

VEGETATIVE PHYSIOLOGIE

1. BLUTPHYSIOLOGIE I: NICHT-RESPIRATORISCHE FUNKTIONEN

In diesem Versuchskomplex sind diverse Experimente zusammengefaßt, die zwar jeweils nur wenig Zeit benötigen, jedoch wichtige Teile der Blutphysiologie exemplarisch behandeln und einen umfangreichen theoretischen Hintergrund besitzen. Nachfolgend werden Hinweise gegeben, für deren vertieftes Verständnis Lehrbücher der Physiologie und Biochemie heranzuziehen sind.

1.1 Bildung und Aggregation von Fibrinmonomeren

Hintergrund: Die Blutgerinnung (Koagulation) ist Teil der Blutstillung (Hämostase). Für die Auslösung der Blutgerinnung sind zwei enzymatische Aktivierungskaskaden verantwortlich, das *extravaskuläre* (= extrinsische) *System* (schnell einsetzend, aber mit geringer Kapazität; seine Enzyme = "Faktoren" entstammen teils dem Gewebe) und das *intravaskuläre* (= intrinsische) *System* (langsam einsetzend, aber mit hoher Kapazität; alle seine Faktoren sind im Blutplasma vorhanden). Der terminale Teil beider Kaskaden ist identisch. Ein entscheidender Schritt besteht in der Umwandlung von Prothrombin in das aktive Enzym *Thrombin*, eine Serinprotease.

Thrombin besitzt u.a. drei hier relevante Wirkungen: (1) Einwirkung auf den Thrombocytenpfropf, der durch Aggregation (Agglutination) in der primären Hämostase gebildet wird (im Versuch nicht weiter behandelt, aber wichtig für das Erlangen der vollen Aktivierung des intravaskulären Systems); (2) limitierte Proteolyse des Substrats Fibrinogen; Folge: Bildung von assemblierenden Fibrinmonomeren (Gegenstand dieses Versuchs); (3) Aktivierung des Fibrin-stabilisierenden Faktors (= FSF = Faktor XIII), welcher kovalente Bindungen zwischen den assemblierten, nur durch Wasserstoffbrücken zusammengehaltenen Fibrinmonomeren einführt und dadurch erst die Ausbildung eines mechanisch festen Thrombus ermöglicht (nicht Gegenstand des Versuchs).

Mehrere Faktoren des extra- und des intravaskulären Systems und auch der FSF benötigen für ihre enzymatische Aktivität Ca^{2+} . Dieses erfüllt hier aber keine regulatorische Aufgabe (Ca^{2+}

ist im Blutplasma homöostatisch reguliert und somit nahezu konstant), sondern ist nur für das Funktionieren des aktiven Zentrums erforderlich. Entzug von Ca^{2+} , z.B. durch Komplexbildung mit Citrat, blockiert die Blutgerinnung. Käufliche Präparationen von Thrombin und anderen Plasma-Proteinen enthalten oft gewisse Mengen gebundenen Calciums, so dass ein Nichtzugeben von Ca^{2+} im Experiment nicht ausreicht, sondern ein Chelator benötigt wird.

Die Blutgerinnung steht physiologisch unter einer Begrenzung, die verhindert, dass bereits geringfügige Aktivitäten von Thrombin größere Blutmengen zur Gerinnung bringen. Verantwortlich sind hierfür die Antithrombine III und II, welche Thrombin und Faktoren des intravaskulären Systems inhibieren. Die Assoziation des Proteins Antithrombin III mit dem sauren Kohlenhydrat Heparin führt zur Ausbildung des sehr effektiven Antithrombins II. Heparin wirkt daher als Blutgerinnungshemmer. In kleinen Konzentrationen ist es im Blutplasma nachweisbar; Zugabe in höheren Konzentrationen blockiert die Gerinnung. In sehr hohen Konzentrationen (modellhaft hier im Experiment) kann Heparin das Thrombin auch in Abwesenheit seines Proteinkomplements hemmen.

Experiment: Thrombin baut Fibrinogen zu Fibrinmonomeren ab, die unter Ausbildung von Wasserstoffbrücken assemblieren. Die Vernetzung ist als Trübung photometrisch zu verfolgen, am günstigsten bei 500 nm. Messen Sie den Extinktionsverlauf über jeweils 10 min! Ansätze in Photometerküvetten (Ansatz II erst nach Abschluß der Messung von Ansatz I pipettieren! Plümpern!).

(Angaben in mL)	I	II	III
Fibrinogen, in Tris/HCl pH 7,4	2,0	2,0	2,0
CaCl_2	0,2	—	—
Na-Citrat	—	0,2	—
Heparin	—	—	0,2
Thrombin	0,02	0,02	0,02

Präparieren Sie **eine weitere Küvette gemäß Ansatz I**, um die Trübungszunahme zu beobachten. Verquirlen sie dabei das sich bildende Netzwerk mit dem Rührspatel!

Bedenken Sie bei diesem Versuch, dass Sie keine enzymatische Aktivität messen, sondern einen Vorgang (Assemblierung), **der auf den enzymatischen Prozess folgt!** Dies hat Konsequenzen für den Kurvenverlauf!

1.2 Nachweis und Bedeutung der Catalase in Erythrocyten: Rolle von Eisen bei der Bildung von Hydroxylradikalen in der Fenton-Reaktion

Hintergrund: Catalase, ein H_2O_2 -spaltendes Enzym, ist Bestandteil des antioxidativen Protektionssystems. Unter physiologischen Bedingungen ist die sog. Catalase-Reaktion irrelevant; sie wirkt dann als Peroxidase.

Catalase-Reaktion: $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2 \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$ (ein H_2O_2 -Molekül fungiert als Wasserstoffdonator, das andere als Wasserstoffakzeptor).

Bei physiologischen H_2O_2 -Konzentrationen benutzt die Catalase andere Wasserstoffdonatoren, so dass kein Sauerstoff freigesetzt wird, sondern der jeweilige Donator dehydriert = oxidiert wird. Catalase ist eigentlich eine Hämoperoxidase. Neben dieser spielt bei Wirbeltieren noch Glutathion-Peroxidase eine große Rolle, die sich des reduzierten Glutathions als Wasserstoffdonator bedient. Beide Enzyme, Catalase/Hämoperoxidase und Glutathion-Peroxidase, kommen mit hohen Aktivitäten in Erythrocyten vor. Dies ist ein Hinweis darauf, dass Erythrocyten in besonderem Maße vor oxidativen Schäden geschützt werden müssen.

Warum ist dies so? Hier ist ein Blick auf die Entstehung freier Radikale erforderlich. Freie Radikale sind Verbindungen mit einem ungepaarten Elektron. Ihr Bestreben eine Elektronenpaarung einzugehen macht einige von ihnen zu höchstreaktiven Substanzen, von denen biologische Schäden ausgehen, z.B. Mutagenese, Carcinogenese, Aspekte von Zelltod und im speziellen Neurodegeneration, Gefäßerkrankungen u.a.m. Schon im normalfunktionierenden Organismus entstehen erstaunlich viele freie Sauerstoffradikale. Zum einen nutzt der Organismus solche Substanzen, um Bakterien zu töten (dies tun einige Leukocyten, genauer: Neutrophile Granulocyten, Makrophagen und Monocyten). Eine weitere erhebliche Quelle sind die Mitochondrien, in deren Elektronentransportkette die Elektronenübertragung auf Sauerstoff oft nur unvollständig abläuft. Die Übertragung nur eines Elektrons führt z.B. zum Superoxid-anion, O_2^- , einem moderat reaktiven Radikal. Je nach Stoffwechsellage werden 2 bis 5% des eingeatmeten Sauerstoffs zeitweilig in freie Radikale überführt.

Aufgrund der nur mäßigen Reaktivität des Superoxidanions kann dieses enzymatisch entgiftet werden, und zwar durch die Superoxiddismutasen (SODs). Deren Produkte sind H_2O_2 und O_2 . Die Reaktivität von H_2O_2 ist ebenfalls noch moderat. Diese Substanz permeiert aber leicht durch Membranen und gelangt daher an alle Orte im Organismus. Dies ist deswegen so gefährlich, weil aus dem H_2O_2 ein höchstreaktives Radikal entstehen kann, das enzymatisch nicht beherrschbar ist, das Hydroxylradikal ($\cdot\text{OH}$); aufgrund seiner hohen Reaktivität würde es jegliches aktive Zentrum zerstören! Es geht also darum, es gar nicht erst zur Hydroxylradikal-

bildung kommen zu lassen, sondern, wenn man es selbst nicht enzymatisch entgiften kann, seine Vorstufe zu eliminieren, das H_2O_2 . Dies leisten die Peroxidasen (s.o.).

Warum sind Erythrocyten durch H_2O_2 besonders gefährdet? Sie enthalten komplexiertes Eisen(II) in Form des Häms im Hämoglobin. Dieses geht mit H_2O_2 die sog. Fenton-Reaktion ein:



Abgesehen von der Bildung des gefährlichen und zerstörerischen Hydroxylradikals wird hierbei das Hämoglobin zu Methämoglobin oxidiert (Häm zu Hämin). Methämoglobin bindet praktisch keinen Sauerstoff, sondern vor allem einwertige Anionen (Häm ist ein neutrales Molekül, Hämin ein einwertiges Kation!). Bei Mischen von Blut oder Hämoglobin mit H_2O_2 erkennt man die Oxidation an der braunen Farbe des Hämins.

Das auffälligste Geschehen beim Zusammengeben von Blut und H_2O_2 besteht jedoch in einem Aufschäumen des durch die Catalase gebildeten O_2 . Um diese Reaktion nicht allzu stark ausfallen zu lassen, was leicht zum Überschäumen aus dem Reagenzglas führen würde, soll das Blut vorher verdünnt werden.

Zusätzlich wird das Entstehen und Verhalten von Hämin beachtet. Während bei Mischen von Blut und H_2O_2 nur in bestimmten Teilen des Reagenzglases das braune Hämin deutlich wird, läßt es sich in hitzedenaturiertem Blut sehr gut erkennen. Sobald das Hämoglobin denaturiert, und auch aufgrund der Energiezufuhr beim Erhitzen, wird das Häm-Eisen zu dem ohnehin energetisch begünstigten dreiwertigen Eisen oxidiert. Die Farbe schlägt nach braun um.

Während der Denaturierung von Hämoglobin wird ebenfalls die Catalase denaturiert. Dies zeigt sich am Ausbleiben eines starken Aufschäumens. Dennoch: selbst bei quantitativer Denaturierung der Catalase lassen sich noch als kleiner Schaumkranz Sauerstoffbläschen am oberen Rand der Flüssigkeit erkennen. Dies liegt an einer Befähigung des Hämins zur Katalyse. Man spricht hier von pseudoenzymatischen Reaktionen (Hämin ist eine Pseudoperoxidase bzw. Pseudocatalase).

Experiment 1 (Catalase-Reaktion und Pseudocatalase-Reaktion): 1 mL Blut (mit EDTA als Antikoagulans) wird mit 4 mL aq. dest. verdünnt; etwa die Hälfte hiervon wird in einem Reagenzglas bis zum vollständigen Farbumschlag erhitzt (Denaturieren der Blutproteine; Farbumschlag nach braun wegen Oxidation des Häms zum Hämin) und wieder auf Zimmertemperatur abgekühlt. Zu je 1 mL 3%-iger H_2O_2 -Lösung werden entweder 0,25 mL des verdünnten denaturierten oder 0,25 mL des verdünnten nativen Blutes gegeben.

Experiment 2 (Rolle von Fe^{II} bei der Fenton-Reaktion): Dieser Versuch soll zeigen, dass zweiwertiges Eisen (welches ja komplexiert im Hämoglobin vorliegt) bei Anwesenheit von H₂O₂ Hydroxylradikale erzeugt, Erythrocyten daher in besonderem Maße durch Catalase/Hämoperoxidase und Glutathion-Peroxidase geschützt sein müssen. Als Detektormolekül für entstehende Hydroxylradikale dient hier 4-Nitrophenol. Diese leicht gelb gefärbte Substanz fängt Hydroxylradikale und geht dabei in das intensiv braun gefärbte 4-Nitrocatechol über (wird also hydroxyliert).

Pipettieren Sie in je eine Makroküvette (in angegebener Reihenfolge; nach jedem Schritt mit dem Rührspatel mischen):

Angaben in mL	Kontrolle (ohne Fe ^{II})	Analyse (mit Fe ^{II})
Aq. dest.	0,3 mL	—
FeSO ₄ 20 mM	—	0,3 mL
4-Nitrophenol 3,75 mM	2,4 mL	2,4 mL
H ₂ O ₂ 0,1%	0,3 mL	0,3 mL

Falls gewünscht kann das Produkt 4-Nitrocatechol bei 510 nm photometriert werden. Die macht aber nur dann Sinn, wenn die Messung sofort nach Zugabe des H₂O₂ durchgeführt wird, da die weiterhin entstehenden Hydroxylradikale das Produkt wieder ausbleichen.

1.3 Bestimmung der eigenen Blutgruppe (AB0-System)

Hintergrund: Blutgruppensubstanzen sind Oberflächenoligosaccharide der Erythrocyten-Glykokalyx. Man kennt diverse humane Blutgruppensysteme, von denen aber meist nur das AB0-System und das Rhesus-System zu beachten sind. Beim AB0-System finden sich typischerweise Antikörper gegen blutgruppenfremde Blutgruppensubstanzen im Blutplasma, ein klarer Hinweis darauf, dass sie nicht wirklich gegen Blutgruppensubstanzen gebildet worden sind, denn woher sollte die Immunisierung gegen fremdes Blut herrühren? In Wirklichkeit werden diese Antikörper schon bald nach der Geburt gegen bakterielle Oligosaccharide gebildet, deren terminale Abschnitte denen der Blutgruppensubstanzen ähneln können. Mit eigenen Blutgruppensubstanzen interferierende Antikörper werden nicht gebildet (Immuntoleranz! Apoptose der hierfür kompetenten Lymphocyten); Antikörper, die nicht interferieren, kann sich der Organismus hingegen leisten.

Die Antikörper gegen Blutgruppensubstanzen gehören in die Klasse der Immunglobuline M (IgM), besitzen also pro Partikel 10 Antigenbindungsstellen. Daher vermögen sie leicht Erythrocyten der fraglichen Blutgruppe zu agglutinieren (= verkleben), denn jedes dieser IgM-Partikel kann zwei Erythrocyten miteinander vernetzen. Die Agglutination dient als Nachweis.

Experiment: Dieser Versuch wird nur bei freiwilligen Probanden durchgeführt.
Besondere Sicherheitshinweise: Achten Sie bei diesem Versuch darauf, dass alle Gegenstände, die mit menschlichem Blut in Berührung gekommen sind (Lanzette, Plümper, Objektträger) sofort entsorgt werden, dass Lanzette und Plümper überhaupt nicht auf den Tisch gelegt werden und jeglicher Kontakt anderer Personen mit dem Blut vermieden wird! Ggf. (z.B. Tischfläche) sofort mit Spray desinfizieren.

Auf einen sauberen Objektträger werden getrennt nebeneinander je ein Tropfen der Testseren Anti-A und Anti-B gegeben. Aus der mit Desinfektionsspray desinfizierten Fingerbeere (vorzugsweise Ring- oder kleiner Finger; alternativ: Ohrläppchen) einer Versuchsperson wird mit Hilfe einer sterilen Lanzette ein wenig Blut entnommen. In jeden der beiden Tropfen der Testseren wird eine kleine Menge Blut eingebracht, dieses mit Hilfe eines Rührspatels vermischt und der Objektträger vorsichtig geschwenkt, ohne dass die beiden Tropfen zusammenfließen. Ggf. tritt eine Agglutination der Erythrocyten ein.

2. BLUTPHYSIOLOGIE II (ATEMFUNKTION)

2.1 Liganden des Hämoglobins und Oxidation von Hämoglobin

Hintergrund: Die Liganden des Hämoglobins, die entweder direkt an das Häm-Eisen binden oder die Bindung anderer Liganden an das Häm-Eisen beeinflussen, verändern seine Absorptionseigenschaften, weil sie die Verteilung der delokalisierten Elektronen verändern. Die Absorptionsspektren lassen sich also Rückschlüsse auf die Liganden zu. Sehr weitgehende Änderungen treten bei der Oxidation des Häms auf (Häm zu Hämin; Hämoglobin zu Methämoglobin).

Der erste Versuch dient ferner dazu, einen spektralen Unterschied zwischen oxygeniertem und desoxygeniertem Hämoglobin zu erkennen, so dass sich auch Konformationsänderungen nachweisen lassen, die die Sauerstoffaffinität allosterisch beeinflussen.

Experimente:

Einige mL EDTA-Blut werden

- a) mit Luft geschüttelt,
- b) mit einigen Körnchen Kaliumhexacyanoferrat(III) versetzt,
- c) mit CO durchströmt (Abzug!),
- d) mit einigen Körnchen Natriumdithionit versetzt.

Beachten Sie die auftretenden Farbänderungen!

e) Einige mL EDTA-Blut werden zunächst durch Schütteln an der Luft oxygeniert. Dann wird das Reagenzglas an eine Wasserstrahlpumpe angeschlossen und damit der O_2 -Partialdruck vermindert (am Ende des Versuchs erst das Vakuum aufheben, dann die Pumpe abstellen!).

Die Versuche a und d werden mit einem dünnen Hämolysat wiederholt. Geben Sie zu 50 mL einer 0,4%-igen Ammoniak-Lösung tropfenweise soviel Blut, bis die Extinktion des Hämolysats (gegen Wasser) bei 450 nm etwa 1,0 beträgt. Messen Sie dann die Extinktion der Proben gegen Wasser bei 640 nm!

2.2 Photometrischer Nachweis des Bohr-Effektes

Hintergrund: Hämoglobin ist (im Gegensatz zum sonst ähnlichen Myoglobin) ein allosterisches Protein. Seine R-Konformation besitzt eine hohe Affinität zu O_2 , jedoch niedrige Affinitäten zu H^+ und CO_2 . Umgekehrt hat die T-Konformation eine niedrige Affinität zu O_2 , jedoch hohe Affinitäten für H^+ und CO_2 . Vor allem H^+ begünstigt die Ausbildung der T-Konformation; daher bewirkt ein Absenken des pH eine Verminderung der O_2 -Affinität. Dies stellt den protonenabhängigen Teil des sog. Bohr-Effektes dar. Die Bohr-Protonen binden vor allem an einen Stickstoff des Histidins-146; in der T-Konformation ist das protonierte Histidin durch eine Salzbrücke mit dem Aspartat-94 stabilisiert; hieraus ergibt sich übrigens auch ein pK-Wert im physiologischen pH-Bereich, so dass die Anlagerung und Abspaltung von Bohr-Protonen erst physiologisch relevant sein kann.

Der Versuch zeigt die pH-Abhängigkeit der Sauerstoffbindung, demonstriert anhand der Extinktionsunterschiede zwischen oxygeniertem und desoxygeniertem Hämoglobin.

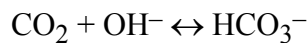
Dieser Versuch gelingt nur, wenn das Blut nicht von vornherein zu sehr oxygeniert ist. Ein hoher Sauerstoffpartialdruck erzwingt im gesamten hier untersuchten pH-Bereich eine Sauerstoffsättigung! Also nicht das Blut zuvor durch Schütteln oxygenieren!!!

Experiment: 1 mL Blut wird mit 2 mL gesättigter Digitonin-Lösung gut gemischt (**Digitonin ist toxisch! Vorsicht beim Umgang!**). Falls Trübungen vorhanden, ggf. zentrifugieren (Tischzentrifuge, höchste Stufe, 10 min). Es werden je 0,3 mL Hämolysat in Photometerküvetten pipettiert. Dann werden in die Küvetten jeweils 2 mL Puffer verschiedenen pH-Wertes (6,5; 7,0; 7,5; 8,0; 8,5) gegeben. Nach gutem Mischen (Rührspatel!) werden die Proben dann bei 640 nm gegen Luft im Spektralphotometer gemessen.

Warum ist eine Messung bei 640 nm sinnvoll? Welche Abhängigkeit der Extinktion vom pH-Wert können Sie feststellen? Welche Interpretation ergibt sich im Sinne der Allosterie?

2.3 Nachweis von Carbanhydratase in Erythrocyten

Hintergrund: Carbanhydratase (= Carboanhydrase = Carboanhydratase) ist ein zelluläres Enzym, das auch z.B. in Magen, Pankreas und Leber von hoher physiologischer Bedeutung ist. In den Erythrocyten ist seine Rolle besonders deswegen wichtig, weil es das Gleichgewicht zwischen CO₂ und Bicarbonat (HCO₃⁻) sehr schnell einzustellen vermag. (Anm.: in den meisten Lehrbüchern steht, dass CO₂ mit Wasser zu Kohlensäure umgesetzt werde. Man weiß aber schon lange, dass die Carbanhydratase in Wirklichkeit CO₂ mit OH⁻-Ionen umsetzt.) Die Reaktionsgleichung lautet:



Die Carbanhydratase stellt das Gleichgewicht sehr schnell ein. Im Blut, das CO₂-produzierendes Gewebe durchströmt, führt dies zur Bicarbonat-Bildung, in der Lunge zur Rückbildung von CO₂. Das Gleichgewicht zwischen CO₂ und Bicarbonat stellt sich auch nicht-enzymatisch als anorganische Reaktion relativ rasch ein. Warum also extra ein Enzym hierfür? Die Bedeutung liegt in der noch weiteren Beschleunigung des Prozesses. Die Carbanhydratase ist ein Enzym mit allerhöchster Wechselzahl! Da HCO₃⁻ aufgrund seiner Ladung gut wasserlöslich ist, CO₂ jedoch als relativ apolare Substanz nicht, kommt es also auf die Geschwindigkeit an, mit der Bicarbonat gebildet wird. Das Enzym ist somit für die hohe Aufnahmekapazität des Blutes für CO₂ verantwortlich!

Im Experiment muss das in den Erythrocyten befindliche Enzym (a) aus den Zellen herausgeholt und (b) vom Hämoglobin befreit werden. Für ersteres wird Chloroform verwendet (Lipidlösemittel; löst die Erythrocyten-Membran auf), für letzteres wird Ethanol zugegeben (fraktionierte Fällung: Hb fällt, Carbanhydratase bleibt in Lösung). Dennoch: aus Gründen des praktischen Gelingens unbedingt die Reihenfolge der Zugabe der Zugabe beachten (erst Ethanol, dann Chloroform! Für die fraktionierte Fällung sind die korrekten Volumenverhältnisse essentiell!).

Experiment: Setzen Sie für diesen Versuch 2 Parallelen an: Je 6 mL EDTA-Blut werden in einer Tischzentrifuge 10 min lang zentrifugiert. Das überstehende Blutplasma wird vorsichtig mit einer Pasteur-Pipette abgesaugt (stellen Sie die **Zentrifugenröhrchen hierzu in den Ständer**, da sonst das Sediment leicht aufgewirbelt wird!). Das Erythrocyten-Sediment wird in 5 mL 0,9%-iger NaCl-Lösung resuspendiert (Glasstab) und nochmals 10 min zentrifugiert. Der Überstand wird vorsichtig abgesaugt. Die gewaschenen Erythrocyten werden mit 2,5 mL einer 40%-igen Ethanol-Lösung vermischt und danach mit 1 mL Chloroform versetzt (**Abzug! Chloroform-Flasche nach Gebrauch**

sofort schließen!). Das Gemisch wird mit dem Glasstab 2 – 3 min kräftig gerührt, wobei ein Teil der Proteine ausfällt, insbesondere das Hämoglobin. Die gegenüber dieser Behandlung unempfindliche Carbanhydratase bleibt in Lösung. Das Gemisch wird 10 min zentrifugiert. Der alkoholische Überstand enthält die Carbanhydratase. Er wird vorsichtig abpipettiert und im Eisbad aufbewahrt.

Der Nachweis der Carbanhydratase-Reaktion wird im Eisbad durchgeführt, um zeitliche Unterschiede zu verlängern. Setzen Sie 2 Röhrchen an, eines für das Carbanhydratase-haltige Reaktionsgemisch, ein weiteres als Kontrolle (die von der Carbanhydratase katalysierte Reaktion kann auch nicht-enzymatisch, als rein anorganische Reaktion ablaufen, wenn auch mit niedrigerer Umsatzrate! s.o!). Geben Sie nacheinander in die Röhrchen: 1 mL Phenolrot-Lösung, 0,5 mL Hydrogencarbonat-Puffer, pH 10, und 0,1 mL des Carbanhydratase-haltigen Überstandes **oder** 0,1 mL aq. dest. Geben Sie hiernach 3 mL eiskaltes Mineralwasser hinzu (**auf schnelles Pipettieren und gute, sofortige Durchmischung achten!**) und bestimmen Sie die ungefähre Zeit vom Zupipettieren des Mineralwassers bis zum Farbumschlag nach gelb.

3. HORMONALE UND METABOLISCHE REGULATION DER GLUCOSE-PRODUKTION: AKTIVIERUNG DER PHOSPHORYLASE B

Hintergrund: Viele Proteine, deren biologische Funktion durch verschiedene Signale angesteuert wird, stehen unter der Kontrolle von Aktivierungskaskaden. Der funktionelle Sinn einer aus mehreren Schritten bestehenden Kaskade besteht üblicherweise darin, dass unterschiedliche regulatorische Eingänge auf ihren verschiedenen Stufen möglich sind. Am Beginn der Kaskade steht oft ein Aktivierungsschritt durch einen second messenger.

In diesem Versuch wird ein klassischer Fall bearbeitet, bei dem (1) am Beginn der Kaskade der second messenger cAMP ein Enzym aktiviert und (2) jeder folgende Schritt der Kaskade einen eigenen Regulationsmechanismus erlaubt. Das anzusteuende Enzym ist die Glykogen-Phosphorylase (kurz: Phosphorylase). Es spaltet aus Glykogen durch Aufnahme von anorganischem Phosphat Glucose-1-Phosphat ab (Phosphorolyse!).

Das Enzym ist durch zwei Prinzipien von Regulationsmechanismen aktivierbar: (1) durch sog. kovalente Kontrolle (d.h. durch enzymatische Modifikation des Proteins; hier: Phosphorylierung); (2) durch allosterische Kontrolle (d.h. durch frei assoziierbare und dissoziierbare Liganden). In beiden Fällen wird die Konformation des Proteins durch Ligandenbindung verändert.

Die drei Stufen der Kaskade:

1. Proteinkinase A (= PK A; in der inaktiven Form $R_2 \cdot C_2$; R für regulatorische Untereinheit; C für katalytische Untereinheit; die Aktivierung erfolgt durch cAMP; es bildet sich $R_2 \cdot 4 \text{ cAMP}$, welches sich von den C-Untereinheiten ablöst; die aktive Form ist C);
2. Phosphorylase-Kinase (reguliert durch entweder PK A oder Ca^{2+} ; PK A bewirkt durch Phosphorylierung eine Aktivierung; Ca^{2+} bindet an Calmodulin (= CaM), welches als Untereinheit der vollständigen Phosphorylase-Kinase zugehört; Ca/CaM bewirkt ebenfalls eine Aktivierung; das phosphorylierte Enzym heißt Phosphorylase-Kinase a, das nicht-phosphorylierte Phosphorylase-Kinase b);
3. Phosphorylase (reguliert entweder durch Phosphorylase-Kinase oder durch 5'-AMP; die Phosphorylase-Kinase – entweder als Phosphorylase-Kinase a oder als Ca/CaM-Phosphorylase-Kinase b – wirkt aktivierend durch Phosphorylierung; 5'-AMP, ein Signal des ATP-Mangels aktiviert auf allosterischem Wege. Die phosphorylierte Phosphorylase heißt Phosphorylase a, die nicht-phosphorylierte Phosphorylase b).

Die drei Eingänge, cAMP, Ca^{2+} und 5'-AMP reflektieren drei unterschiedliche Situationen, in denen durch Glykogen-Abbau Glucose-Einheiten zur Verfügung gestellt werden sollen.

cAMP: ein Signal in Reaktion auf Stimuli durch Hormone oder Neurotransmitter; Ca^{2+} : ein Ion, das im Cytoplasma nach Stimulierungen der Zelle/eines Syncytiums erhöht ist und den erhöhten Energiebedarf infolge starker Stimulierung signalisiert (bes. wichtig im Muskel: Ca^{2+} -Einstrom für Ansteuerung der Kontraktion löst zugleich Mobilisierung von Glucose-Einheiten für Energiegewinnung aus); 5'-AMP ist ein generelles intrazelluläres Signal für ATP-Mangel, das sinnvollerweise den Glykogen-Abbau für Zwecke der Energiegewinnung auslöst.

In diesem Versuch werden verglichen: **(1)** die basale Aktivität der Phosphorylase b (käufliche Präparate von dieser sind nicht völlig inaktiv, sondern nur weniger aktiv als die der Phosphorylase a); **(2)** die allosterisch durch 5'-AMP aktivierte Phosphorylase b; **(3)** die durch die cAMP-abhängige Aktivierungskaskade aktivierte Phosphorylase (= Phosphorylase a); **(4)** die über Ca^{2+} -Stimulation der Phosphorylase-Kinase aktivierte Phosphorylase (= Phosphorylase a).

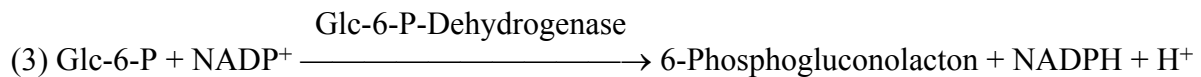
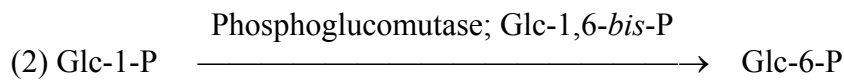
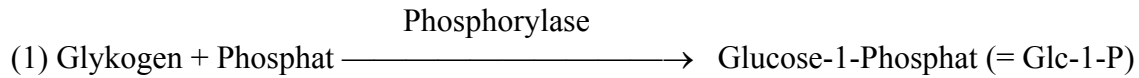
a) *Inkubation zur Aktivierung der Phosphorylase b durch die cAMP-abhängige Kaskade bzw. durch Ca^{2+} (Ansätze in Eppendorf-Reaktionsgefäßen):*

Pipettierschema (μL)			
	Ansatz A	Ansatz B	Ansatz C
Puffer pH 7,0	170	130	130
Phosphorylase b	20	20	20
Proteinkinase A	20	20	20
Phosphorylase-Kinase	20	20	20
cAMP	—	20	—
ATP	—	20	20
CaCl_2	—	—	20
Ansätze gut mischen und 20 min bei Raumtemperatur stehenlassen!			

Während der Inkubation der Ansätze werden 4 Photometerküvetten für die Messung der Phosphorylase-Aktivität vorbereitet:

b) *Messung der Phosphorylase-Aktivität:*

Prinzip der Messung:



Pipettierschema (μL); Ansätze in 1-mL-Photometerküvetten; Reihenfolge beachten!

	Testküvette			
	1	2	3	4
K-Phosphat-Puffer pH 6,8	770	770	770	770
EDTA pH 6,8	20	20	20	—
Glykogen	30	30	30	30
NADP ⁺	30	30	30	30
Glucose-1,6- <i>bis</i> -Phosphat	20	20	20	20
MgCl ₂	15	15	15	15
Phosphoglucomutase	15	15	15	15
Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase	20	20	20	20
5'-AMP	—	30	—	—
H ₂ O	30	—	30	50
Inkubationsgemisch aus Ansatz A	50	50	—	—
Inkubationsgemisch aus Ansatz B	—	—	50	—
Inkubationsgemisch aus Ansatz C	—	—	—	50

Die Reaktion wird demnach durch Zugabe des Phosphorylase-haltigen Inkubationsgemischs A, B oder C gestartet. Nach Zugabe desselben werden die Inhalte der Testküvetten schnell und gründlich gemischt. Die Extinktion der Proben wird bei 340 nm im Photometer gegen H₂O in Minutenabständen gemessen. Die Testküvetten 1, 2, 3 und 4 sind zweckmäßigerweise **nacheinander** zu messen.

Tragen Sie die gemessenen Extinktionen gegen die Zeit auf (Grafik)! Wie verändern sich die Extinktionen der Proben? Erklären Sie die Unterschiede!

4. HERZFREQUENZ UND BLUTDRUCK BEIM MENSCHEN MIT UND OHNE BELASTUNG

In diesem Versuch werden verschiedene Aspekte der Kreislaufphysiologie beleuchtet. Dies betrifft den systolischen und diastolischen Blutdruck, die Pulsrate in ihrer Abhängigkeit von physischer Leistung (PWC-Bestimmung) sowie die physiologischen und anatomische Grundlagen.

4.1 Blutdruckmessung in Ruhe nach Riva-Rocci

Prinzipiell kann der Blutdruck durch eine direkte Methode gemessen werden, bei der eine mit einem Manometer verbundene Kanüle in das Gefäß eingeführt wird. Weitaus größere praktische Bedeutung besitzt dagegen die indirekte Methode nach Riva-Rocci. Dazu wird um das obere Drittel des linken Oberarms eine aufblasbare, außen durch eine Leinwandaufgabe unelastische Armmanschette gelegt. Die Weite der unaufgeblasenen Manschette wird dem Arm so angepasst, dass sie rutschfrei, aber locker sitzt. Die Manschette ist mit einem Hg-Manometer und einem mit einem Ventil versehenen Blaseball verbunden ("Sphygmometer"). Die Manschette wird jetzt soweit aufgeblasen, bis die A. brachialis komprimiert wird; es ist jetzt an der A. radialis kein Puls mehr zu fühlen (Palpationsmethode). Wenn der Puls gerade eben nicht mehr zu fühlen ist, d.h. der Außendruck den höchsten Innendruck der Pulswelle nur um ein wenig übersteigt, erhalten wir einen Wert, der fast mit dem systolischen arteriellen Druck übereinstimmt.

Der Palpation wird im allgemeinen die sog. "auskultatorische" Methode mit Hilfe eines Stethoskops vorgezogen. Das Stethoskop wird in der Ellenbeuge über der A. brachialis aufgesetzt. Der Manschettendruck wird leicht über den systolischen Druck erhöht und dann langsam gesenkt, bis systolischer Druck und Manschettendruck sich die Waage halten. Dieser Moment ist im Stethoskop als blasendes, klopfendes Geräusch hörbar (Korotkoffsches Geräusch). Mit weiter absinkendem Manschettendruck wird das Geräusch zunächst lauter, nimmt dann ab, bis es schließlich bei Erreichen und Unterschreiten des diastolischen Drucks verschwindet.

Schließlich läßt sich der Blutdruck auch gut an den Schwankungen der Hg-Säule im Manometer feststellen. Bei Überschreiten des systolischen Drucks schwankt die Hg-Säule nicht mehr mit dem Puls mit (Abklemmen der A. brachialis). Wenn bei Nachlassen des Manschettendrucks die Hg-Säule gerade wieder anfängt rhythmisch zu schwanken, ist der systolische Druck ungefähr erreicht (bzw. leicht unterschritten). Bei weiterer Entspannung der

Manschette werden die Schwankungen der Hg-Säule zunächst stärker und verschwinden bei Erreichen des diastolischen Drucks recht plötzlich wieder (warum?).

Messen Sie den systolischen und den diastolischen arteriellen Druck mit Hilfe der drei angegebenen indirekten Methoden! Eine weitere Möglichkeit besteht in der Verwendung eines automatischen Blutdruckmessgeräts (s.u.).

4.2 Ergometrische Untersuchungen des Kreislaufs beim Menschen

In diesem Versuch werden Pulsfrequenz und Blutdruck in Abhängigkeit von der Leistung bei Arbeit am Ergometer untersucht. Um Unfälle zu vermeiden, sei auf einige **Kontraindikationen** hingewiesen. Personen mit Herzerkrankungen aller Art, mit akuten Infektionen oder Verdacht auf cerebrovaskuläre Durchblutungsstörungen sollten sich nicht als Probanden zur Verfügung stellen! Außerdem wird der Test **abgebrochen**, wenn folgende Symptome oder Zustände auftreten: Erschöpfung, Schwächegefühl, Atembeschwerden, Anfänge einer Bewußtseinstäubung, Schmerzen in der Brust, Rhythmusanomalien (insbesondere Arrhythmien/Extrasystolen), Überschreiten des systolischen Drucks von 230 mm Hg bzw. des diastolischen von 120 mm Hg, einer systolischen Drucksteigerung von 120 mm gegenüber dem Ruhewert, einer systolisch-diastolischen Druckdifferenz über 120 mm Hg, bei einem mangelnden Anstieg von Herzfrequenz oder Blutdruck bei zunehmender Belastung oder bei Abnahme des Blutdrucks bei gleichbleibender oder zunehmender Belastung.

Seien Sie sich bewußt, dass körperliche Belastungen vor dem Test, Konsum von Genussmitteln oder größeren Nahrungsmengen das Ergebnis beeinflussen. Wenn Sie also an der Ermittlung eines einigermaßen realistischen Wertes Ihrer physischen Arbeitskapazität interessiert sind, sollten Sie folgendes beachten: Vermeiden Sie unnötige Anstrengungen vor dem Test, größere Anstrengungen auch am Tag vorher; vermeiden Sie den Genuss von Kaffee, Tee und Zigaretten am Versuchstag; nehmen Sie vor dem Test keine größere Mahlzeit zu sich.

Im Versuch wird der Blutdruck mit einem automatischen Messgerät registriert (Erklärung durch Assistenten). Das Messprinzip ist indirekt, ähnlich wie bei Riva-Rocci. Diskutieren Sie, warum unter Ergometrie-Bedingungen die automatische Blutdruckmessung mit Fehlern behaftet ist. Es macht daher nur Sinn, den Blutdruck z.B. vor Beginn der Ergometrie und dann nach einer Belastungsstufe zu messen.

Die Pulsfrequenz wird über einen Pulsmesser mit Sensorklemme bestimmt (Erklärung durch Assistenten).

Die Leistungsmessung erfolgt mit Hilfe eines Fahrradergometers, an dem die Leistung (in Watt) eingestellt werden kann. Ermittelt werden soll die sog. Arbeitskapazität (= PWC = physical working capacity), d.h. die zu einer bestimmten Herzfrequenz gehörige Leistung (PWC₁₇₀ bedeutet z.B. die Leistung in Watt, die bei einer Herzfrequenz von 170 Schlägen/min erbracht wird).

Durchführung des Versuchs:

- a) Setzen Sie sich, ohne zu treten, ruhig auf das Ergometer und lassen Sie Ruhepuls und -druck (systolisch/diastolisch) bestimmen. Nehmen Sie sich hierfür wenigstens 3 min Zeit.

- b) Als erste Belastungsstufe wird eine Leistung eingestellt, bei der Sie einen Puls von ca. 120 bis 140 min⁻¹ beim Treten erreichen. Je nach Körpergröße und Kondition wird diese zwischen 50 und 100 Watt liegen. Die Messung dauert 5 min; ermitteln Sie für jede Minute einen Wert für die Herzfrequenz und am Ende der Belastungsstufe den Blutdruck!

- c) Als nächstes wird die Leistung von Minute zu Minute um 25 Watt gesteigert. Je nach Befinden des Probanden kann die Belastung bis zu einer Pulsfrequenz von 170 min⁻¹ angehoben werden (keinen falschen Ehrgeiz bitte!). Diese dritte Untersuchungsphase sollte nicht länger als 5 min dauern. Am Ende erneut den Blutdruck messen!

- d) Nach dem Ende der Belastung sollten Sie bei leichter Beinarbeit auf dem Ergometer verbleiben, bis sich die Pulsfrequenz normalisiert hat. Verlangsamen Sie nach und nach die Tretbewegungen. Das langsame Abklingenlassen der Belastung ist für den Kreislauf verträglicher als ein abruptes Aufhören.

Erstellen Sie folgendes Protokoll:

1. Allgemeine Angaben (Alter, Geschlecht, Gewicht, Uhrzeit, seit der letzten größeren Mahlzeit vergangene Zeit, Nichtraucher/Raucher, ggf. Zigaretten/Tag, subjektives Befinden, sportliche Betätigungen).

2. Auswertung der Messergebnisse. Tragen Sie die gemessenen Herzfrequenzen und Blutdrücke (systolisch/diastolisch) für die jeweiligen Minuten der Untersuchung in eine Tabelle ein! Tragen Sie die Werte der Herzfrequenz gegen die Leistung auf! Ermitteln Sie, ggf. durch Extrapolation, den PWC₁₇₀ (Erstellen einer Grafik)!

4.3 Anatomie des Säugerherzens

Beschäftigen Sie sich anhand eines Herzmodells mit der Anatomie dieses Organs. Beachten Sie dabei insbesondere die Position der Veneneintritte und Arterienaustritte, die verschiedenen Herzklappen und die Elemente des Erregungsleitungssystems. Diskutieren Sie in diesem Zusammenhang den Ablauf der Erregungsausbreitung und des Erregungsabbaus sowie deren Auswirkungen auf das EKG!

5. Wirkung und Aktivierung von Verdauungsenzymen

Es werden die wichtigsten Klassen von Verdauungsenzymen – Lipasen, Proteasen, Carbohydrasen – nachgewiesen. Alle extrazellulären Verdauungsenzyme sind Hydrolasen. Lipase kann schon aus diesem Grunde nur an der Lipidoberfläche wirksam werden; Emulgierung ist Voraussetzung für effektive Enzymaktivität (große Oberfläche) und, außerdem, für gute Resorbierbarkeit. "Ziel" der Fettverdauung ist *nicht* der komplette Abbau aller Fettmoleküle, sondern eine gute Resorbierbarkeit; hierfür reicht eine Micellenbildung aus. In den Micellen sind auch unverdaute Fettmoleküle enthalten. Proteasen bedürfen spezieller Aktivierungsmechanismen, um in den sie sezernierenden Zellen einen Schutz vor Selbstverdauung zu gewährleisten. Extrazelluläre Verdauungsenzyme werden zumeist durch limitierte Proteolyse von Proenzymen (= Zymogenen) aktiviert. Sie lassen sich hernach nur noch durch Zerstörung inaktivieren und dann nicht ein weiteres Mal aktivieren (Unterschied zu kovalenter und zu allosterischer Kontrolle!). Der Schutz vor Selbstverdauung durch Bildung von Proenzymen reicht bei Proteasen wie Trypsin und Chymotrypsin nicht aus, weil deren Proenzyme zwar *relativ* inaktiv sind, aber nicht *völlig*. Außerdem gibt es im Falle des Trypsins einen autokatalytischen Aktivierungsmechanismus, der zu einer lawinenartigen Aktivierung schon in der Zelle führen würde, sobald nur ein einziges Proenzymmolekül (Trypsinogen) ein anderes in Trypsin umwandeln würde. Dies wird durch einen Trypsin-Inhibitor verhindert, ein Peptid vom Cystinknoten-Miniprotein-Typ.

5.1 Nachweis von Enzymaktivitäten in einem Pankreasextrakt

a) *Lipase*

In einem Reagenzglas werden 5 Tropfen Öl in 2,5 mL Ethanol unter Erwärmen gelöst. Die Lösung wird mit 2,5 mL Wasser vermischt. Es entsteht eine Emulsion. Hierzu werden 5 mL eines 0,5%-igen Pankreasextrakts pipettiert. Der pH des Gemischs wird durch tropfenweise Zugabe 2%-iger Na_2CO_3 -Lösung auf pH 8,5 eingestellt (mit Hilfe von pH-Stäbchen). Das Reagenzglas wird bei 37°C im Wasserbad inkubiert und die Veränderung des pH-Wertes etwa 1 Stunde lang verfolgt.

b) *Proteasen*

5 mL einer Ca^{2+} -haltigen (20 mM) 5%-igen Albumin-Lösung werden mit 5 mL eines 0,5%-igen Pankreasextrakts gemischt und der pH durch Zutropfen einer 2%-igen Na_2CO_3 -Lösung auf pH 8,5 eingestellt (vgl. oben). Das Gemisch wird bei 37°C im Wasserbad inkubiert und die Veränderung des pH-Wertes 1 Stunde lang verfolgt.

c) *Amylase*

5 mL einer Stärkelösung (0,2 mg/mL) werden mit 1 Tropfen einer Jod/Jodkalium-Lösung und 5 mL eines 0,5%-igen Pankreasextrakts versetzt (Reihenfolge beachten!). Erklären Sie die auftretende Farbänderung!

5.2 Aktivierung von Trypsinogen durch Enteropeptidase

Tricks des Versuchs: Trypsin benötigt Ca^{2+} -Ionen für seine Aktivität, Enteropeptidase dagegen nicht. Enteropeptidase besitzt einen breiteren pH-Bereich der Aktivität als Trypsin, obwohl die pH-Optima nicht allzu verschieden sind. Daher lässt sich die Enteropeptidase-Wirkung bei unterdrückter Trypsin-Aktivität verfolgen (Ca^{2+} -Komplexierung durch Citrat, niedriger pH). Es findet also keine Autokatalyse statt! Die Messung der Trypsin-Aktivität erfolgt dann im schwach alkalischen Bereich in Gegenwart von Ca^{2+} . Auch hier ist die Autokatalyse stark gehemmt, weil das Kunstsubstrat, Benzoylarginin-p-nitroanilid, in höherer Konzentration als Trypsinogen vorliegt und daher erfolgreich mit dem Proenzym kompetiert.

a) *Vorbereitung der Trypsin-Messungen*

Zur Messung der Aktivität des durch die Enteropeptidase gebildeten Trypsins werden zunächst in insgesamt 7 Photometerküvetten jeweils 2,5 mL Ca^{2+} -haltiger Tris-Puffer (pH 8,0) und 0,2 mL Benzoylarginin-p-nitroanilid (in Dimethylformamid) pipettiert und miteinander vermischt.

b) *Inkubation des Trypsinogens mit Enteropeptidase*

In einem Reagenzglas werden 1 mL Trypsinogen-Lösung (1 mg/mL Citratpuffer pH 5,8) und 1 mL Enteropeptidase-Lösung (0,65 mg/mL Citratpuffer pH 5,8) gründlich gemischt. **Sofort nach dem Mischen und dann in Abständen von 10 min** (insgesamt 6-mal) wird eine Probe von 0,2 mL dem Gemisch entnommen und in eine der vorbereiteten Photometerküvetten pipettiert.

c) *Messung der Trypsin-Aktivität*

Der Inhalt der Küvette wird sofort gründlich gemischt und **unverzüglich** im Photometer bei 405 nm gegen Luft gemessen. Eine 2. Ablesung **derselben** Küvette erfolgt nach genau 10 min. Die Differenz der beiden Extinktionen ist ein Maß für die Aktivität des gebildeten Trypsins. Wie verändert sich die Trypsin-Aktivität in Abhängigkeit von der Zeit der Inkubation des Aktivierungsgemischs (Auftragung der Messergebnisse als Grafik)?

5.3 Wirkung von Trypsin-Inhibitor

2,5 mL Ca²⁺-haltiger Tris-Puffer (pH 8,0), 0,2 mL aq. dest., 0,2 mL Trypsin-Lösung (1 mg/mL) und 0,2 mL Benzoylarginin-p-nitroanilid (in Dimethylformamid) werden in eine Photometerküvette pipettiert. Die Extinktion wird **sofort** nach dem gründlichen Durchmischen und **nochmals** nach Ablauf von 10 min gemessen. In einem zweiten Ansatz werden die 0,2 mL aq. dest. durch 0,2 mL Trypsin-Inhibitor-Lösung (2 mg/mL) ersetzt.

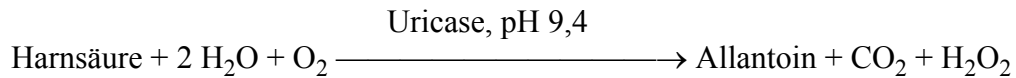
6. UNTERSUCHUNG VON HARN

Hintergrund: Harnbildung dient der Osmoregulation einschließlich isoionischer Homöostase sowie der Eliminierung harnpflichtiger Substanzen. Solche Exkretstoffe können stickstoffhaltig sein oder auch keinen Stickstoff enthalten. In letzterem Fall handelt es sich insbesondere um Konjugate von Hormonmetaboliten, Nahrungsbestandteilen oder auch Xenobiotika (etwa von Medikamenten). Unter den N-haltigen Exkretstoffen sind solche zu unterscheiden, die quantitativ bedeutend sind, und anderen, die nur in Spuren auftreten. In letzterem Fall handelt es sich typischerweise um Metabolite v.a. aromatischer Aminosäuren; auch diese Substanzen sind unbedingt harnpflichtig und Defizite in der Ausscheidung führen zu Vergiftungen. Quantitativ bedeutend sind Harnstoff, Harnsäure (beim Menschen; bei den meisten Säugern stattdessen Allantoin), Creatinin und Ammonium-Ionen. Wegen der hohen Toxizität sind Ammonium-Ionen im Blut nur in geringer Konzentration enthalten; nahezu alle Ammonium-Ionen, die im Harn zu finden sind, stammen daher aus der Niere selbst. Bei Säugern enthält der Harnstoff den Stickstoff aus dem Stoffwechsel von Aminosäuren und Pyrimidinbasen, die Harnsäure bzw. das Alloantoin den Stickstoff aus den Purinbasen (Harnsäure ist selber ein Purin!). Creatinin entsteht durch nichtenzymatische Zyklisierung unter Phosphatabspaltung aus Creatinphosphat. Letzteres ist eine energiereiche Verbindung, die im Muskel, auch Herzmuskel, mit ADP im Gleichgewicht zu ATP und Creatin steht (beachten Sie: Creatin ist nicht Creatinin!) und daher bei Bedarf ATP rasch nachliefern kann. Die ausgeschiedene Creatinin-Menge steht somit bei Gesunden in Relation zur Muskelmasse.

Konzentration und ionale Zusammensetzung des Harns unterliegen hormonalen Regulationsmechanismen. Zu nennen wären hier insbesondere folgende Hormone: Adiuretin (= Vasopressin = ADH), Angiotensin II, Aldosteron, Atriales Natriuretisches Peptid (= ANP = Atrialer Natriuretischer Faktor), Parathormon und Calcitonin. Flüssigkeitsaufnahme, Natrium-Gehalt und entsprechend das Blutvolumen sowie hiervon abhängende Blutdruckänderungen, Calcium- und Phosphataufnahme wirken sich über die Hormone auf die Harnzusammensetzung aus. Außerdem bestehen große tagesperiodische Unterschiede in der Harnbildung; in der Nacht sollte beim Menschen die Harnbildung tunlichst nicht zu hoch sein. Am Morgen wird dies dann sozusagen "nachgeholt". Somit ist ein Morgenharn von einem Abendharn und einem 24-Std.-Harn verschieden. Lehrbuchangaben beziehen sich meist auf 24-Std.-Harn. Bedenken Sie ferner bei der Beurteilung von Messwerten die Rolle diuretisch wirkender Substanzen, z.B. Coffein (Morgenkaffee oder -tee!).

6.1 Bestimmung von Harnsäure

Zur Bestimmung der Harnsäure dient deren enzymatische Spaltung zu Allantoin, CO₂ und H₂O₂ durch **Uricase**:



Harnsäure besitzt bei 292 nm ein charakteristisches Absorptionsmaximum, während Allantoin und H₂O₂ in diesem Wellenlängenbereich nicht absorbieren. Die Abnahme der Extinktion bei 292 nm ist daher proportional zur Konzentration der Harnsäure.

Ausführung der Bestimmung:

a) 1 mL klarer Harn wird mit 9 mL Wasser verdünnt. 0,2 mL der verdünnten Harnprobe werden mit 1 mL Glycin-Puffer (pH 9,4) und 6 mL Wasser in einem Reagenzglas gemischt.

b) In 2 Reagenzgläser werden pipettiert (Angaben in mL):

	Analyse	Blindprobe
Mischung aus (a)	3,00	3,00
H ₂ O	—	0,05
Uricase	0,05	—
Gründlich mischen und bei Raumtemperatur etwa 20 min stehenlassen.		

c) Die Messung der Extinktionen von Analyse und Blindprobe erfolgt bei 292 nm in **Quarzküvetten**. Um verlässliche Ergebnisse zu erhalten, ist es wichtig, die Küvetten vor der Messung sorgfältig zu säubern und zu **trocknen!** Um Bestimmungsfehler aufgrund unterschiedlicher Lichtdurchlässigkeit der Küvetten zu vermeiden, werden die Absorptionen der leeren, trockenen Küvetten vorab gegen Luft gemessen und die Extinktionen notiert. Etwaige Unterschiede sind hernach zu berücksichtigen. Danach werden die Proben aus dem Ansatz (b) in die Küvetten pipettiert und die Blindprobe gegen die Analysenprobe gemessen.

d) *Konzentrationsberechnung* (nach Subtraktion etwaiger Küvettenunterschiede, s.o.):

$$C \text{ [mg/mL]} = (\Delta E + 0,005) \times 5$$

(ΔE : Extinktionsdifferenz Blindwert/Analyse; 0,005: Absorption der Uricase; 5: Faktor, der sich aus der Verdünnung der Harnprobe und dem Extinktionskoeffizienten der Harnsäure ergibt).

6.2 Bestimmung von Harnstoff

Harnstoff läßt sich mit Hilfe des Ammoniaknachweises von Berthelot bestimmen. Zu diesem Zweck wird der Harnstoff durch **Urease** in Ammoniak und CO₂ gespalten. Der Ammoniak kann mit Hypochlorit zu Chloramin (NH₂Cl) umgesetzt werden. In Gegenwart von Nitroprussiat als Katalysator reagiert das Chloramin mit Phenolat. Dabei entsteht in mehreren Schritten der blaue Farbstoff Indophenol, dessen Konzentration der des ursprünglich enthaltenen Harnstoffs proportional ist.

Zur Ausführung der Harnstoffbestimmung werden folgende Ansätze in Reagenzgläsern vorbereitet (Reihenfolge beachten! Angaben in mL).

	Analysen- probe	Analysen- leerwert	Standard	Standard- leerwert
Harn, 1/500 verdünnt	0,1	0,1	—	—
Harnstoffstandard (0,02 mg/mL)	—	—	0,1	0,1
Urease	0,1	—	0,1	—
Gründlich mischen und die mit Glasmurmeln verschlossenen Reagenzgläser 20 min bei 37°C im Wasserbad inkubieren. Anschließend wird die Farbreaktion in Gang gesetzt und zu den Leerwertproben Urease gegeben (s.u.).				
Phenol/Nitroprussiat	2,0	2,0	2,0	2,0
Urease	—	0,1	—	0,1
Hypochlorit	0,2	0,2	0,2	0,2

Die Reagentien werden gut gemischt. Die Farbreaktion ist innerhalb von 30 min abgeschlossen. Die Farbe bleibt etwa 2 h stabil. Die Messung der Extinktion erfolgt bei 546 nm. Die Harnstoffkonzentration berechnet sich nach folgender Formel:

$$C \text{ [mg/mL]} = \frac{E_A - E_{AL}}{E_S - E_{SL}} \times 10$$

(E: Extinktion; A: Analyse; AL: Analysenleerwert; S: Standard; SL: Standardleerwert)

6.3 Bestimmung von Creatinin

Creatinin bildet im alkalischen Milieu mit Pikrinsäure eine gelborange gefärbte Verbindung, deren Konzentration photometrisch bestimmt werden kann. Die Bildung dieser Verbindung ist **zeitabhängig!**

Pipettierschema (für Analysen und Standards je 2 Parallelen ansetzen; Angaben in mL; Ansätze in Photometerküvetten):

	Analyse	Standard
Harn, 1/100 verdünnt	0,5	—
Creatinin-Standard (0,01 mg/mL)	—	0,5
Puffer	1,0	1,0
Gründlich mischen!		
Pikrinsäure	1,0	1,0

Sofort mischen; **nach genau 1 min** bei 500 nm Extinktion der Proben (gegen Luft) messen, **nach genau 5 min** die Extinktion ein zweites Mal messen.

$$\text{Konzentrationsberechnung: } C \text{ [mg/mL]} = \frac{E_{A_5} - A_1}{E_{S_5} - E_{S_1}}$$

(E: Extinktion; A₁: Analyse nach 1 min; A₅: Analyse nach 5 min; S₁: Standard nach 1 min; S₅: Standard nach 5 min).

6.4 Vergleich zwischen Diabetikerharn und Normalharn

Hintergrund: Insulin ist an der Regulation von Kohlenhydrat- und Fettstoffwechsel beteiligt. Es senkt den Blutglucose-Spiegel über Stimulation der Glucose-Aufnahme in die Muskulatur sowie über Förderung von Glykogen-Synthese und Hemmung der Glykogenolyse. Im weißen Fettgewebe hemmt es die Lipolyse und begünstigt die Fettsynthese. Beim Diabetes mellitus sind entweder die Insulin-Spiegel vermindert (im Extrem wird kein Insulin gebildet) oder die Insulin-Verfügbarkeit ist herabgesetzt, oder aber die Zielorgane haben eine Insulin-Resistenz ausgebildet. Infolgedessen sind bei dieser Erkrankung die Spiegel von Glucose und freien Fettsäuren im Blut erhöht.

Hieraus ergeben sich folgenden Konsequenzen:

1. Bei der Harnbildung reicht die Reabsorptionskapazität des proximalen Tubulus nicht aus, um die in erhöhter Konzentration im Primärharn (Primärharn wird durch Druckfiltration aus Blutplasma erzeugt) vorliegende Glucose weitgehend zurückzutransportieren. Größere Mengen von Glucose erscheinen daher im Harn.
2. Die im Harn verbleibende Glucose bindet Wasser (s. isotonische Reabsorption im proximalen Tubulus); das Harnvolumen ist daher erhöht (im Praktikum nicht Gegenstand weiterer Betrachtung), Folge: Durst.

3. Die freien Fettsäuren werden in den Mitochondrien abgebaut zu Acetyl-Einheiten (als Acetyl-CoA); quantitativ bedeutend sind Muskel und Leber. In diesen Organen existieren (zwei unterschiedliche) Stoffwechselwege, für andere Zwecke benötigtes HS-CoA aus Acetyl-CoA zu regenerieren. In beiden Wegen entsteht aus 2 Acetyl-Resten eine Acetessigsäure. Diese kann entweder zu Aceton decarboxyliert oder mit $\text{NADH} + \text{H}^+$ zu β -Hydroxybuttersäure reduziert werden. Diese drei Substanzen, Acetessigsäure, Aceton und β -Hydroxybuttersäure sind typische Metabolite des untherapierten Diabetikers, die im Blut und folglich auch im Harn erscheinen. Erstere beide sind Ketonkörper; man spricht hier von Diabetiker-Ketonen. (Randbemerkung: Bei stark erhöhtem Fettgenuß können diese Substanzen auch beim Gesunden auftreten, da das überschüssige Fett ebenfalls zur Ketogenese führt.)
4. Die beiden Säuren, Acetessigsäure und β -Hydroxybuttersäure, bewirken im Diabetikerharn einen erniedrigten pH-Wert. (Anmerkung: die Ausscheidung der Säuren ist für den Diabetiker eher günstig, da diese Substanzen auch das Blut ansäuern und zu einem Bohr-Effekt führen; Folge des Bohr-Effekts: verminderte Sauerstoffaufnahme).

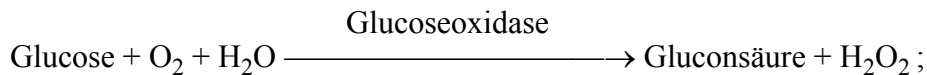
Experimente:

a) *Bestimmung des pH-Wertes*

Benutzen Sie hierfür Indikatorstäbchen!

b) *Nachweis von Glucose und von Ketonkörpern mit Teststreifen*

Das Reagenz des Teststreifens arbeitet nach folgendem Prinzip:



das bei dieser Reaktion gebildete H_2O_2 reagiert in Gegenwart von Peroxidase mit einem Chromogen; der entstehende Farbstoff ist der Glucose proportional.

Teststreifen gemäß Gebrauchsanleitung kurz in den Harn eintauchen, beim Herausnehmen seitliche Kante am Gefäßrand abstreifen. Nach der in der Gebrauchsanleitung angegebenen Zeit mit der Farbskala vergleichen und Konzentrationsbereich bestimmen. Anmerkung: Später auftretende Verfärbungen sind für die Beurteilung ohne Belang!

Verschiedene Fabrikate von Teststreifen erlauben zugleich eine halbquantitative Bestimmung der Ketonkörper. Das Reagenz arbeitet nach dem Prinzip des Aceton-Nachweises nach Legal: Substanzen wie Aceton bilden in enolisierter Form mit Nitroprussiat einen violettgefärbten Komplex.