

Andrea Möllers

Dr. sc. hum.

Analytik von Aldehyden der Lipidperoxidation: Entwicklung einer Headspace-Methode und Anwendung bei Patienten mit Acute Respiratory Distress Syndrome unter Therapie mit Stickstoffmonoxid

Geboren am 21.12.1969 in Zweibrücken

Studium der Lebensmittelchemie

Erstes Staatsexamen am 18.11.1993 an der Universität Kaiserslautern

Promotionsfach: Labormedizin

Doktorvater: Prof. Dr. rer. nat. W. Kochen

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Methode zur Bestimmung von flüchtigen Aldehyden der Lipidperoxidation in Blutproben etabliert. Durch Weiterentwicklung und Optimierung einer manuellen dynamischen Headspace-GC ist eine automatisierbare statische Headspace-Methode entstanden, die es erlaubt, im Routinebetrieb flüchtige Aldehyde in nativen Blutproben ohne aufwendige Probenvorbereitung zu bestimmen.

Nach Thermostatisierung der Proben in einem automatischen Headspace-Probengeber erfolgte die gaschromatographische Auftrennung mit anschließender FID-Detektion und quantitativer Analyse. Unter den gewählten Bedingungen waren die gesättigten und einfach ungesättigten Aldehyde C3 – C8 prinzipiell nachweisbar. Die untersuchten Blutproben enthielten typischerweise jedoch nur Propanal, 2-Methylpropanal, Butanal, 3-Methylbutanal, Pentanal und Hexanal, sowie die beiden Ketone Aceton und 2-Butanon, nicht jedoch die entsprechenden ungesättigten Aldehyde. Die nachgewiesenen Produkte wurden alle zusätzlich massenspektrometrisch identifiziert.

Als wichtige Kennzahl der Headspace-Analytik gilt der Verteilungskoeffizient der Analyte, der daher für die vorliegenden Aldehyde bestimmt und mit Literaturdaten verglichen wurde.

Um Verluste wie auch Artefaktbildung von LPO-Produkten in den biologischen Matrices zu vermeiden, war die Untersuchung präanalytischer Bedingungen notwendig. Hierbei war es vor allem wichtig, sowohl die Lagerung (am besten bei -80°C) als auch die Analyse der Blutproben unter Ausschluss von (Luft)Sauerstoff vorzunehmen, da sonst artifiziell erhöhte Aldehyd-Werte gemessen werden. Ähnliches wurde nach mehrmaligem Einfrieren und Auftauen der Blutproben beobachtet, allerdings kam es hierdurch nur zu einem Anstieg der unverzweigten, nicht aber der verzweigten Aldehyde.

Zur Validation der neu entwickelten Methode erfolgten Vergleichsmessungen mit einer bereits etablierten HPLC-Methode (Derivatisierung mit 1,3-Cyclohexadion), die zu diesem

Zweck an die Verwendung eines Tandem-Massenspektrometers adaptiert wurde. Am Beispiel der Hauptsubstanz Hexanal wurde sehr gute Übereinstimmung beider Analysemethoden nachgewiesen, wobei die Headspace-Methode der CHD-Derivatisierung an Praktikabilität und Empfindlichkeit deutlich überlegen war.

Die so entwickelte Bestimmungsmethode fand anschließend in einer klinischen Studie Anwendung:

Bei Patienten mit akuter respiratorischer Insuffizienz (Acute respiratory distress syndrome, ARDS) wurden im Verlauf der Therapie mit Stickstoffmonoxid verschiedene Aldehyde der Lipidperoxidation (vor allem Hexanal und Malondialdehyd) bestimmt.

Hier muss prinzipiell zwischen den flüchtigen unverzweigten und verzweigten Aldehyden und Malondialdehyd (MDA) unterschieden werden. Im Gegensatz zu den verzweigten zeigten die unverzweigten flüchtigen Aldehyde (v. a. Propanal, Hexanal) deutliche arterio-venöse Differenzen: bei den ARDS-Patienten waren die arteriellen Konzentrationen signifikant erhöht, während die venösen Werte ähnlich niedrig waren wie bei gesunden Probanden, wo keine arterio-venösen Differenzen auftraten. Die verzweigten Aldehyde und MDA zeigten diese Unterschiede nicht. Die MDA-Werte der ARDS-Patienten lagen aber im Vergleich zu gesunden Probanden signifikant höher.

Durch die Kurz- und Langzeitinhalation von Stickstoffmonoxid (NO) kam es weder bei Patienten noch bei gesunden Probanden zu einem Einfluss auf die bestimmten Parameter der Lipidperoxidation. Es wurde weder eine Verstärkung noch eine Besserung der LPO nachgewiesen. Daraus kann gefolgert werden, dass inhaliertes NO die Lunge nicht vor oxidativem Stress schützen konnte. Andererseits wurde aber auch keine zusätzliche Schädigung der Lunge durch die Therapie mit Stickstoffmonoxid festgestellt, so dass die NO-Inhalation weiterhin klinisch zu Therapie des ARDS eingesetzt werden kann.

Die Analyseergebnisse dieser Studie veranschaulichen erneut, dass die verschiedenen Aldehyde (z. B. Hexanal und Malondialdehyd) unterschiedlichen Ursprungs sein müssen, aber sich ergänzend als Verlaufsp Parameter des oxidativen Stresses bei verschiedenen Krankheiten geeignet sind.