

6 HORMONE / VITAMINE

Das Peptidhormon Insulin wird in den β -Zellen der Langerhans'schen Inseln des Pankreas gebildet und bei hohem Blutglukosespiegel ausgeschüttet. Über den Blutkreislauf gelangt das Insulin zum Zielgewebe (Leber, Muskulatur, Fett) und erhöht die Glukoseaufnahme in Muskel- und Fettzellen indem es den Einbau von GLUT4 Transportern in die Zellmembran stimuliert.

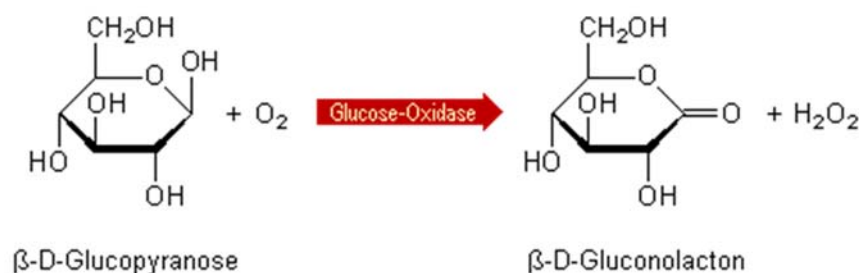
Durch eine insulininduzierte Enzymaktivierung werden darüber hinaus viele Stoffwechselprozesse beschleunigt: Glykolyse, Glykogensynthese, Lipidsynthese und Pentosephosphatweg. Dagegen werden Glykogenolyse, Glukoneogenese und Lipolyse durch Insulin gehemmt.

6.1 Nachweis der Insulinwirkung im Blut

Die Bestimmung der Glukosekonzentration im Blut ist für diabetische Menschen und Tiere lebensnotwendig. Die Glukosemessung erfolgt in Kapillarblut mittels eines Glukometers aus den Fingerkuppen (Menschen) und wahlweise an Pfoten- oder Ohrkapillaren (Hund und Katze). Abhängig von der gemessenen Glukosekonzentration wird die Menge an zu verabreichendem Insulin berechnet.

Versuchsprinzip:

Das aufgetropfte Blut wird über eine Kapillare im Teststreifen in eine Reaktionskammer angesogen. Diese enthält das Enzym Glukoseoxidase. Die Glukoseoxidase katalysiert unter Anwesenheit von Luftsauerstoff die Oxidation von Glukose ($C_6H_{12}O_6$) in Gluconolacton ($C_6H_{10}O_6$), wobei der freiwerdende Wasserstoff mit dem Luftsauerstoff zu Wasserstoffperoxid (H_2O_2) reagiert.



Bei Einführen des Teststreifens in das Glukometer wird die Reaktionskammer über integrierte Elektroden mit einer Spannungsquelle verbunden und dadurch das entstandene Wasserstoffperoxid elektrolytisch oxidiert.

Die dabei freiwerdenden Elektronen werden auf die Kathode übertragen und der Stromfluss wird amperimetrisch gemessen. Das chemische Signal wird somit in ein elektrisches Signal umgewandelt und der Messwert rechnerisch interpretiert. Die Höhe des Messwertes ist somit proportional zur Glukosekonzentration.

Versuchsdurchführung:

Zur Bestimmung der Glukosekonzentration wird zunächst mit einer Lanzette bei einem **freiwilligen, nüchternen** Probanden eine Fingerkuppe angestochen und ein Tropfen Blut mit dem entsprechenden Testplättchen aufgefangen. Das Messergebnis wird abgelesen und festgehalten.

Anschließend nimmt der Proband Nahrung zu sich und die Messung wird nach dem oben beschriebenen Versuchsprinzip nach ca. 1 - 2 Stunden wiederholt. Für diese Messung werden zwei verschiedene Glukometer verwendet.

Außerdem werden in vorliegenden unterschiedlichen Plasmaproben* (Restproben Kleintierklinik Düppel) die Glukosekonzentrationen mit den gleichen Glukometern gemessen.

* LAGESO-Stellungnahme StN 0005/17

	mg/ dl	mmol/ l
Glukosekonzentration Proband nüchtern		
Glukosekonzentration Proband nach Nahrungsaufnahme		

	Glukometer 1		Glukometer 2	
	mg/ dl	mmol/ l	mg/ dl	mmol/ l
Proband nach Nahrungsaufnahme				
Probe 1				
Probe 2				

In welchem Verhältnis hat sich die gemessene Glukosekonzentration nach der Nahrungsaufnahme verändert?

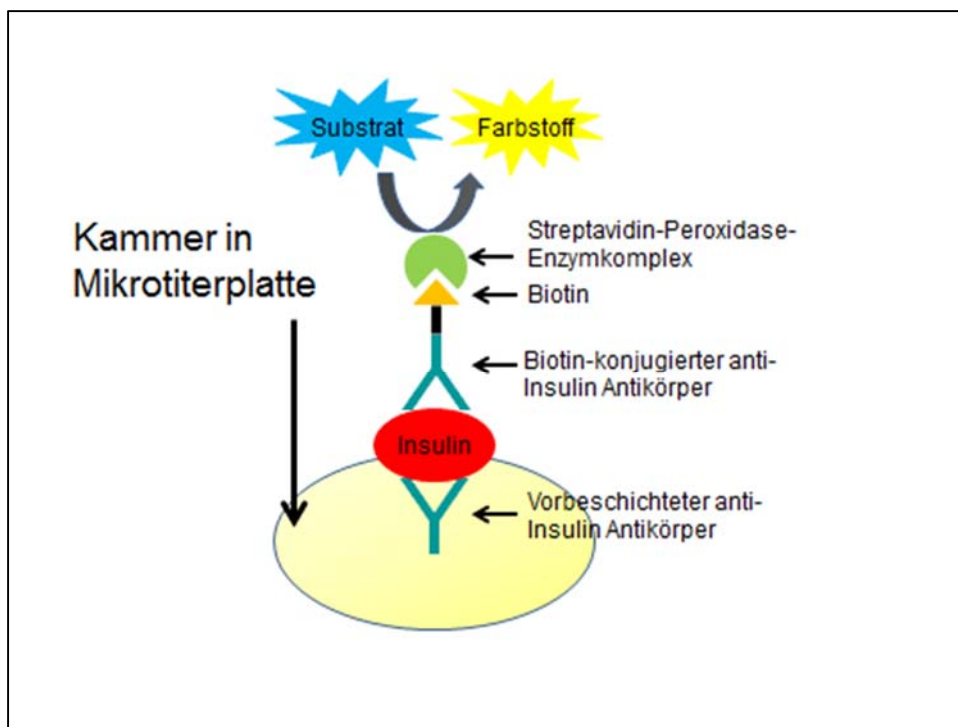
Welchen Einfluss hat die Messung mit zwei unterschiedlichen Messgeräten auf den Glukosewert?

6.2 Insulinnachweis mittels Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Versuchsprinzip:

Der hier verwendete ELISA ist ein Enzymimmunoassay, der auf der Sandwichtechnik basiert. Die Reaktionskammern der Mikrotiterplatte sind mit einem monoklonalen Antikörper beschichtet, der gegen eine definierte Antikörper-Bindungsstelle des Insulin-Moleküls gerichtet ist. Die Proben werden in die beschichteten Kammern gegeben und mit einem Enzym-Konjugat inkubiert. Das Konjugat enthält einen anti-Insulin-Antikörper, der mit Biotin konjugiert ist. Das nicht gebundene Konjugat wird durch Waschen der Kammern entfernt. In einer zweiten Inkubation bindet ein Streptavidin-Peroxidase-Enzymkomplex an den biotinylierten anti-Insulin-Antikörper. Nach einem weiteren Waschschrift wird die Substratlösung zugegeben und die

Farbentwicklung nach einer definierten Zeit gestoppt. Die Intensität der gebildeten Farbe ist proportional der Insulin-Konzentration in der Probe. Die Extinktion wird bei 450 nm mit einem Mikrotiterplattenleser gemessen.



Der ELISA ist ein quantitatives Nachweisverfahren.

Fragestellung: In unserem Versuch soll in 3 verschiedenen Proben eine unbekannte Insulin-Konzentration mittels ELISA ermittelt werden.

Bitte machen Sie sich die Entstehung der Werte der Insulinkonzentration in den Proben deutlich.

Versuchsdurchführung:

Jeder Lauf muss eine Standardkurve beinhalten.

1. Von den 5 Standards mit den Konzentrationen 0 $\mu\text{U/ml}$, 6,25 $\mu\text{U/ml}$, 12,5 $\mu\text{U/ml}$, 25 $\mu\text{U/ml}$ und 50 $\mu\text{U/ml}$ werden je 25 μl in eine Kammer einer Mikrotiterplatte pipettiert
2. Von den 3 zu analysierenden Proben werden ebenfalls je 25 μl in eine entsprechende Kammer der Mikrotiterplatte pipettiert
3. Fügen Sie je 25 μl Enzym-Konjugat hinzu, und schwenken Sie die Platte im Anschluss für 10 Sekunden vorsichtig von Hand. Es ist sehr wichtig in diesem Schritt eine komplette Durchmischung zu erreichen
4. Inkubieren Sie 30 min bei Raumtemperatur
5. Anschließend werden die Kammern entleert und Restflüssigkeit durch ausklopfen auf Papier entfernt. Dann werden die Kammern 3 mal mit je 300 μl Waschlösung gewaschen. Achtung: Die Sensitivität und Präzision des Versuches wird erheblich durch die korrekte Durchführung des Waschschrtes beeinflusst. **Erklären Sie warum!**

6. Pipettieren Sie je 50 μl Enzymkomplex hinzu und inkubieren Sie 30 Minuten bei Raumtemperatur
7. Es folgt ein weiterer Waschschrift (siehe Schritt 5)
8. Fügen Sie 50 μl Substratlösung hinzu und inkubieren Sie 15 Minuten bei Raumtemperatur
9. Stoppen Sie die enzymatische Reaktion durch Zugabe von je 50 μl Stopplösung
10. Bestimmen Sie die Optische Dichte bei 450 \pm 10 nm mit einem Mikrotiterplatten-Lesegerät innerhalb von 10 Minuten nach Zugabe der Stopplösung

Auswertung:

1. Ermitteln Sie eine Standardkurve durch Auftragen der Optischen Dichte (OD_{450}) jedes Standards gegen die angegebene Konzentration des Standards (OD_{450} = Y-Achse, Standard-Konzentration = X-Achse)
2. Unter Verwendung der gemessenen OD_{450} wird für jede Probe die entsprechende Konzentration auf der X-Achse ermittelt. Die Konzentrationen der Proben können direkt von der Standardkurve abgelesen werden.

Ermittelte Konzentration der Proben: _____

Der Hersteller des Testes gibt folgende Werte als physiologische Insulinkonzentrationen im Blut an: 2 $\mu\text{U/ml}$ bis 25 $\mu\text{U/ml}$.

Der Messbereich des Tests liegt zwischen 1,76-100 $\mu\text{U/ml}$.

Diskutieren Sie, ob die ermittelte Konzentration der Proben im physiologischen Bereich liegt bzw. was ein Wert außerhalb der physiologischen Konzentration bedeuten könnte.

6.3 Charakterisierung und Trennung von Vitaminen

Vitamine sind organische Verbindungen, die für lebenswichtige Funktionen (nicht Energiegewinnung!) essentiell sind, vom Organismus aber zum größten Teil nicht selbst synthetisiert werden können. Sie müssen deshalb mit der Nahrung zugeführt werden. Einige Vitamine können auch als Vorstufen (Provitamine) aufgenommen werden, die der Körper dann in die biologisch aktive Form umwandelt.

Vitamine werden in zwei Klassen eingeteilt:

- wasserlösliche Vitamine (z.B. Vitamin B₂ = Riboflavin, Vitamin C)
- fettlösliche Vitamine: A, D, E, K (EDeKA)

Vitamin C (Ascorbinsäure) ist ein Zuckerderivat, welches von den meisten Spezies selbst gebildet werden kann. Eine Aufnahme aus der Nahrung ist abgesehen vom Menschen (Tagesbedarf 200-300mg), insbesondere beim Meerschweinchen (Tagesbedarf 10-15mg) sowie bei Primaten (>1g) notwendig. Vitamin C ist ein wichtiges Antioxidans. Darüber hinaus ist es beteiligt an:

- Hydroxylierung von
 - Prolin (Kollagenbiosynthese)
 - Steroiden
 - Dopamin (zu Noradrenalin)
 - Tryptophan (zu 5-Hydroxytryptophan)
- Umbau der Aminosäure Tryptophan zu Serotonin
- Bildung von Gallensäuren
- Abbau cyclischer Aminosäuren
- Carnithinbiosynthese

Aufgabenstellung:

Es sollen verschiedene Nahrungsquellen auf ihren Vitamin C-Gehalt untersucht werden: Apfel, Petersilie, rote Paprika und herkömmliche Vitamin C Tropfen für Meerschweinchen (Vitakraft).

Aus den oben genannten Nahrungsquellen werden Proben entnommen und mit zwei verschiedenen Verfahren der Vitamin C-Gehalt ermittelt.

Erstellen Sie ein Kurzprotokoll für die Extraktion des Vitamin C aus den verschiedenen Proben.

Versuchsdurchführung:

A. Schnellnachweis: Quantofix®-Teststäbchen Ascorbinsäure (M&N) zum Vitamin C-Nachweis

Die Extrakte der entsprechenden Proben werden nacheinander auf die Teststäbchen getropft. Anschließend erfolgt der Abgleich mit der angegebenen Farbskala.

B. Tillmans-Reagenz

In einem Erlenmeyerkolben wird 1 mL des zu untersuchenden Extraktes, bzw. Standards (1 mg/mL) vorgelegt. Dazu werden 9 mL Wasser pipettiert. Es wird bis zum Farbumschlag mit DCPIP titriert. Der Versuch ist **zweimal** durchzuführen. Aus den ermittelten Verbrauchsmengen an DCPIP wird der Mittelwert gebildet und anschließend die Konzentration von Vitamin C errechnet.

Messwert Standard (1 mg/mL) in mL:

Messwert 1 in mL:

Messwert 2 in mL:

Mittelwert in mL:

Vitamin C-Gehalt:
$$\text{Ascorbinsäure (mg)} = \frac{\text{verbrauchte mL}}{\text{verbrauchte mL Ascorbinsäure-Standard}} \cdot$$

*Verbrauchte mL = Mittelwert des verbrauchten DCPIP Volumens pro Nahrungsquelle/Probe

Verbrauchte mL Ascorbinsäure-Standard = Mittelwert des verbrauchten DCPIP Volumens bei der Titration des Standards

C. Berechnung der benötigten Tagesmenge des jeweiligen Futtermittels:

	Ergebnis in mg		Literaturwerte	Benötigte Tagesmenge (in g)
	Teststäbchen	Tillmanns Reagenz		
Apfel				
Paprika, rot				
Petersilie				
Vitamin C Tropfen				

Welche Angaben zur Vitamin C Konzentration der untersuchten Nahrungsmittel finden sich in der Literatur?

Diskutieren Sie ob die unterstützende Gabe von Vitamintropfen beim Meerschweinchen sinnvoll ist.