

(12)

PATENTCHRIFT

(21) Anmeldenummer: 1875/94

(51) Int.Cl.⁶ : G01N 33/92

(22) Anmeldetag: 4.10.1994

(42) Beginn der Patentdauer: 15. 2.1999

(45) Ausgabetag: 25.10.1999

(56) Entgegenhaltungen:

C.A.95(7)1981: 56778P,
C.A.90(17)1979:134264F

C.A.101(21)1984:186519H.

(73) Patentinhaber:

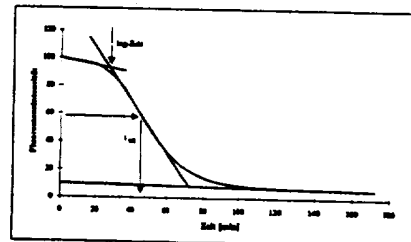
HERMETTER ALBIN DR.
A-8010 GRAZ, STEIERMARK (AT).
HOER GERALD DR.
A-8141 UNTERPREMSTÄTTEN, STEIERMARK (AT).
LICHTENBERG DOV DR.
TEL AVIV (IL).

(72) Erfinder:

HERMETTER ALBIN DR.
GRAZ, STEIERMARK (AT).
HOER GERALD DR.
UNTERPREMSTÄTTEN, STEIERMARK (AT).
LICHTENBERG DOV DR.
TEL AVIV (IL).

(54) METHODE ZUR BESTIMMUNG DER OXIDIERBARKEIT VON LIPIDEN

(57) Zur Bestimmung der Oxidierbarkeit von Lipiden in komplexen biologischen Systemen wie Lipoproteinen, Serum, Zellen und Lebensmitteln wurde eine neue Methode auf fluorimetrischer Basis entwickelt. Bei dieser Methode werden Diphenylhexatrien (DPH) oder fluoreszierende Lipidanaloga, die Diphenylhexatrien kovalent gebunden enthalten (Marker), in die jeweiligen Lipidsysteme durch Inkubation mit diesen verpackt. Die Oxidierbarkeit wird durch die Abnahme der Fluoreszenzintensität des Fluorophors Diphenylhexatrien bestimmt. Zuerst erfolgt nur eine minimale Abnahme an Intensität; dies ist die lag-Phase, in der die vorhandenen Antioxidantien verbraucht werden. An diese Phase schließt eine Phase von sehr schneller Abnahme an Fluoreszenzintensität an; dies ist die Propagierungsphase, in der die Oxidation der DPH-Lipide ungehindert abläuft. Mit der vorgestellten Methode kann erstmals die Oxidierbarkeit von verschiedenen Lipidspezies kontinuierlich verfolgt werden, da kovalente DPH-Konjugate von allen Lipiden synthetisiert werden können. Die Methode ist auch auf medizinische und lebensmittelchemische Routineanalysen anzuwenden, da die Verwendung eines Fluoreszenzplattenlesegeräts die Untersuchung von sehr vielen Proben gleichzeitig erlaubt.



Es wird eine Methode zur Bestimmung von Lipidoxidation in Lipoproteinen sowie in komplexen biologischen Systemen (Serum, Zellen) auf fluorimetrischer Basis beschrieben. Die Methode beruht auf der Messung der zeitabhängigen Fluoreszenzabnahme, die beobachtet wird, wenn Diphenylhexatrien (DPH) oder auch Lipidderivate, die DPH kovalent gebunden enthalten, in großer Verdünnung in die jeweiligen Systeme eingebaut werden und durch Oxidation mit unterschiedlichen Oxidationsmitteln wie Übergangsmetallen oder anderen direkten Radikalbildnern (Azoverbindungen oder Singulett Sauerstoff) abgebaut werden. Aus der Messung können folgende Parameter ermittelt werden: die Zeit bis zum Einsetzen der oxidativen Degradation (lag-Zeit); die Halbwertszeit der Propagierungsphase ($t_{1/2}$); die zeitliche Änderung der Geschwindigkeit der Oxidation (1. Ableitung).

Dadurch wird die Möglichkeit geschaffen; die Oxidation unterschiedlicher Lipide in biologischen Systemen zu messen. Die Methode ist in sehr guter Übereinstimmung mit bisher verwendeten Methoden (Dien-Methode) und kontinuierlich. Sie ist auch auf Routineanalysen im medizinisch-chemischen Labor insbesondere bei Verwendung eines Fluoreszenzplattenlesegeräts anzuwenden.

Auch die Isolierung von Lipoproteinen aus dem Serum kann entfallen, da mit diesem Test verdünnte Serumproben und auch Vollseren untersucht werden können. Dies ist sehr nützlich, wenn man klinische Studien betreibt (sehr viel weniger Arbeitsaufwand). Die Verwendung von Serum bietet folgende Vorteile: Keine zusätzliche Peroxidbildung bei der Präparation isolierter Lipoproteine; die wasserlöslichen Antioxidantien des jeweiligen Serums werden auch noch in die Messung einbezogen.

Die Methode eignet sich auch zum Nachweis der Wirkung von Antioxidantien; denn die Zugabe von solchen Radikalkettenbrechern verlängert die lag-Zeit meßbar. Das Verfahren ermöglicht somit die klinische Untersuchung des Serums von Patienten; die Antioxidantien eingenommen haben und ermöglicht Aussagen über die Wirkung dieser Antioxidantien bezüglich der Oxidierbarkeit der im Serum enthaltenen Lipide. Die Oxidierbarkeit von Serumproben steht im Zusammenhang mit der Entstehung von koronaren Herzerkrankungen (KHK) und kann somit als wichtiger Parameter bei prospektiven Studien verwendet werden. DPH und seine Derivate können auch in Zellmembranen (z.B.: Erythrozyten) eingebaut werden und die Oxidation dieser Zellmembranen gemessen werden.

Die Bestimmung der Oxidierbarkeit von Lipiden in fetthaltigen Lebensmitteln ist ebenso möglich.

Stand der Technik

In den letzten Jahren hat das Verständnis der Bedeutung der Lipidperoxidation bei verschiedenen Krankheitsbildern sehr stark zugenommen. So ist die Oxidation von Lipiden in Lipoproteinen ein wichtiger Schritt bei der Entstehung von Atherosklerose (N. Engl. J. Med. (1989) 320: 915-924).

Ebenso werden bei einigen Krebsformen Lipidperoxidationsprodukte gefunden, wie ich bei anderen Krankheiten wie Sichelzellenanämie (Biochem. J. (1986) 237: 265-269) und Morbus Alzheimer. Die Messung der Oxidierbarkeit von Lipiden in den verschiedenen Systemen kann somit als Parameter für die Prädisposition zu einer solchen Krankheit herangezogen werden. Zur Messung der Oxidation von Lipiden gibt es zahlreiche Methoden. Die am häufigsten verwendete ist die Thiobarbitursäure-Methode (TBAR) (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1978) 75: 3173), mit welcher aldehydische Reaktionsprodukte der Lipidoxidation gemessen werden. Weitere Methoden sind die Messung von konjugierten Dienen (Free Rad. Res. Comms. (1989) 6: 67-75), die Messung des Anstiegs von Peroxiden (Absorption oder HPLC) (J. Lipid Res. (1989) 30: 627) oder der Lipoprotein-Fluoreszenz bei 430 nm (J. Biol. Chem. (1987) 262: 3603-3608) oder des Verbrauchs von Sauerstoff (Ann. N.Y. Acad. Sci. (1989) 570: 296). Alle diese Methoden ergeben ungefähr gleiche Resultate. Einige von ihnen sind allerdings sehr aufwendig, diskontinuierlich und mit ihren Aussagen über den Oxidationsverlauf nicht sehr spezifisch. Es gibt auch einen Fluoreszenzansatz, bei dem die Lipidoxidation über die Abnahme der Parinar säurefluoreszenz (Biochimica et Biophysica Acta (1987) 921: 266-274) gemessen wird. Doch stimmen die Ergebnisse nicht sehr gut mit den anderen Methoden überein, denn die lag Zeit, die als Maß für die Oxidierbarkeit herangezogen wird, ist bei dieser Methode viel kürzer als bei den anderen Methoden. Dies ist auf die leichte Oxidierbarkeit von Parinar säure zurückzuführen, wodurch Parinar säure wie ein Antioxidans in den markierten Systemen wirkt. Weiters gibt es in der Literatur Hinweise, daß auch andere mehrfach ungesättigte Fluorophore unter oxidativen Bedingungen instabil sind. Und zwar wurde der Fluoreszenzverlust von Diphenylhexatrien beim Stehenlassen in Gegenwart mehrfach ungesättigter Phospholipide, jedoch in Abwesenheit gezielt zugesetzter Prooxidantien wie Übergangsmetalle, synthetische Radikalbildner oder peroxidierende Enzyme, beobachtet (Biochimica et Biophysica Acta (1981) 645: 17-23). Die zur Zeit beste Methode ist die Messung von konjugierten Dienen, da sie sehr einfach durchzuführen, kontinuierlich und in sehr guter Übereinstimmung mit der "Referenzmethode" (TBAR) ist. Man kann auch mit der entsprechenden Ausrüstung (Photometer mit Mehrfachküvettenkammer) mehrere Proben gleichzeitig messen. Die Nachteile dieser Methode liegen in ihrer geringen

Spezifität und der Nichtanwendbarkeit in komplexen biologischen Systemen. Man kann aus dieser Methode nur ersehen, daß Lipide oxidiert werden, nicht jedoch welche. Genauso ist der Untergrund bei komplexen biologischen Systemen für diese Methode zu hoch (allerdings wurde die Bestimmung der Lipoproteinoxidation in bis zu 3%igem Serum beschrieben (Free Rad. Res. Comms. (1993) 19: 267-278)).

- 5 Die vorliegende Erfindung beschreibt eine Methode (Abnahme der Fluoreszenz von Diphenylhexatrien) die mit den Ergebnissen der Nichtfluoreszenzmethoden übereinstimmt, kontinuierliche Meßsignale liefert, sehr empfindlich ist, in komplexen biologischen Systemen (Serum, Zellen) angewendet werden kann, eine Unterscheidung zwischen verschiedenen Lipiden (die eine DPH-Seitenkette tragen) hinsichtlich ihrer Oxidierbarkeit und des Zeitpunktes ihrer Oxidation erlaubt und mittels eines Fluoreszenzplattenlesegeräts auf
10 sehr große Probenmengen (geeignet für die Routineanalyse) anzuwenden ist.

Ausführliche Beschreibung:

- Die oxidative Degradation der Fluoreszenz von Diphenylhexatrien (DPH) oder Lipidderivaten, die DPH
15 kovalent gebunden enthalten; wird als Indikator für Oxidierbarkeit von Lipiden in verschiedenen Lipidaggregaten herangezogen. Bei dieser Methode wird der Fluorophor in Lipidaggregate in einer sehr großen Verdünnung eingebaut (Label/Lipid-Verhältnis entspricht 1:100 bis 1:1000), damit die biophysikalische Struktur des jeweiligen Systems nicht gestört wird.

- Das DPH kann dabei als eigenständiges Molekül oder als Konjugat verwendet werden. Das DPH kann
20 kovalent an Phospholipide (Phosphatidylcholin (DPHPC), Phosphatidylethanolamin (DPHPE), Sphingomyelin (DPHSM) und Plasmalogene (DPHPlg)), Triglyceride und Cholesterinester über eine Alkylcarboxygruppe in verschiedenen Positionen (*sn*-1, *sn*-2 oder *sn*-3) des Glycerins, esterartig oder über eine Alkoxygruppe etherartig gebunden sein. Es können auch einfachere Moleküle wie DPHCarbonsäuren mit unterschiedlicher Länge, 1-(4-Trimethylaminophenyl)-6-phenyl-1,3,5-hexatrien-p-toluolsulfonat (TMA-DPH) und N-p-(6-phenyl-
25 (1,3,5-hexatrienyl(phenyl(propyl))))-trimethylamino-p-toluolsulfonat (TMAP-DPH) verwendet werden. Auch die Lipidsysteme, in die DPH oder seine Verbindungen zur Messung der Oxidationsempfindlichkeit eingebaut werden, können variieren. Es kann sich dabei um isolierte Lipoproteine, Vollserum, verdünntes Serum, Plasma, Zellen; Zellorganellen, isolierte Membrane und Lebensmittel handeln.

- Der Einbau des DPH und seiner Verbindungen erfolgt über Inkubation der Lipidsysteme mit dem
30 jeweiligen Fluorophor, wobei der Fluorophor vorzugsweise in ethanolischer Lösung unter Rühren zugegeben wird und das Verhältnis Ethanol zu Wasser 1/100 nie übersteigt. Die Internalisierung der jeweiligen DPH-Verbindungen erfolgt unterschiedlich schnell. Während DPH, TMA-DPH, DPH-Carbonsäuren und TMAP-DPH sehr schnell internalisieren, brauchen die Phospholipide zur vollständigen Verteilung in der Lipidphase mindestens 6 Stunden. Für die Inkorporation von Triglyceriden und den Cholesterinestern in Lipoproteine
35 braucht man Transferproteine, die im Serum vorhanden sind. Somit führt eine Inkubation dieser Verbindungen mit Serum zum effizientem Einbau in Lipoproteine (J. Lipid Res. (1989) 30: 1663-1671). Bei der Markierung isolierter Lipoproteine mit den markierten Triglyceriden bzw. Cholesterinestern kann Triglycerid- bzw. Cholesterinestertransferprotein zugesetzt werden.

- Die beschriebene Methode eignet sich zur Messung von Einflüssen verschiedener Art auf die Oxidation
40 von Lipiden. Es können unterschiedliche Einflüsse von Oxidationsmitteln, Antioxidantien und physikochemischer Parameter wie Temperatur, Ionenstärke oder pH-Wert studiert werden.

Außerdem kann mit dieser Methode die Oxidationsempfindlichkeit eines einzelnen markierten Lipids (Phospholipid, Cholesterinester, Triglycerid, Fettsäuren) in einem Lipidverband untersucht werden.

- Das bedeutet, man kann genau bestimmen, welches DPH-Derivat zu welchem Zeitpunkt oxidiert wird.
45 Durch die Verwendung eines Fluoreszenzplattenlesegeräts, wie von einigen Firmen angeboten (Millipore, SLT und LabSystems), kann die Methode auch zu Routineuntersuchungen in klinischen oder lebensmittelchemischen Labors herangezogen werden. Wir beschreiben ein neues Verfahren; mit dem man die Oxidierbarkeit von verschiedenen DPH-Lipidderivaten in verschiedenen Lipidaggregaten in Gegenwart verschiedener Antioxidantien wie Tocopherole (α , β oder γ), Vitamin C, Albumin, Lipoprotein hoher Dichte
50 (HDL), Ubiquinol, Harnsäuren, Cystein, Butylhydroxyanisol, Butylhydroxytoluol, Trolox, Propylgallat, N,N'-Diphenylendiamin, Glutathion, Hydroxy-1,4-dimethylcarbazol, Promethazin, Chlorpromazin, Ethoxyquin sowie verschiedenen Enzymen wie Katalase, Peroxidasen und Superoxid Dismutase, mit verschiedenen Oxidationsmitteln oder Prooxidantien wie 2,2'-Azobis(2-amidinopropan)hydrochlorid, zweiwertige Eisenionen, dreiwertige Eisenionen und Ascorbinsäure, zweiwertige Kupferionen und Wasserstoffperoxid, Myoglobin und
55 Wasserstoffperoxid, Singulett Sauerstoff, Ozon, Halogenradikale, Lipidperoxide, organische Hydroperoxide wie tert-Butylhydroperoxid oder Cumenhydroperoxid, Cytochrome, Methämoglobin, Xanthin/Xanthinoxidase und die Enzyme Cyclooxygenase und Lipoxygenase messen kann.

Lipoproteine werden mit DPH oder seinen Derivaten und gegebenenfalls mit einem der vorhin angegebenen Antioxidantien inkubiert. Nach Inkorporation der fettlöslichen Verbindungen und Start der Oxidation mit einem der vorhin angegebenen Oxidationsmittel oder Prooxidantien erfolgt die Messung des Oxidationsverlaufes über die zeitabhängige kontinuierliche Veränderung des DPH-Fluoreszenzsignals bei 430 nm (Bild 1). Im besonderen wurden die Oxidation von Low density lipoprotein (LDL), Lipoprotein (a) (Lp(a)) und High density lipoprotein (HDL) sowie die Oxidation von verdünntem Serum und Vollserum mittels DPHPC gemessen. In LDL wurden die Verbindungen DPH, DPHPC, DPHPE, DPHPIg, TMA-DPH und DPH-Propionsäure als oxidationsempfindliche Lipide eingesetzt. Weiters wurden konzentrationsabhängige Einflüsse von Antioxidantien, bevorzugt Vitamin E und Vitamin C, auf die Oxidationsempfindlichkeit von LDL gemessen. Die konzentrationsabhängigen Unterschiede, bevorzugt von 2,2'-Azobis(2-amidinopropanhydrochlorid) (AAPH) und Kupfersulfat als Oxidationsmittel in Bezug auf die Schnelligkeit der Oxidation von LDL wurden ebenfalls gemessen.

Die vorliegende Erfindung kann in folgenden Bereichen der Lipidanalytik eingesetzt werden:

1.) Medizinische Diagnostik: Die Bestimmung der Lipidoxidation in menschlichem Serum kann Aufschluß über eine pathologische Veränderung (Atherosklerose) oder die Neigung zu einer solchen Veränderung über eine gute oder schlechte Aufnahme von diätisch verabreichten Vitaminen und über die allgemeine Abfälligkeit der Blutlipide gegenüber Oxidation geben. Durch prospektive Studien kann mit dieser Methode auch eine Prognose für die Anfälligkeit der Patienten gegenüber Herzinfarkt bestimmt werden. Bei bereits manifestierten Herzinfarkten kann ein gezieltes Monitoring der Oxidierbarkeit der Blutlipide Aufschlüsse über die Wirkung von verabreichten Medikamenten und über den Allgemeinzustand des Patienten geben. Die vorgestellte Methode bietet dabei die Möglichkeit einer sehr einfachen und schnellen Messung ohne lange Präparation der Einzelkomponenten (Lipoproteine) aus dem Serum und vermindert daher das Auftreten von Artefakten.

Auch bei degenerativen Erscheinungen im cerebralen Bereich (Morbus Alzheimer) kann mit dieser Methode eine Untersuchung der Oxidationsempfindlichkeit der Hirnlipide nach erfolgter Extraktion erfolgen. Ebenso ist die Oxidationsempfindlichkeit bei Krankheiten, die Blutzellen betreffen (Sichelzellenanämie) verändert, was mit dieser Methode ebenfalls untersucht werden kann.

Sie kann auch zum Screening von möglichen Antioxidantien sowohl an isolierten Systemen als auch nach Verabreichung an Versuchstiere und/oder Patienten dienen.

2.) Untersuchungen über die Haltbarkeit von fetthaltigen Lebensmitteln.

Die folgenden Beispiele erläutern die Erfindung weiter:

Beispiel 1

Oxidation von DPHPC in isoliertem LDL.

Eine Präparation von isoliertem LDL, die 1 mg/ml EDTA enthält, wird mit einer phosphatgepufferten Salzlösung (PBS: 8 g NaCl, 200 mg KCl, 200 mg KH_2PO_4 , 1,43 g Na_2HPO_4 in 1 Liter H_2O), pH 7,4, auf 2 mg Totalcholesterin/ml verdünnt. Dies entspricht 1840 nmol Phospholipid. Zu dieser LDL-Lösung werden 18,4 nmol DPHPC gelöst in 10 μl Ethanol unter Rühren gegeben und die Inkubationsmischung 12 Stunden bei 37 °C unter Argon inkubiert. Das EDTA wird über Ausschlußchromatographie mit "BioRAD Econopac 10 DG Säulen" entfernt. Die Säulen werden vorher mit PBS-Puffer äquilibriert, der mit Chelex 100 von BioRAD behandelt wurde. Der Totalcholesteringehalt wird bestimmt und das chromatographierte LDL auf Eis gestellt. Es werden 250 μg LDL (dies entspricht 79,11 μg Totalcholesterin) pro ml PBS in einem Volumen von 3 ml verdünnt auf 37 °C gebracht und die Oxidation durch Zugabe von 50 μl 0,1 mM Cu^{2+} -Lösung gestartet. Die Reaktion wird kontinuierlich auf einem Shimadzu RF-540 Spektrofluorimeter (Anregung: 360 nm; Emission: 430 nm, Spaltbreite: Anregung und Emission jeweils 5 nm) verfolgt, wobei für 3 Stunden alle 4 Minuten ein Meßpunkt gemessen wird. Es ergibt sich eine charakteristische Abnahme der Fluoreszenzintensität mit der Zeit (Bild 1) die in 3 Abschnitte eingeteilt werden kann. Zuerst ergibt sich eine lag-Phase in der die Antioxidantien (Ubiquinol und Vitamin E) des Lipoproteins verbraucht werden, dann eine Propagierungsphase und danach eine Plateauphase in der beinahe das ganze DPHPC verbraucht ist. Die Länge der lag-Phase gibt Aufschluß über die Oxidationsempfindlichkeit des LDL. Sie wird durch den Schnittpunkt der Tangente, die an die Steigung der Propagierungsphase gelegt wird, mit der Parallelen der Maximalintensität bestimmt. Sie beträgt für dieses LDL bei 37 °C 23 Minuten.

Beispiel 2

Oxidation von DPHPC in isoliertem Lipoprotein (a).

- 5 Versuchsdurchführung wie unter Beispiel 1 beschrieben, wobei statt LDL Lipoprotein (a) verwendet wird. Die lag-Zeit beträgt in diesem Versuch 33 Minuten.

Beispiel 3

- 10 Oxidation von DPHPC in isoliertem High density Lipoprotein.

Versuchsdurchführung wie unter Beispiel 1 beschrieben, wobei statt LDL High density Lipoprotein verwendet wird. Die lag-Zeit ist praktisch Null.

- 15 Beispiel 4

Oxidation von DPHPC in 1%igem Serum.

- 20 Versuchsdurchführung wie unter Beispiel 1 beschrieben; wobei statt LDL Serum gelabelt und danach mit PBS auf 1% verdünnt wird. Außerdem wird statt $1,67 \mu\text{M Cu}^{2+}$ $50 \mu\text{M Cu}^{2+}$ verwendet. Die lag-Zeit beträgt in diesem Versuch 94 Minuten.

Beispiel 5

- 25 Oxidation von DPH in isoliertem LDL.

Versuchsdurchführung wie unter Beispiel 1 beschrieben, wobei statt DPHPC DPH verwendet wird. Die lag-Zeit beträgt in diesem Versuch 25,8 Minuten.

- 30 Beispiel 6

Oxidation von DPH-Propionsäure in isoliertem LDL.

- 35 Versuchsdurchführung wie unter Beispiel 1 beschrieben, wobei statt DPHPC DPH-Propionsäure verwendet wird. Die lag-Zeit beträgt in diesem Versuch 24,2 Minuten.

Beispiel 7

Oxidation von TMA-DPH in isoliertem LDL.

- 40 Versuchsdurchführung wie unter Beispiel 1 beschrieben, wobei statt DPHPC TMA-DPH verwendet wird. Die lag-Zeit beträgt in diesem Versuch 56,7 Minuten.

Beispiel 8

- 45 Oxidation von DPHSM in isoliertem LDL.

Versuchsdurchführung wie unter Beispiel 1 beschrieben; wobei statt DPHPC DPHSM verwendet wird. Die lag-Zeit beträgt in diesem Versuch 24 Minuten.

- 50 Beispiel 9

Oxidation von DPHPE in isoliertem LDL.

- 55 Versuchsdurchführung wie unter Beispiel 1 beschrieben, wobei statt DPHPC DPHPE verwendet wird. Die lag-Zeit beträgt in diesem Versuch 22 Minuten.

Beispiel 10

Oxidation von DPHPIg in isoliertem LDL.

- 5 Versuchsdurchführung wie unter Beispiel 1 beschrieben, wobei statt DPHPC DPHPIg verwendet wird. Die lag-Zeit beträgt in diesem Versuch 21 Minuten.

Beispiel 11

- 10 Oxidation von DPHPC in isoliertem LDL.

Versuchsdurchführung wie unter Beispiel 1 beschrieben, wobei statt Cu^{2+} AAPH (2 mM) als Oxidations-initiator verwendet wird. Die lag-Zeit beträgt in diesem Versuch 16 Minuten.

- 15 Beispiel 12

Oxidation von DPH in isoliertem LDL.

- 20 Versuchsdurchführung wie unter Beispiel 5 beschrieben, wobei statt Cu^{2+} AAPH (2 mM) als Oxidations-initiator verwendet wird. Die lag-Zeit beträgt in diesem Versuch 16 Minuten.

Beispiel 13

Oxidation von DPH-Propionsäure in isoliertem LDL.

- 25 Versuchsdurchführung wie unter Beispiel 6 beschrieben, wobei statt Cu^{2+} AAPH (2 mM) als Oxidations-initiator verwendet wird. Die lag-Zeit beträgt in diesem Versuch praktisch 0 Minuten.

Beispiel 14

- 30 Oxidation von TMA-DPH in isoliertem LDL.

Versuchsdurchführung wie unter Beispiel 7 beschrieben, wobei statt Cu^{2+} AAPH (2 mM) als Oxidations-initiator verwendet wird. Die lag-Zeit beträgt in diesem Versuch praktisch 0 Minuten.

Beispiel 15

Oxidation von DPHSM in isoliertem LDL.

- 40 Versuchsdurchführung wie unter Beispiel 8 beschrieben, wobei statt Cu^{2+} AAPH (2 mM) als Oxidations-initiator verwendet wird. Die lag-Zeit beträgt in diesem Versuch 22 Minuten.

Beispiel 16

- 45 Oxidation von DPHPE in isoliertem LDL.

Versuchsdurchführung wie unter Beispiel 9 beschrieben, wobei statt Cu^{2+} AAPH (2 mM) als Oxidations-initiator verwendet wird. Die lag-Zeit beträgt in diesem Versuch 17 Minuten.

- 50 Beispiel 17

Oxidation von DPHPIg in isoliertem LDL.

- 55 Versuchsdurchführung wie unter Beispiel 10 beschrieben, wobei statt Cu^{2+} AAPH (2 mM) als Oxidations-initiator verwendet wird. Die lag-Zeit beträgt in diesem Versuch 8 Minuten.

Beispiel 18

Oxidation von DPHPC in isoliertem LDL mit unterschiedlichen Cu^{2+} Konzentrationen.

- 5 Versuchsdurchführung wie unter Beispiel 1 beschrieben, wobei mehrere Cu^{2+} Konzentrationen ($1,67 \mu\text{M}$ und $4,72 \mu\text{M}$) zum Oxidieren verwendet werden. Die lag-Zeit beträgt in diesem Versuch 16 Minuten für eine Cu^{2+} Konzentration von $1,67 \mu\text{M}$ und 2 Minuten bei einer Cu^{2+} Konzentration von $4,72 \mu\text{M}$. Wegen der unterschiedlichen Geschwindigkeiten bei der Oxidation durch die verschiedenen Konzentrationen an Oxidationsinitiator (Cu^{2+}) wird hier vorzugsweise die t1/2-Methode (Bild 1) zur Auswertung herangezogen. Diese
10 ergibt Werte von 35,5 Minuten für $1,67 \mu\text{M} \text{Cu}^{2+}$ und 23 Minuten für $4,72 \mu\text{M} \text{Cu}^{2+}$.

Beispiel 19

Oxidation von DPHPC in isoliertem LDL mit unterschiedlichen AAPH Konzentrationen.

- 15 Versuchsdurchführung wie unter Beispiel 11 beschrieben, wobei mehrere AAPH Konzentrationen (1 mM , 2 mM und 5 mM) zum Oxidieren verwendet werden. Die lag-Zeit beträgt in diesem Versuch 37 Minuten für eine AAPH Konzentration von 1 mM , 23 Minuten bei einer AAPH Konzentration von 2 mM und 8,4 Minuten bei einer AAPH Konzentration von 5 mM . Wegen der unterschiedlichen Geschwindigkeiten bei der Oxidation durch die verschiedenen Konzentrationen an Oxidationsinitiator (AAPH) wird hier vorzugsweise die t1/2-Methode (Bild 1) zur Auswertung herangezogen. Diese ergibt Werte von 77 Minuten für 1 mM AAPH, 60 Minuten für 2 mM AAPH und 35 Minuten für 5 mM AAPH.
20

Beispiel 20

- 25 Oxidation von DPHPC in isoliertem LDL in Gegenwart unterschiedlicher Konzentrationen an Vitamin E.

Versuchsdurchführung wie unter Beispiel 1 beschrieben. Zusätzlich werden unterschiedliche Konzentrationen an Vitamin E ($0 \mu\text{M}$, $2 \mu\text{M}$, $4 \mu\text{M}$ und $6 \mu\text{M}$) beim Inkubieren mit dem Fluoreszenzmarker über Nacht zugegeben. Die lag Zeit beträgt in diesem Versuch 16 Minuten für $0 \mu\text{M}$, 18 Minuten für $2 \mu\text{M}$, 22 Minuten für $4 \mu\text{M}$ und 24 Minuten für $6 \mu\text{M}$ Vitamin E.
30

Beispiel 21

- 35 Oxidation von DPHPC in isoliertem LDL in Gegenwart unterschiedlicher Konzentrationen an Vitamin C.

Versuchsdurchführung wie unter Beispiel 1 beschrieben. Zusätzlich werden unterschiedliche Konzentrationen an Vitamin C ($0 \mu\text{M}$, $2,5 \mu\text{M}$ und $5 \mu\text{M}$) vor der Cu^{2+} Zugabe dem Reaktionsgemisch zugegeben. Die lag Zeit beträgt in diesem Versuch 28 Minuten für $0 \mu\text{M}$, 49 Minuten für $2,5 \mu\text{M}$ und 74 Minuten für $5 \mu\text{M}$ Vitamin C.
40

Beispiel 22

Vergleich der DPH-Methode mit der Dien-Methode.

- 45 Versuchsdurchführung mittels der Fluoreszenzmethode wie unter Beispiel 1 beschrieben. Für die Dien Messung wird auf einem Hitachi Photometer die Extinktion bei 234 nm mit der Zeit verfolgt. Es ergibt sich bei beiden Methoden eine übereinstimmende lag Zeit von 21 Minuten (Bild 2).

50 Patentansprüche

1. Verfahren zur Bestimmung der Oxidierbarkeit von Lipiden, dadurch gekennzeichnet, daß man Diphenylhexatrien (DPH) und Lipidkonjugate, die Diphenylhexatrien kovalent gebunden enthalten, in Lipoproteine einbaut und die Oxidation dieser Verbindungen, hier als Marker bezeichnet, die mit Cu^{2+} oder anderen Oxidationsinitiatoren initiiert wird, über die zeitabhängige Abnahme der Fluoreszenzintensität bestimmt.
55

2. Verfahren zur Bestimmung der Oxidierbarkeit von Lipiden nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß DPH oder seine Lipidkonjugate in die Lipoproteine von Vollserum, Blutplasma oder verdünntem Serum eingebaut werden, und die Oxidation in diesen Systemen gemäß Anspruch 1 gemessen wird.
3. Verfahren zur Bestimmung der Oxidierbarkeit von Lipiden nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß man Diphenylhexatrien-Glycerolipide, Diphenylhexatrien-Sphingolipide oder Diphenylhexatrien-Sterolester als Marker verwendet.
4. Verfahren zur Bestimmung der Oxidierbarkeit von Lipiden nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß man Diphenylhexatrien-Propionsäure, 1-(4-Trimethylaminophenyl)-6-phenyl-1,3,5-hexatrien-p-toluolsulfonat oder N-p-(6-Phenyl-(1,3,5-hexatrienyl(phenyl(propyl))))-trimethylamino-p-toluolsulfonat als Marker verwendet.
5. Verfahren zur Bestimmung der Oxidierbarkeit von Lipiden nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß man verschiedene Oxidationsinitiatoren, bevorzugt 2,2'-Azobis(2-amidinopropan)hydrochlorid, zweiwertige Eisenionen, dreiwertige Eisenionen und Ascorbinsäure, zweiwertige Kupferionen und Wasserstoffperoxid, Myoglobin und Wasserstoffperoxid, Singulett Sauerstoff, Ozon, Halogenradikale, Lipidperoxide, organische Hydroperoxide wie tert-Butylhydroperoxid oder Cumolhydroperoxid, Cytochrome, Methämoglobin, Xanthin/Xanthinoxidase und die Enzyme Cyclooxygenase und Lipoxygenase verwendet.
6. Verfahren zur Bestimmung der Oxidierbarkeit von Lipiden nach den Ansprüchen 1 und 2, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Oxidation in Gegenwart von Antioxidantien, bevorzugt von Tocopherolen (α , β oder γ), Vitamin C, Albumin, Lipoprotein hoher Dichte (HDL), Ubichinol, Harnsäuren, Cystein, Butylhydroxyanisol, Burylhydroxytoluol, Trolox, Propylgallat, N,N'-Diphenylendiamin, Glutathion, Hydroxy-1,4-dimethylcarbazol, Promethazin, Chlorpromazin, Ethoxyquin sowie verschiedenen Enzymen wie Katalase, Peroxidasen und Superoxid Dismutase gemessen wird.
7. Verfahren zur Bestimmung der Oxidierbarkeit von Lipiden nach Anspruch 6, **dadurch gekennzeichnet**, daß Serumproben von Menschen und/oder Versuchstieren untersucht werden, denen vor der Serumabnahme über gewisse Zeiträume Antioxidantien, wie in Anspruch 6 genannt, verabreicht worden waren, um die Oxidierbarkeit der Serumlipoproteine zu verändern.
8. Verfahren zur Diagnostik und zur Bestimmung der Prädisposition von Atherosklerose und koronaren Herzerkrankungen, **dadurch gekennzeichnet**, daß man die Oxidierbarkeit von Lipiden nach den Ansprüchen 1 und 2 bestimmt.
9. Verfahren zur Diagnostik und zur Bestimmung der Prädisposition von Sichelzellenanämie, Krebs oder Morbus Alzheimer, **dadurch gekennzeichnet**, daß man Diphenylhexatrien oder seine Lipidkonjugate in isolierte Zellmembranen, Zellorganellen oder Zellen einbaut und die Oxidierbarkeit der Lipide nach Anspruch 1 *in vitro* mißt.
10. Verfahren zur Bestimmung der Oxidierbarkeit von Lipiden nach den Ansprüchen 1 und 6, **dadurch gekennzeichnet**, daß Diphenylhexatrien oder seine Lipidkonjugate in Lebensmittel eingebaut werden und die Haltbarkeit dieser Lebensmittel in bezug auf die Lipidoxidation untersucht wird.

Hiezu 2 Blatt Zeichnungen

Fig. 1

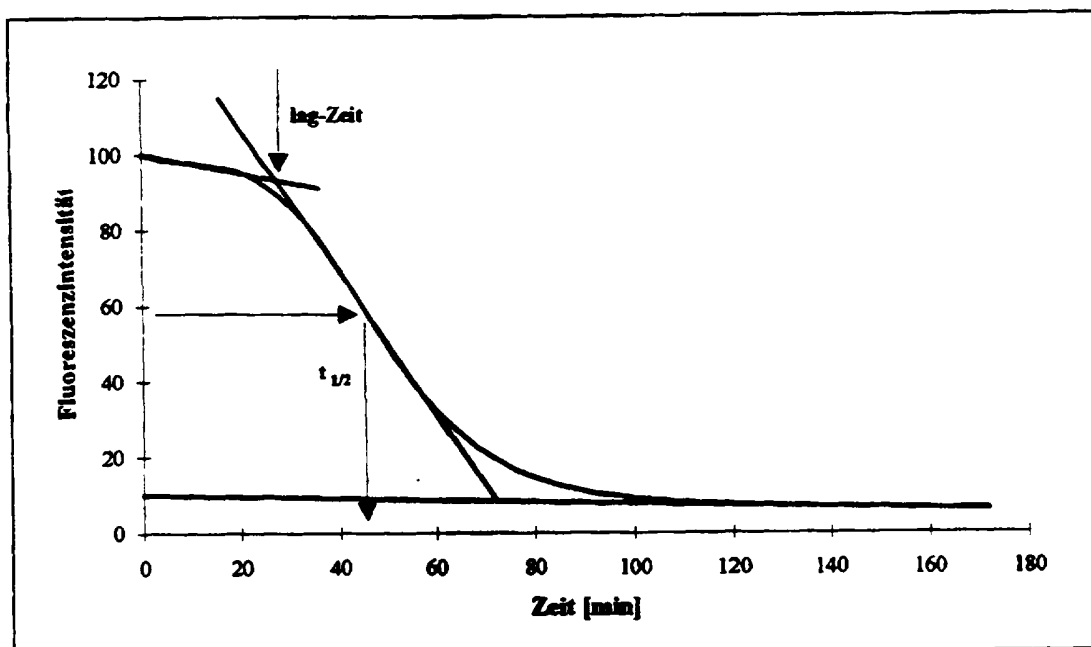


Fig. 2

