.72	w	11.1	0.80	0.33	10.4	0.32	3.95	0.09	271	278	98	3707	2590	2583	
551	27.8.69	m	12.2	0.69	0.39	5.1	0.16	1.25	0.09	273	296	92	9460	4373	3566	2.84