



(10) **DE 10 2012 003 595 A1** 2013.08.29

(12)

## Offenlegungsschrift

(21) Aktenzeichen: **10 2012 003 595.0**

(22) Anmeldetag: **23.02.2012**

(43) Offenlegungstag: **29.08.2013**

(51) Int Cl.: **G01N 33/50 (2012.01)**

**G01N 33/82 (2012.01)**

(71) Anmelder:

**Popov, Igor, Dr., 10115, Berlin, DE**

(72) Erfinder:

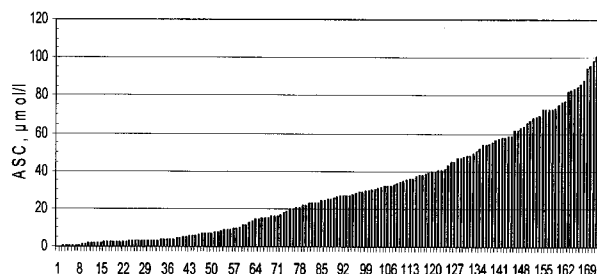
**Lewin, Gudrun, Dr., 10115, Berlin, DE; Popov,  
Michail, 10435, Berlin, DE; Popov, Martin, 10115,  
Berlin, DE; Popov, Igor, Dr., 10115, Berlin, DE**

**Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen**

(54) Bezeichnung: **Verfahren und Testbesteck für die patientennahe Beurteilung des Zustandes des antioxidativen Schutzes gegen oxidativen Stress im Organismus**

(57) Zusammenfassung: Die Bestimmung des Zustandes des antioxidativen Abwehrsystems gegen unkontrollierte zellschädigende Oxidation (oxidativer Stress) als Ursache und Begleiterscheinung von Zivilisationskrankheiten ist ein bisher ungelöstes Problem der Labordiagnostik im Allgemeinen. Mehrere Methoden wurden beschrieben, die zeitaufwändig und unzureichend informativ sind. Die Aufgabe der Erfindung war deshalb die Behebung gegenwärtiger methodischer Defizite durch Entwicklung eines Verfahrens, das sowohl für den Einsatz in patientennahen praxisinternen Laboratorien als auch für Feldanwendungen geeignet sein soll. Die wesentlichen Merkmale der Erfindung bestehen darin, dass für die Beurteilung des Zustandes des antioxidativen Abwehrsystems im Organismus zwei minimal notwendige und in ihrem Informationsgehalt ausreichende Parameter (die antioxidative Kapazitäten der Ascorbin- und Harnsäuren) gefunden und die entsprechende Technologie für ihre Expressbestimmung im Kapillarblut entwickelt wurden. Die Erfindung ermöglicht dem Arzt, in kürzester Zeit die Parameter zu bestimmen, dem Patienten seine Blutwerte mitzuteilen und im Bedarfsfall eine entsprechende adjuvante antioxidative Therapie einzuleiten sowie zu jedem beliebigen Zeitpunkt ihre Effektivität zu kontrollieren.

Die Erfindung kann angewendet werden in Arzt- und Laborpraxen, bei Hausbesuchen sowie für Felduntersuchungen von bereits erkrankten Personen als auch von klinisch Gesunden, insbesondere im Falle einer bevorstehenden oder vorhandenen Situation von physischem, chemischem bzw. psycho-emotionellem Stress, im Leistungssport, bei ökologischen Katastrophen, im militärischen Bereich u. ä. zwecks Bestimmung der Notwendigkeit entsprechender Präventionsmaßnahmen.



## Beschreibung

**[0001]** Unter „patientennaher Labordiagnostik“ (point-of-care testing, POCT) wird die Anwendung labormedizinischer Verfahren in unmittelbarer Nähe des Patienten verstanden, die eine zeitnahe Bestimmung von Vitalparametern ermöglicht. Die entscheidenden konzeptionellen Besonderheiten bestehen im Wegfall des Probenverkehrs zum Labor, der fehlenden aufwändigen Probenvorbereitung (Bestimmungen möglichst im Vollblut) sowie der sofortigen Verfügbarkeit des Resultats unmittelbar beim Patienten. Diese Eigenschaften sind von besonderer Bedeutung für den Einsatz in ärztlichen Praxen, bei Hausbesuchen, in Operationssälen, in Intensivstationen, in der Sportmedizin einschließlich Fitnessstudios, in Apotheken, in Katastrophensituationen und im militärischen Bereich.

**[0002]** Unstrittig ist, dass oxidativer Stress als Störung des Gleichgewichtes zwischen oxidativen schädigenden biochemischen Abläufen – verursacht durch eine Vielzahl physischer, umwelttoxischer, psycho-emotioneller Einflüsse – und den antioxidativen Abwehrreaktionen eine Ursache und/oder ein Begleitphänomen vieler Krankheiten sowie ein Merkmal prämorbidier Zustände ist. Seine Beurteilung im POCT-Rahmen ist daher eine Herausforderung, der man sich bisher nur unbefriedigend stellen konnte und für die die vorliegende Erfindung bestmöglich geeignet ist.

**[0003]** Es gibt viele Stoffe, die antioxidativ wirksam sind, im Organismus jedoch unterschiedliche Bedeutung haben. Wir haben herausgefunden, dass zwischen obligaten und fakultativen Antioxidantien unterschieden werden muss.

**[0004]** Zu den obligaten Antioxidantien sind die im Organismus synthetisierten bzw. als Vitamine aufgenommenen, gespeicherten und entsprechend dem Bedarf freigesetzten antioxidativ wirksamen Stoffe zu zählen. Dabei unterliegt die dem Bedarf entsprechende Aufrechterhaltung ihrer Konzentration im Blut einer aktiven Regulation, deren Voraussetzung eine ausreichende Speicherfüllung ist.

**[0005]** Die fakultativen Antioxidantien sind vorzugsweise pflanzlichen Ursprungs, z. B. Lycopin (rotes Pigment von Tomaten),  $\beta$ -Karotin (oranges Pigment von Karotten) [1]. Sie werden mit der Nahrung aufgenommen und passiv verwertet. Über ihre Bedeutung für die Aufrechterhaltung der antioxidativen Homöostase gibt es kontroverse Meinungen [2].

**[0006]** Die wichtigsten obligaten wasserlöslichen Antioxidantien im menschlichen Organismus sind Ascorbinsäure (Vitamin C) [3] und die Harnsäure [4]. Da der Mensch in seiner evolutionären Entwicklung die Fähigkeit verloren hat, Ascorbinsäure zu produ-

zieren, wurde dieser Verlust im Laufe der Evolution teilweise durch die Beibehaltung der Harnsäure (keinen weiteren Abbau zum Allantoin, wie es bei den Ascorbinsäure-synthesefähigen Säugetieren der Fall ist) kompensiert [5]. Als Antioxidant ist sie jedoch weit weniger effektiv als Ascorbinsäure. Daher ist erstens ihre Konzentration im Blut wesentlich höher als die der Ascorbinsäure und liegt fast an der Grenze ihrer Löslichkeit und zweitens erreicht ihr Spiegel im Blut im Falle einer Hypovitaminose C bzw. unter den Bedingungen eines oxidativen Stress sehr hohe Werte. Sowohl ein Vitamin C Mangel als auch die Hyperurikämie gehen mit der Gefahr lebensbedrohlicher Zustände einher [6, 7, 8, u. v. a.].

**[0007]** Unsere eigenen Befunde zeigten, dass eine Abnahme der antioxidativen Kapazität der Ascorbinsäure im Blut während chirurgischer Eingriffe in den Hypovitaminosebereich mit postoperativen Komplikationen einhergeht. Der Abfall der antioxidativen Kapazität der Ascorbinsäure bis auf Null bei Intensivtherapiepatienten wird von einer rasanten Erhöhung der antioxidativen Kapazität der Harnsäure begleitet, die als Prädiktor eines letalen Ausgangs angesehen werden kann [9]. Weiterhin wurde unter den Bedingungen des oxidativen Stress nach einer UV-Ganzkörperbestrahlung (Solarium) eine hochsignifikante ( $p < 0,001$ ) negative Korrelation zwischen beiden Parametern festgestellt [9]. Darüber hinaus haben wir herausgefunden, dass auch unter dem circadianen Aspekt (Tagesrhythmik) sie negativ miteinander korrelieren.

**[0008]** Daraus ergibt sich die Schlussfolgerung, dass für die Beurteilung des antioxidativen Gleichgewichtes (antioxidative Homöostase) im menschlichen Organismus die Bestimmungen beider Substanzen, genauer definiert ihrer antioxidativen Eigenschaften, von großer Bedeutung im POCT-Rahmen sind. Die etablierten Labormethoden der Bestimmungen der Ascorbin- und Harnsäuren im Blut sind für derartige Zwecke neben der Langwierigkeit aus zwei Gründen ungeeignet.

1. Es wird vorwiegend die Substanzmenge gemessen, ohne Differenzierung der reduzierten und oxidierten Formen. Für die Beurteilung des Zustandes der antioxidativen Homöostase ist jedoch die reduzierte Form von Bedeutung.

2. Einige HPLC-Verfahren gestatten selektive Bestimmungen reduzierter und vollständig oxidierten Formen, z. B. der Ascorbinsäure und der Dehydroascorbinsäure. Auch solche Verfahren sind für korrekte Aussagen unzureichend, da sowohl die Ascorbinsäure als auch die Harnsäure in der Lage sind, mit zwei oxidierenden Molekülformen (freien Radikalen) zu reagieren. Nach der ersten Reaktionsstufe entsteht dabei eine halboxidierte Form des Antioxidanten und nach der zweiten Stufe ihre volloxidierte.

Somit kommen nur Testsysteme in Frage, die die anti-radikalen Eigenschaften von Stoffen zu bestimmen vermögen. Zu diesen gehören z. B. die auf der photosensibilisierten [10] und der thermoinitierten [11] Chemolumineszenz basierenden Systeme.

**[0009]** Für die Bestimmung der antioxidativen Kapazität der Ascorbinsäure in biologischen Proben mittels der photosensibilisierten Chemolumineszenz wurde ein Verfahren beschrieben, in dem die zu untersuchende Probe vor der Messung gelchromatographisch fraktioniert werden muss [12]. Wegen der Notwendigkeit einer speziellen Ausrüstung und dem Zeitaufwand ist dieses Verfahren im Sinne POCT ungeeignet. Die Aufgabe der Erfindung bestand darin, diese Nachteile zu beseitigen sowie ein entsprechendes Testbesteck zu entwickeln. Eine weitere Aufgabe bestand darin, einen Belastungstest zu entwickeln, der eine Aussage über den aktuellen Resistenzgrad des klinisch gesunden Organismus gegen oxidativen Stress ermöglicht. Die erste Aufgabe der Erfindung wurde dadurch gelöst, indem die Messungen im System der thermoinitierten Chemolumineszenz mit Einsatz des Vollblutes realisiert wurden. Das entsprechende Testbesteck besteht aus sechs in Ampullen portionierten Komponenten:

1. Reagenz 1: Gefriergetrocknetes Reaktionsgemisch aus der Generatorsubstanz für freie Radikale und dem Chemolumineszenzverstärker für ihren Nachweis entsprechend der Beschreibung [10],
2. Reagenz 2: Verdünnungslösung-I für Reagenz 1 entsprechend der Beschreibung [10],
3. Reagenz 3: Standardsubstanz Ascorbinsäure für die Kalibrierung des Messgerätes; die Ergebnisse aller Messungen werden in äquivalenten Konzentrationen der Standardsubstanz ausgedrückt (ASC-Äquivalente in  $\mu\text{mol/l}$ ),
4. Reagenz 4: Gefriergetrocknetes Enzym Ascorbinsäureoxidase,
5. Reagenz 5: Verdünnungslösung-II (physiologische Kochsalzlösung) für die Blutprobe und Reagenz 3,
6. Reagenz 6: Gefriergetrocknete Mischung von zwei Enzymen – Ascorbin- und Harnsäureoxidasen.

**[0010]** Jede Ampulle enthält die Substanzmenge für einen Einsatz (sog. „unit-use-reagent“, d. h. das Reagenz, das für eine einzelne Nutzung portioniert ist und danach verbraucht wird).

**[0011]** Für die Messungen werden ein mit einer beheizten Messkammer ( $37^\circ\text{C}$ ) ausgerüstetes Chemoluminometer, z. B. minilum® ([www.oxidative-stress.com](http://www.oxidative-stress.com)) und eine Messpipette für  $25\ \mu\text{l}$  benötigt. Alle anderen Komponenten (Reagenzien und Einweg-Pasteur-Pipetten) sind im Testbesteck enthalten. Bedarfsfalls (fehlende Messpipette) können Einwegmesskapillaren für  $25\ \mu\text{l}$  verwendet werden.

## Messablauf

### A. Bestimmung des Leerwertes.

1. Der Inhalt einer Ampulle mit dem Reagenz 2 wird in die Ampulle mit dem Reagenz 1 gegeben und die Messung entsprechend der Gerätebeschreibung gestartet.
2. Das Messergebnis ist  $L_0$ .

### B. Kalibration des Gerätes.

1. Der Inhalt einer Ampulle mit dem Reagenz 5 wird in die Ampulle mit dem Reagenz 3 gegeben und vermischt.
2.  $25\ \mu\text{l}$  davon werden in eine Ampulle mit dem Reagenz 1 übertragen und dazu der Inhalt einer Ampulle mit dem Reagenz 2 zugegeben und die Messung gestartet.
3. Das Messergebnis ist I.

### C. Untersuchung einer Blutprobe.

1.  $25\ \mu\text{l}$  des Kapillarblutes werden in die Ampulle mit dem Reagenz 5 gegeben und vermischt.
2. Jeweils ca.  $1/3$  davon wird mit Hilfe einer (hier und in allen weiteren Schritten) Pasteur-Pipette in die Ampulle mit dem Reagenz 4 sowie in die Ampulle mit dem Reagenz 6 übertragen, und die Zeit vermerkt (die Messungen dieser Einsätze sollen frühestens nach 10 Minuten erfolgen).
3.  $25\ \mu\text{l}$  des nach dem 2. Schritt verbliebenen Volumens werden in die Ampulle mit dem Reagenz 1 übertragen, der Inhalt einer neuen Ampulle mit dem Reagenz 2 zugegeben und die Messung gestartet.
4. Das Messergebnis ist  $L_1$ .
5.  $25\ \mu\text{l}$  des Materials aus dem jeweiligen 2. Schritt werden in die Ampullen mit dem Reagenz 1 übertragen, der Inhalt jeweils einer neuen Ampulle mit dem Reagenz 2 zugegeben und die Messung gestartet.
6. Die Messergebnisse sind 12 und 13.

### D. Berechnung des Parameters $\text{ASC}_B$ (antioxidative Kapazität der Ascorbinsäure – ASC – im Vollblut).

$$\text{ASC}_B = k(L_1 - L_2)/(L_C - L_0)\ \mu\text{mol/l}$$

k – Korrekturfaktor, liegt der Beschreibung des Testbestecks bei.

### E. Berechnung des Parameters $\text{UA}_B$ (antioxidative Kapazität der Harnsäure – UA – im Vollblut).

$$\text{UA}_B = k(L_2 - L_3)/(L_C - L_0)\ \mu\text{mol/l}$$

**[0012]** Eine Umrechnung der Messergebnisse für die Parameter ASC und UA im Blutplasma kann mit Berücksichtigung des Hämatokritwertes realisiert

werden. Eine Alternativvariante: Für die Messungen kann, falls vorhanden, statt Vollblut das Blutplasma aus der Hämatokritkapillare verwendet werden.

#### Ausführungsbeispiele

Beispiel 1: Untersuchungen von Patienten (POCT).

**[0013]** Das Ziel ist die Feststellung eines möglichen Mangelzustandes an Vitamin C. Unsere Untersuchungen von 170 Patienten einer ärztlichen Praxis ohne Differenzierung nach Alter, Geschlecht und Art der Erkrankung zeigten in vielen Fällen Mangelzustände von Hypo- bis Avitaminose auf: [Abb. 1](#).

Beispiel 2: Untersuchungen von klinisch Gesunden.

**[0014]** Das Ziel ist die Beurteilung des aktuellen Zustandes und der Widerstandsfähigkeit des antioxidativen Systems gegen potentielle Stressbelastungen. Als Folge eines unterschweligen Stresszustandes gekoppelt mit wegen einer mangelhaften Ernährung unzureichenden Speichervorräten an Vitamin C entspricht der Istwert der antioxidativen Kapazität der Ascorbinsäure im Blut möglicherweise nicht dem Sollwert. Im Falle einer zusätzlichen Belastung, z. B. physischer Stress während des Marathonlaufes, Fußballspiels o. ä. kann es wegen starkem oxidativem Stress zum Herzversagen mit tödlichem Ausgang kommen. Deshalb ist es wichtig, verdeckte Mangelzustände nachzuweisen und rechtzeitig zu korrigieren bzw. potentielle übermäßige Belastungen physischer, psychischer oder chemischer Natur zu meiden.

**[0015]** Für derartige Ziele haben sich neben den Querschnittuntersuchungen ([Abb. 2](#)) zwei Belastungstests als geeignet erwiesen.

- Physischer Belastungstest. Dabei werden sowohl die Reserven an Vitamin C als auch die Reaktionsfähigkeit des antioxidativen Systems des Organismus (ein Merkmal des Trainings/Fitnesszustandes) erfasst. Ablauf: Mittels eines Velocergometers (sog. Cycling-Übung in Fitnessstudios) erfolgt eine ausschöpfende physische Belastung. Es werden zwei Blutproben abgenommen – vor und nach der Belastung. Gemessen werden die antioxidativen Kapazitäten der Ascorbin- und Harnsäuren. Zwei mögliche Ergebnisse sind auf der [Abb. 3](#) dargestellt. Das linke Diagramm zeigt eine gute Verträglichkeit der physischen Belastung. Der Organismus reagiert mit Verbesserung des antioxidativen Schutzes durch Erhöhung der Ascorbinsäure- und Harnsäurespiegel. Im zweiten Fall (rechtes Diagramm) kam es zum Abfall der antioxidativen Kapazität der Ascorbinsäure und einer Verdopplung der Harnsäure. Diese Reaktion weist auf eine schlechte Verträglichkeit der gleichen Belastung und ihre Gesundheitsgefahr hin.

- Belastungstest mit Ascorbinsäure. Auf der [Abb. 4](#) sind Verläufe der antioxidativen Kapazität der Ascorbinsäure bei drei Probanden nach einer peroralen Einnahme von Ascorbinsäure dargestellt. Eine mögliche Interpretation dieser Untersuchungen sieht folgendermaßen aus. Nach der Einnahme von 10 g Ascorbinsäure (die Untersuchung wird im nüchternen Zustand durchgeführt) gelangt sie in das Blut und wird durch Zellen und Gewebe resorbiert sowie durch die Nieren ausgeschieden. Die Geschwindigkeiten beider Prozesse beeinflussen den zeitlichen Ablauf der Konzentrationsänderung der Ascorbinsäure im Blut. Klinisch relevante Schlussfolgerungen werden anhand der Verläufe gezogen. Bei dem ersten Probanden ist ein befriedigender Zustand der antioxidativen Homöostase zu verzeichnen. Das Maximum der Konzentration der Ascorbinsäure wird schnell erreicht und der nachfolgende Verlauf entspricht überwiegend ihrer Ausscheidung durch die Nieren und bestätigt somit einen ausreichenden Versorgungszustand. Bei dem zweiten Probanden (mittlere Kurve) wird das Maximum der Konzentration im Blut mit Verzögerung erreicht, was auf eine relativ hohe Resorptionsrate hinweist und als geringfügigen Mangelzustand der Vitamin C Versorgung oder als erhöhten Verbrauch interpretiert werden kann. Die dritte Kurve signalisiert über einen sehr hochgradigen Mangelzustand an Vitamin C, das offensichtlich schnell und fast vollständig aus der Blutbahn resorbiert wird. Dies kann als dringende Indikation zur Supplementierung interpretiert werden. Es sei bemerkt, dass allein anhand der sich nur geringfügig unterscheidenden Ausgangswerte der antioxidativen Kapazitäten der Ascorbinsäure bei den Probanden keine relevanten Schlussfolgerungen möglich sind.

#### Figurenbeschreibung

**[0016]** [Fig. 1](#). Antioxidative Kapazität des Vitamin C im Blut von 170 Patienten einer ärztlichen Praxis ohne Differenzierung nach Alter, Geschlecht und Art der Erkrankung.

**[0017]** [Fig. 2](#). Antioxidative Kapazität des Vitamin C im Blut von 16 Teilnehmern eines Marathon-Laufs am Start. Bei den Sportlern 9. bis 16. liegt ein Hypovitaminosezustand vor, der bekanntermaßen als Risikofaktor von bis zu 3,5 für ein Herzversagen gilt [6].

**[0018]** [Fig. 3](#). Veränderungen der antioxidativen Parameter des Blutes (ASC – antioxidative Kapazität der Ascorbinsäure, HS – antioxidative Kapazität der Harnsäure) bei zwei Probanden nach einer erschöpfenden velocergometrischen Belastung.

[0019] Fig. 4. Veränderungen der antioxidativen Kapazität der Ascorbinsäure im Blut bei drei Probanden nach einer peroralen Einnahme von 10 g Vitamin C.

### Patentansprüche

1. Verfahren zur Beurteilung der Widerstandfähigkeit des Organismus gegen oxidativen Stress mittels Bestimmung der antioxidativen Eigenschaften von Körperflüssigkeiten **dadurch gekennzeichnet**, dass aus der Summe aller Antioxidanten insbesondere die Ascorbinsäure und die Harnsäure selektiv untersucht werden.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass Untersuchungen in einem freie Radikale generierenden Messsystem durchgeführt werden und als Auswertungsparameter die antiradikale Kapazität von Substanzen genommen wird.

3. Verfahren nach Ansprüchen 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, dass zwecks Gewährleistung einer patientennahen Expressdiagnostik (als „point-of-care testing“, POCT) Untersuchungen im Vollblut durchgeführt werden. Eine Umrechnung auf die Konzentration im Plasma ist mit Berücksichtigung des Hämokritwertes möglich.

4. Verfahren nach Ansprüchen 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass für die Bestimmung des entsprechenden Substanzanteils das Blut vor und nach Inkubation mit entsprechenden Enzymen (Ascorbat- und Uratoxidasen) untersucht wird und die Berechnung des Anteils als Differenz der Messergebnisse erfolgt.

5. Ein Testbesteck für die Realisierung der POCT-Diagnostik entsprechend den Ansprüchen 1 bis 4 im Messsystem mit dem chemoluminometrischen Nachweis von freien Radikalen beinhaltet 6 „ready-to-use“, „one-way“ in kleinen Behältern (Ampullen bzw. Vials) portionierte Komponenten:

- Reagenz 1: Gefriergetrocknetes Reaktionsgemisch aus der Generatorsubstanz für freie Radikale und dem Chemolumineszenzverstärker für ihren Nachweis,
- Reagenz 2: Verdünnungslösung-I für Reagenz 1,
- Reagenz 3: Standardsubstanz Ascorbinsäure für die Kalibration des Messgerätes,
- Reagenz 4: Gefriergetrocknetes Enzym Ascorbat-oxidase,
- Reagenz 5: Verdünnungslösung-II (physiologische Kochsalzlösung) für die Blutprobe und Reagenz 3,
- Reagenz 6: Gefriergetrocknete Enzymmischung von Ascorbat- und Uratoxidasen.

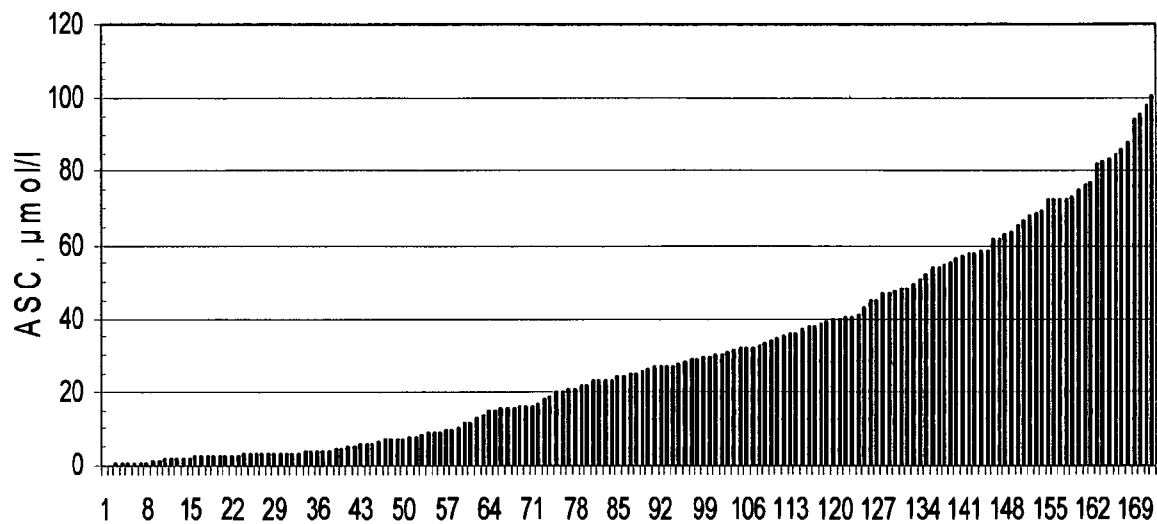
6. Verfahren nach Ansprüchen 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass für die Beurteilung des Füllungsgrades der Depots für das Vitamin C im Organismus ein Belastungstest durchgeführt wird, in dem dem Patienten im nüchternen Zustand ca. 10 g Vitamin C ver-

abreicht werden und anschließend die Dynamik der Änderung des Vitaminspiegels im Blut während der 4 nachfolgenden Stunden gemessen wird. Je geringer der maximale Wert ist und je später dieser erreicht wird, desto größer ist der Mangelzustand an Vitamin C.

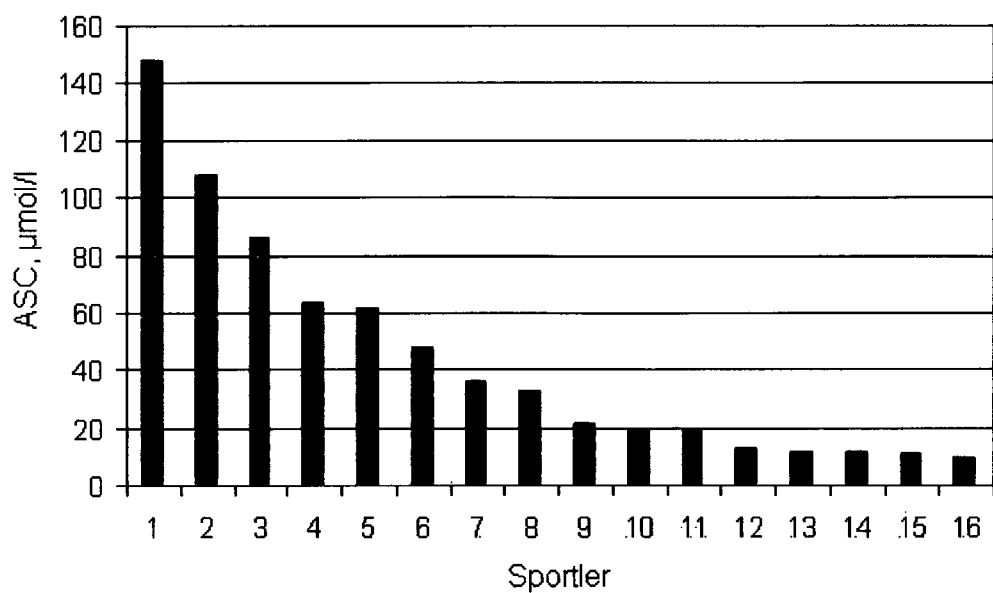
7. Verfahren nach Ansprüchen 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass für die Beurteilung des aktuellen Adaptationszustandes des antioxidativen Systems des Organismus ein physischer Belastungstest durchgeführt wird, der eine kurzzeitige erschöpfende Anstrengung (z. B. auf einem Laufband bzw. Veloergometer) darstellt, wobei die Blutwerte vor und nach der Belastung verglichen werden. Eine Zunahme der antiradikalen Kapazitäten von Ascorbin- und Harnsäuren wird positiv beurteilt; wenn aber die Zunahme der antioxidativen Harnsäurekapazität mit der Abnahme der Ascorbinsäurekapazität einher geht, wird das als mangelhafte Adaptation zu dem verwendeten Belastungsgrad interpretiert.

Es folgen 2 Blatt Zeichnungen

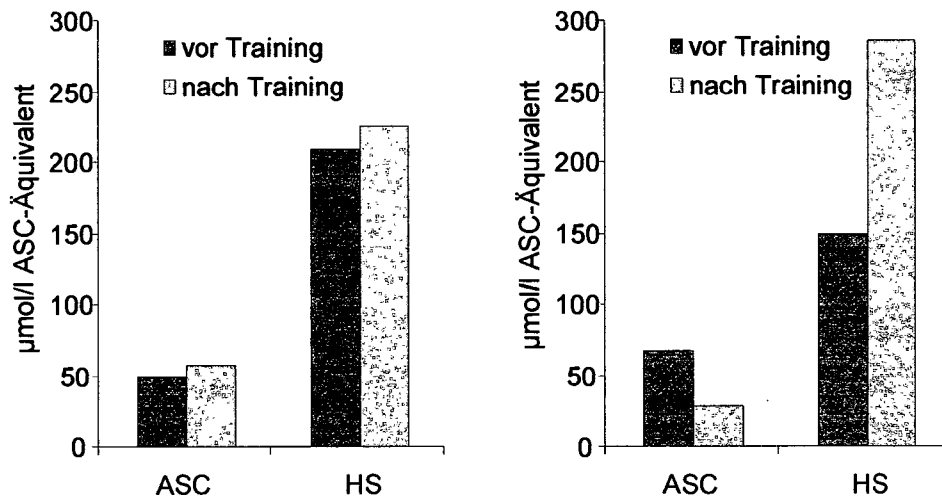
Anhängende Zeichnungen



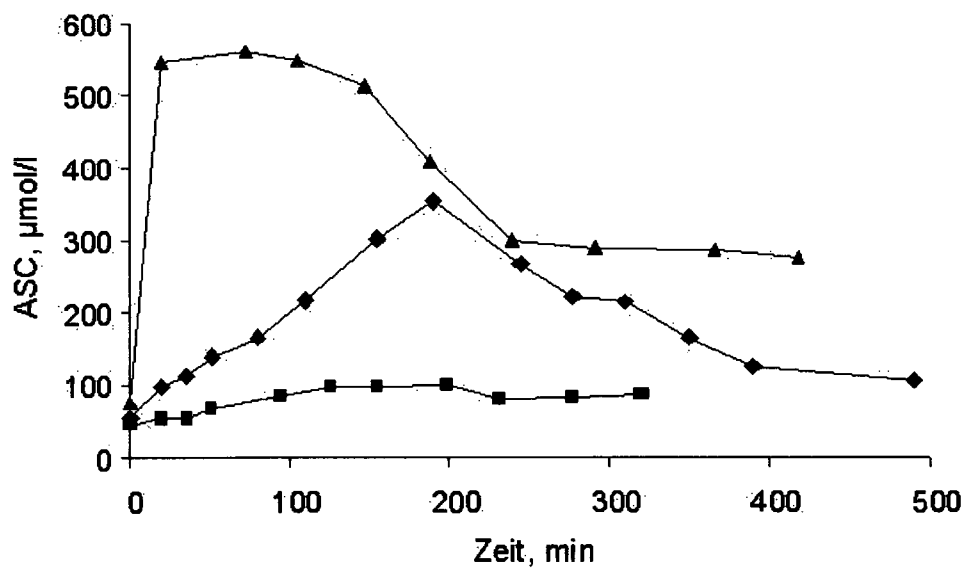
Figur 1.



Figur 2.



Figur 3.



Figur 4.