

# Info!

Die im Vortrag gezeigten Laborbefunde dienen der Verdeutlichung der fachlichen Inhalte.

Wir weisen ausdrücklich darauf hin, dass entsprechende Laboranalysen auch von anderen Labors durchgeführt werden und dass die Indikationsstellung für Labordiagnostik ausschließlich durch den Behandler oder das Krankenhaus erfolgt.

# **Freie Radikale – notwendig für die Immunabwehr aber auch Ursache für oxidativen und nitrosativen Stress**

**Dr. Cornelia Doebis**

Institut für Medizinische Diagnostik Berlin

# Was sind freie Radikale?

- Atome oder Moleküle, die auf Grund von einem unpaaren Elektron auf der Außenhülle sehr reaktionsfreudig sind
- Zwischenprodukte unseres Stoffwechsels, die ständig in jeder Zelle des menschlichen Körpers entstehen
- können durch endogene oder exogene Faktoren entstehen
- können zu oxidativem und nitrosativem Stress führen
- funktionelle Moleküle werden zu dysfunktionellen Molekülen umgewandelt
- durch molekulare Veränderungen der DNA entstehen Mutationen und andere DNA-Schäden, die zu degenerativen Erkrankungen oder Krebs führen können

# Was sind freie Radikale?

**O<sub>2</sub><sup>-•</sup>** Hyperoxid-Anion = Superoxid-Anion

**•OH** Hydroxyl-Radikal

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** Wasserstoffperoxid

**HOO•** Perhydroxyl-Radikal

**ROS**

„Reactive Oxygen Species“

⇒ Oxidativer Stress

**NO•** Stickoxidradikal

**ONOO<sup>-</sup>** Peroxynitrit-Anion

**RNS**

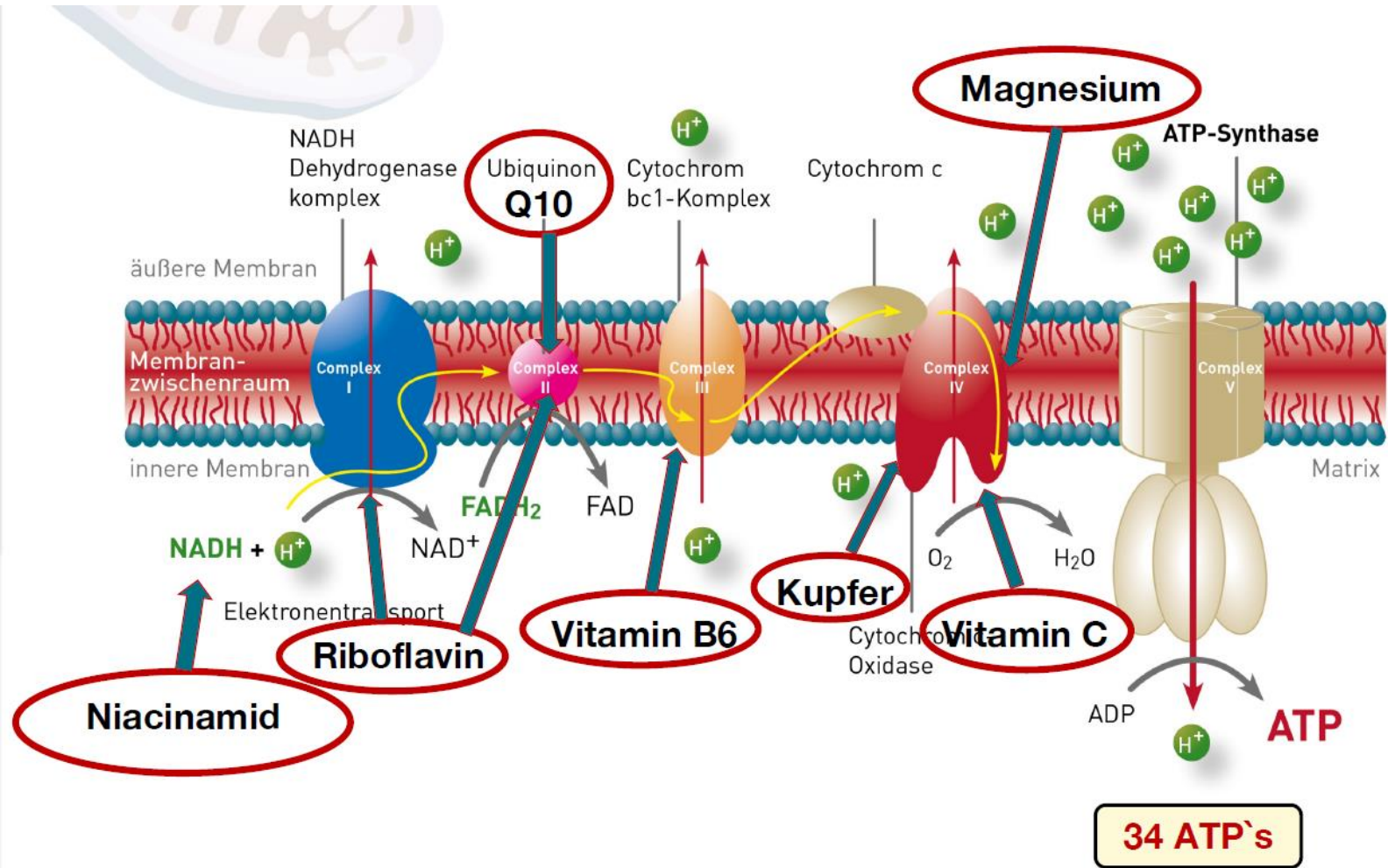
„Reactive Nitrogen Species“

⇒ Nitrosativer Stress

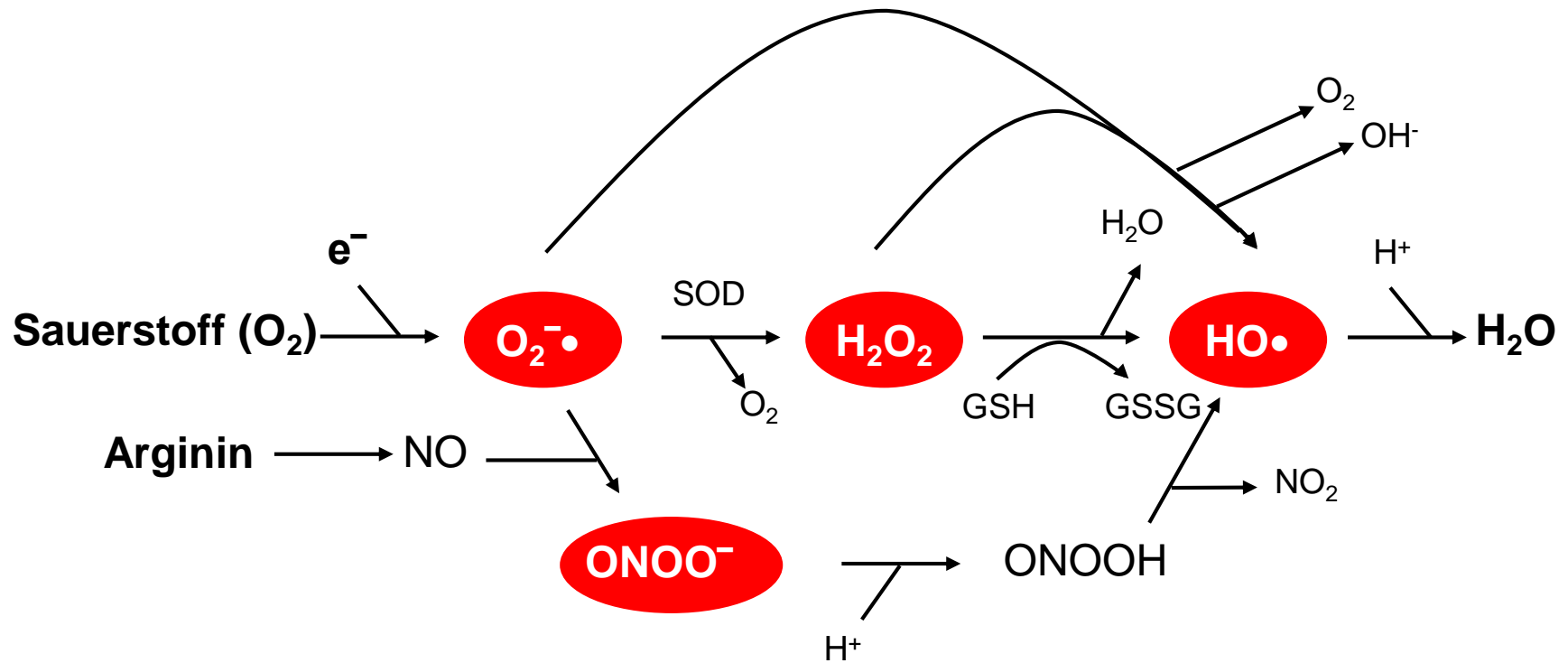
# Was bedeutet oxidativer und nitrosativer Stress?

⇒ Stoffwechsellage, bei der im Organismus eine Menge an ROS und RNS gebildet wird, die das normale physiologische Ausmaß überschreitet

# Sauerstoffradikale entstehen v.a. in Mitochondrien im Rahmen der Atmungskette und der Cytochrom-P450-Oxidasen



# Erzeugung von freien Radikalen



O<sub>2</sub><sup>-•</sup>      Hyperoxid-Anion = Superoxid-Anion

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>      Wasserstoffperoxid

HO<sup>•</sup>      Hydroxyl-Radikal

ONOO<sup>-</sup>      Peroxynitrit-Anion

# Wann entstehen freie Radikale?

## physiologisch:

- in Mitochondrien als Nebenprodukt der Zellatmung
- im Neurotransmitterstoffwechsel im Gehirn
- in phagozytierenden Immunzellen:
  - neutrophile Granulozyten

→ **Freisetzung von reaktiven Sauerstoffradikalen durch neutrophile Granulozyten und Makrophagen ist die wichtigste Waffe des Immunsystems bei der intrazellulären Verdauung von phagozytierten („gefressenen“) Mikroorganismen und Tumorzellen**

# Neutrophile Granulozyten nutzen freie Radikale zur Erreger-Elimination

## Unspezifisches Immunsystem

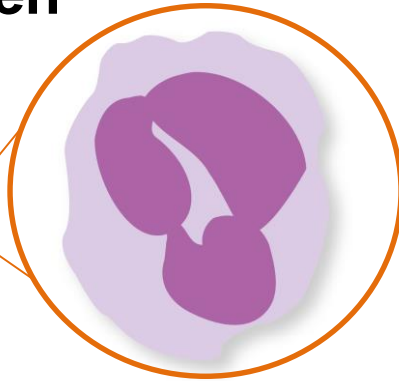
(angeboren, nicht lernfähig)

**Monozyten**

→ **Gewebemakrophagen**

**Granulozyten**

- **Neutrophile** > 95%
- **Eosinophile** 1-3%
- **Basophile** < 1%



## Spezifisches Immunsystem

(erworben, lernfähig)

- **T-Lymphozyten**

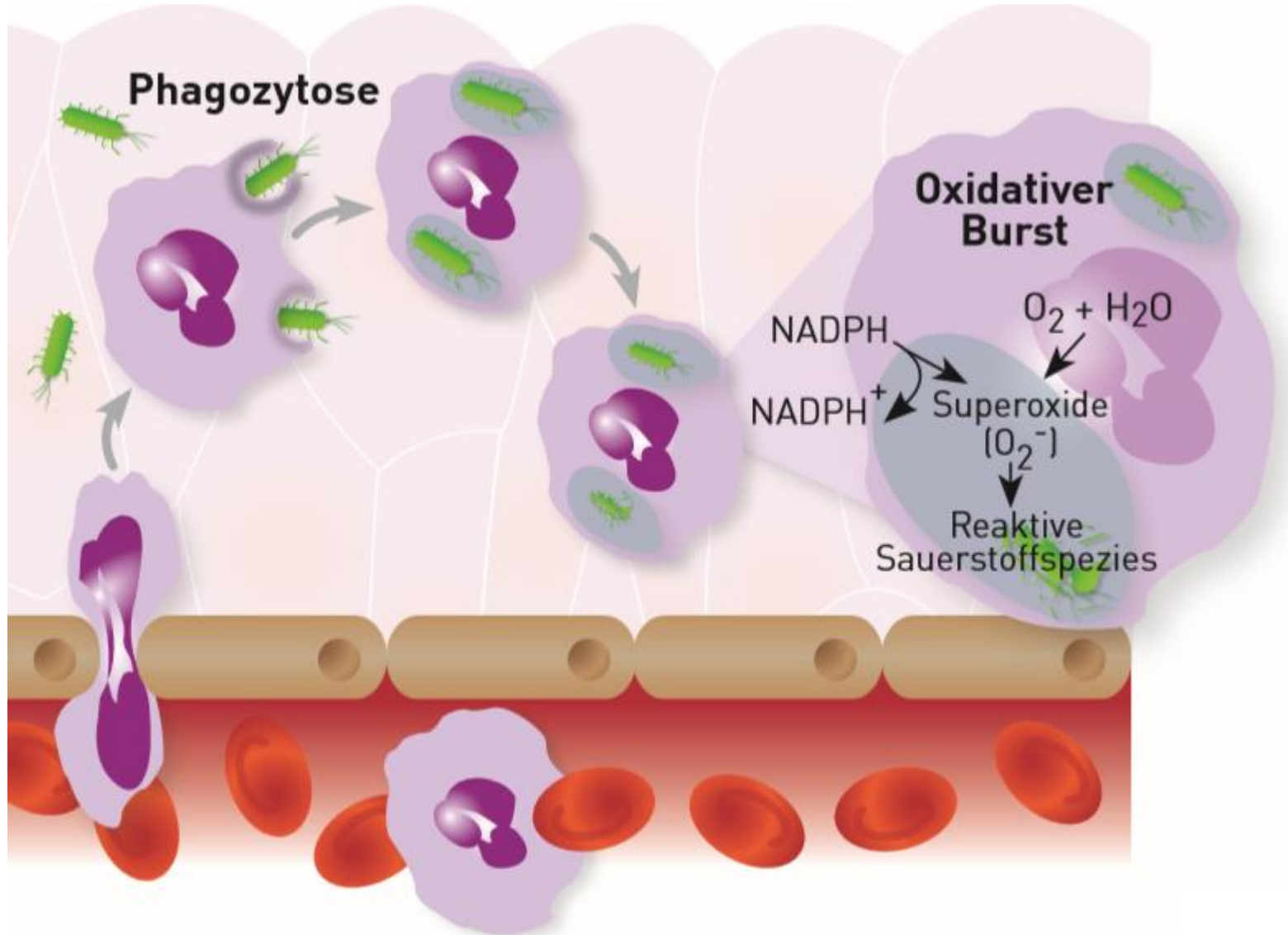
- **B-Lymphozyten**

⇒ **Antikörper**

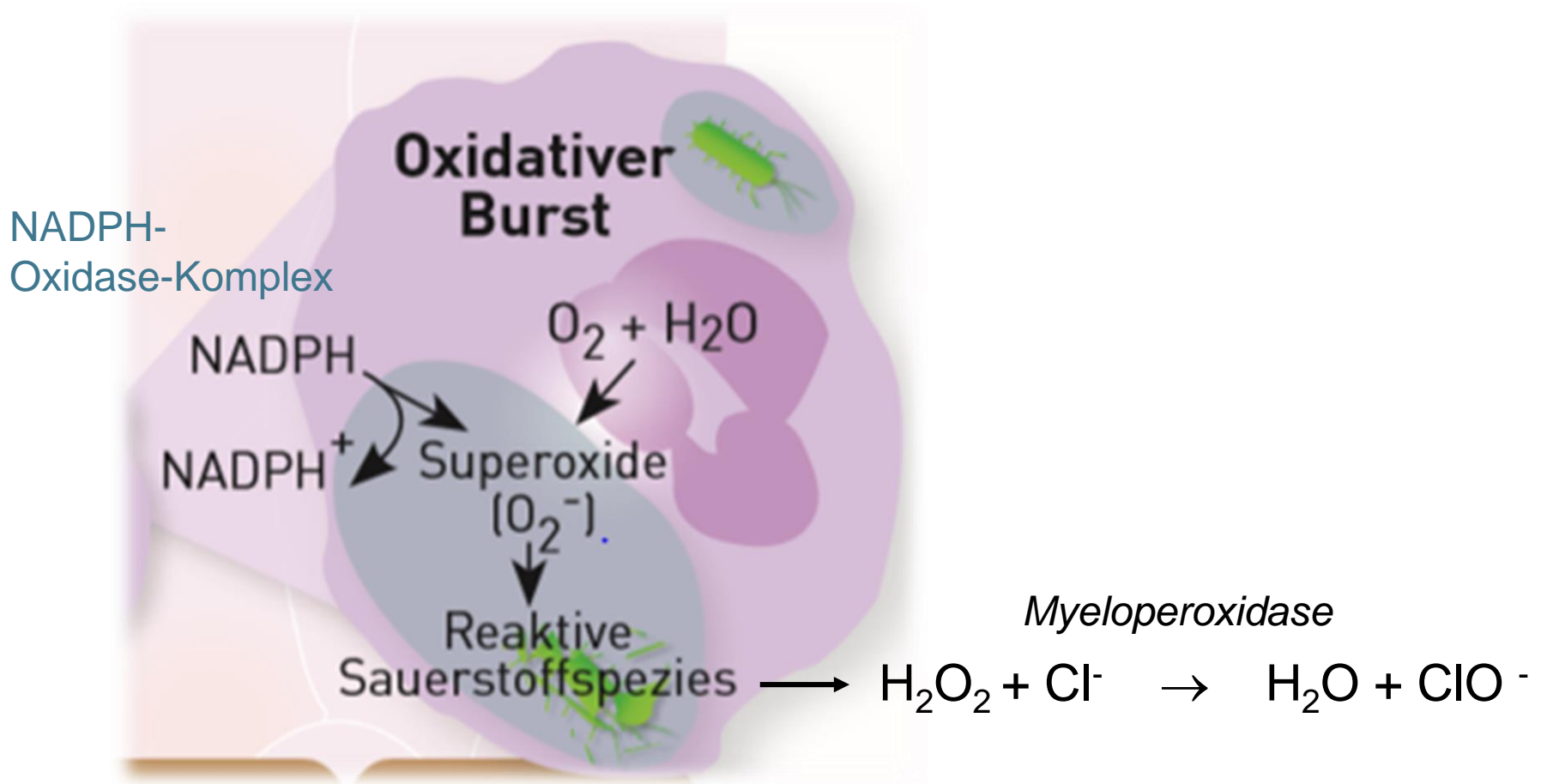
**Mastzellen**

**Natürliche Killerzellen**

# Beim oxidativen Burst werden Sauerstoff-Radikale produziert



# Oxidativer Burst im Inneren der Phagolysosomen



- toxisches Milieu für Mikroorganismen
- Hypochlorit wirkt antimikrobiell
- Sauerstoffverbrauch eines Granulozyten steigt um Faktor 50-100 nach der Phagozytose

# Nachweis einer intakten Granulozytenfunktion anhand des Oxidativen Burst

## Ärztlicher Befundbericht

### Untersuchung

### Ergebnis Einheit

### Referenzbereich

#### Klinische Immunologie

#### Oxidativer Burst Granulozyten

Freisetzung von reaktiven Sauerstoffmetaboliten  
nach Stimulation. (Heparin-Blut)

Burst-positive Zellen

94.5

%

> 90

Burst-Aktivität

10418

mean

> 8900

#### Interpretation

Der normale Anteil an Granulozyten, die zum Respiratory Burst in der Lage sind, sowie die normale Respiratory Burst-Aktivität schließen einen diesbezüglichen Defekt der Granulozyten aus. Bei V.a. reduzierte Granulozytenfunktion empfehlen wir zusätzlich den Phagozytostest zur Untersuchung der Fähigkeit zur Aufnahme von Bakterien (10 ml Heparinblut).

# Reduzierter Oxidativer Burst, reduzierte Abwehrfunktion

## Ärztlicher Befundbericht

Untersuchung	Ergebnis	Einheit	Referenzbereich
<u>Oxidativer Burst Granulozyten</u>			
Freisetzung von reaktiven Sauerstoffmetaboliten nach Stimulation. (Heparin-Blut)			
Burst-positive Zellen	52.9	%	> 90
Burst-Aktivität	4757	mean	> 8900

### Interpretation

Verminderte Burst-Aktivität der Granulozyten. Dieses weist auf eine reduzierte Bildung freier Sauerstoffradikale hin. Vorkommen bei granulozytärer Immundefizienz aber auch sekundär bei systemischen Entzündungen, konsumierenden Grunderkrankungen, und auch als Nebenwirkung antioxidativer Therapiemassnahmen.

- in seltenen Fällen CGD = septische Granulomatose (NADPH-Oxidase Funktion gestört)
- häufiger sekundäre Fehlfunktion der Granulozyten

# Ursachen für eine sekundäre (latente) Störung des Oxidativen Burst

## 1. Akute und chronische systemische Entzündungen

- Ausschüttung unreifer Granulozyten aus dem Knochenmark
- Einwirkung von TNF- $\alpha$  und IL-1 auf Granulozyten

## 2. Antioxidative Therapien

- z.B. Vitamine C, Vitamin E, Coenzym Q10
- sekundäre Pflanzenstoffe: Karotinoide, Flavonoide, Polyphenole

→ Therapiestopp, wenn Werte im oxidativen Burst-Test abfallen

# Ein derartiger Befund kann Resultat einer antioxidativen Therapie sein!

## Ärztlicher Befundbericht

Untersuchung	Ergebnis	Einheit	Referenzbereich
<b>Klinische Immunologie</b>			
<u>Oxidativer Burst Granulozyten</u>			
Freisetzung von reaktiven Sauerstoffmetaboliten nach Stimulation. (Heparin-Blut)			
Burst-positive Zellen	96.9	%	> 90
Burst-Aktivität	<b>6842</b>	mean	> 8900

### Interpretation

Der normale Anteil an Granulozyten, die zur Phagozytose und zum Respiratory Burst in der Lage sind, schließt einen signifikanten Immundefekt der Granulozyten aus. Eine verminderte Respiratory Burst-Aktivität der Granulozyten ist jenseits des Kleinkindalters zumeist sekundär bedingt. Sie belegt eine reduzierte Bildung freier Sauerstoffradikale, was unter antioxidativer oder immunsuppressiver Therapie, als Folge chronischer Immunaktivierungen oder z.B. auch bei Diabetes mellitus vorkommen kann.

# Wann entstehen freie Radikale?

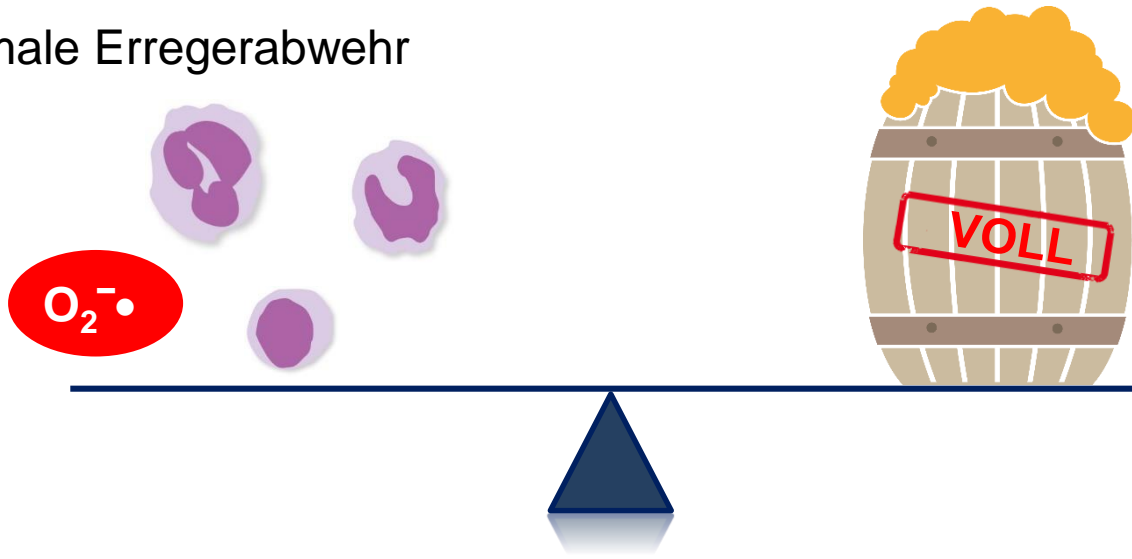
## physiologisch:

- in Mitochondrien als Nebenprodukt der Zellatmung
- im Neurotransmitterstoffwechsel im Gehirn
- in phagozytierenden Immunzellen (bei inflammatorischen Prozessen)

## pathophysiologisch

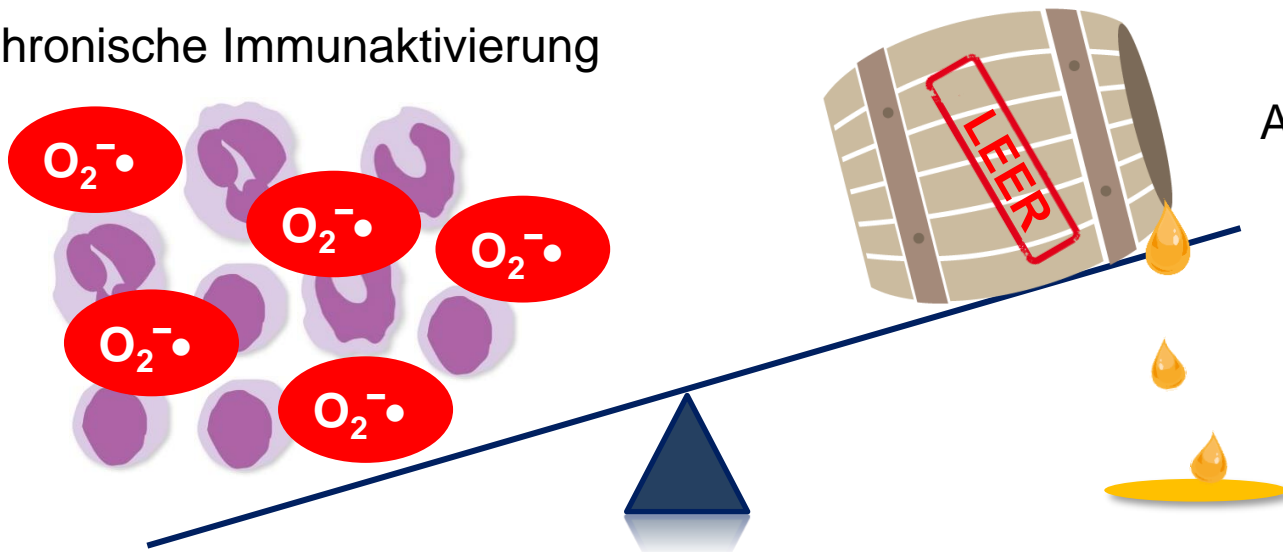
- endogen:
  - bei Entzündungen und Infektionen
  - bei Bluthochdruck und Diabetes
- exogen:
  - Schwermetalle, Umweltgifte, Mykotoxine, bestimmte Medikamente
  - Einwirkung von Ozon und UV; ionisierende Strahlung
  - psychischer und physischer Stress (z.B. Leistungssport)

## Normale Erregerabwehr



Antioxidantienstatus

## Chronische Immunaktivierung



Antioxidantienstatus

# Welche Folgen hat oxidativer Stress?

## Lipidperoxidation

- Schädigung von Zellmembranen → Zellen müssen mehr Energie aufwenden, um ihr Membranpotenzial zu stabilisieren
- Änderung der Durchlässigkeit der Membranen

Reaktionsprodukt: z.B. Malondialdehyd (MDA) → MDA-LDL

## Proteinoxidation

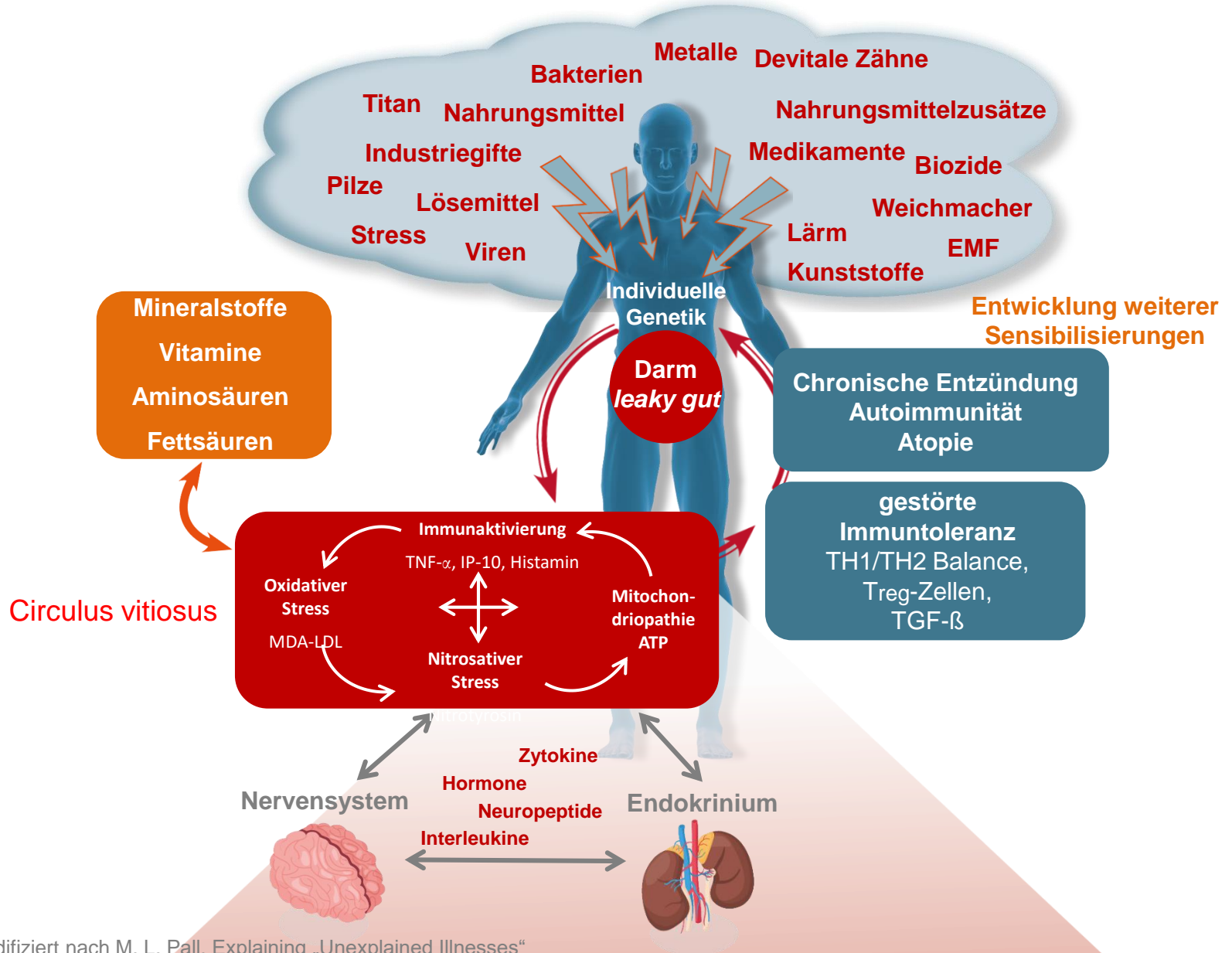
- Strukturänderung von Proteinen:
  - Fragmentierung der Polypeptidkette (Zerlegung in zwei Stränge)
  - Oxidation von Seitengruppen der Aminosäuren
  - Bildung von Protein-Cross-Links

→ Funktionsverlust → Akkumulation in der Zelle

## Schädigung der DNA

- Strangbrüche, Oxidation

# Freie Radikale sind „Brennstoff“ des Circulus vitiosus bei Multisystemerkrankungen



# Labor-Parameter des Circulus vitiosus

## Ärztlicher Befundbericht

**Material:** Vollblut, 1x EDTA-Blut, 1x Heparinblut

Untersuchung	Ergebnis	Einheit	Referenzbereich*
--------------	----------	---------	------------------

### Klinische Immunologie

#### Profil Multisystemerkrankung

Histamin (gesamt) i. Hep.-Bl. (ELISA)	61.1	ng/ml	< 65.5
---------------------------------------	------	-------	--------

Kein Hinweis auf eine Mastzell-assoziierte systemische Entzündungsreaktion.

➔ MDA-LDL i.S. (EIA) **52.1** U/l  
Erhöhtes MDA-modifiziertes LDL als Hinweis auf Lipidperoxidation als Folge eines signifikanten oxidativen Stress.

oxidativer Stress

➔ Nitrotyrosin i. EDTA-Plasma (ELISA) **2290** nmol/l  
Das erhöhte Nitrotyrosin weist auf eine gesteigerte Bildung von Stickstoffmonoxid (NO) und Peroxynitrit hin (= nitrosativer Stress).

nitrosativer Stress

ATP intrazellulär <sup>oo</sup> (CLIA)	4.35	µM	> 2.5
--	------	----	-------

ATP liegt im Normbereich. Kein Hinweis auf eine gestörte Mitochondrienfunktion der Leukozyten.

TNF-alpha i.S. (CLIA)	<b>20.9</b>	pg/ml	< 8.1
-----------------------	-------------	-------	-------

IP-10 i.S. (PIA)	<b>890</b>	pg/ml	< 900
------------------	------------	-------	-------

Hinweis auf systemische Entzündungsreaktion (TNF-a).

Eine Beteiligung der TH1-Effektorzellen ist nicht sicher auszuschließen (IP-10 im oberen Normbereich).

Wir empfehlen eine Kontrolle im Verlauf.

# Oxidativer und nitrosativer Stress stören die Mitochondrienfunktion

- Stickoxidradikal ( $\text{NO}\bullet$ ) und Peroxynitrit-Anion ( $\text{ONOO}^-$ )  
hemmen die Cytochrom C-Oxidase der mitochondrialen Atmungskette  
  
→ Hemmung der ATP-Synthese
- v.a. Superoxid- und Peroxynitrit-Anionen ( $\text{O}_2^-\bullet$  und  $\text{ONOO}^-$ )  
stören die Struktur der inneren Mitochondrienmembran  
  
→ Zelluntergang

# Oxidativer und nitrosativer Stress stören die Mitochondrienfunktion

## Ärztlicher Befundbericht

Material: Vollblut, 1x EDTA-Blut, 1x Heparinblut

Untersuchung	Ergebnis	Einheit	Referenzbereich*
--------------	----------	---------	------------------

### Klinische Immunologie

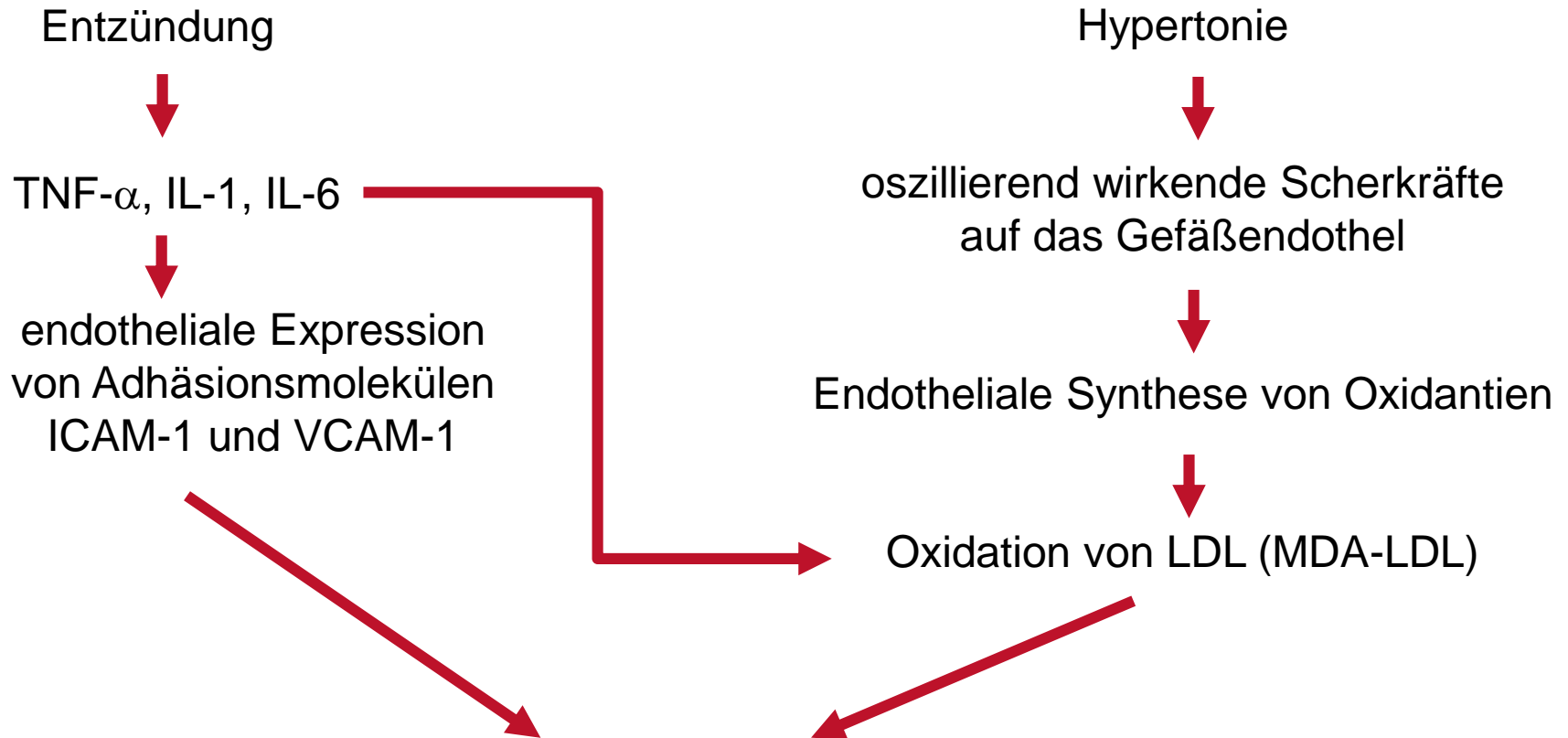
#### Profil Multisystemerkrankung

Histamin (gesamt) i. Hep.-Bl. (ELISA)	46.4	ng/ml	< 65.5
---------------------------------------	------	-------	--------

Kein Hinweis auf eine Mastzell-assoziierte systemische Entzündungsreaktion.

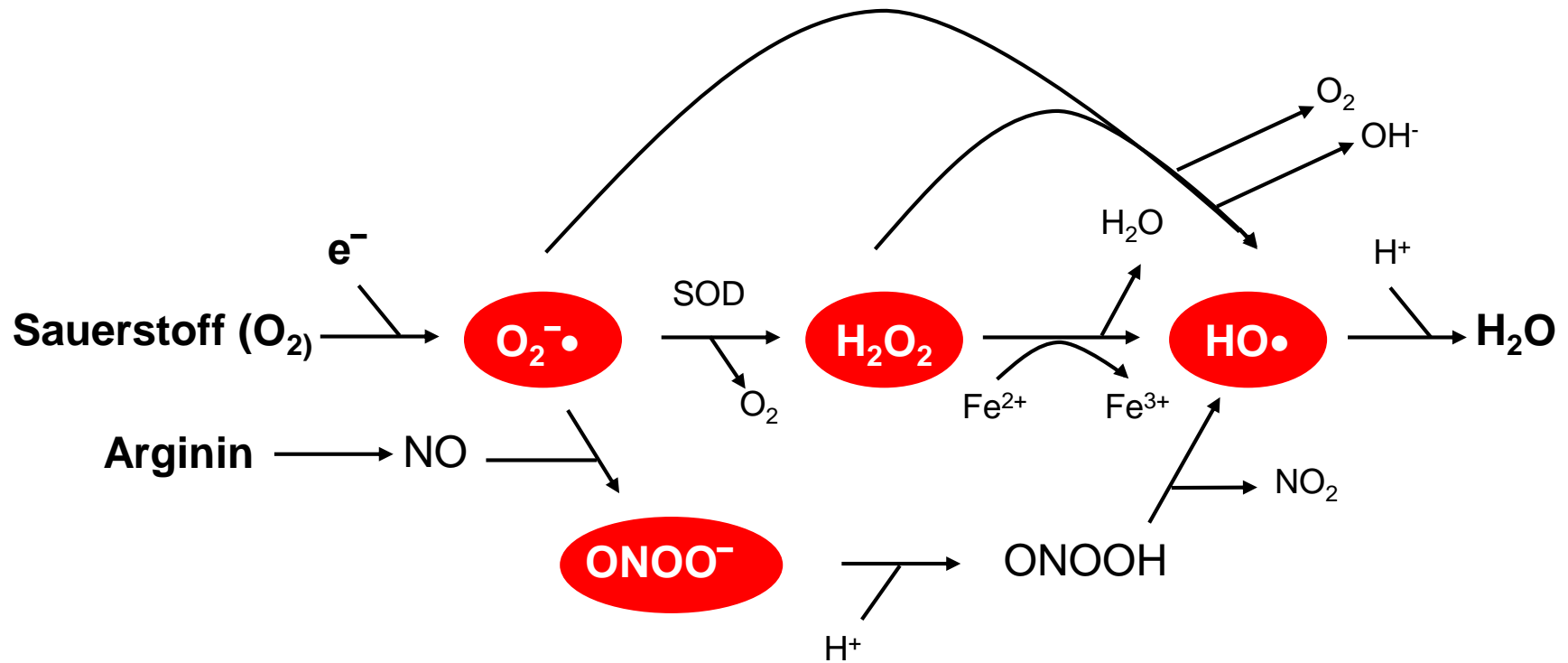
→ MDA-LDL i.S. (EIA)	42.9	U/l	oxidativer Stress
Erhöhtes MDA-modifiziertes LDL als Hinweis auf Lipidperoxidation als Folge eines signifikanten oxidativen Stress.			
→ Nitrotyrosin i. EDTA-Plasma (ELISA)	787	nmol/l	nitrosativer Stress
Das erhöhte Nitrotyrosin weist auf eine gesteigerte Bildung von Stickstoffmonoxid (NO) und Peroxynitrit hin (= nitrosativer Stress).			
→ ATP intrazellulär <sup>°°</sup> (CLIA)	1.24	µM	Energie-Defizit
Vermindertes intrazelluläres ATP als Hinweis auf eine gestörte Mitochondrienfunktion der Leukozyten.			

# Oxidativer und nitrosativer Stress fördern die Gefäßentzündung



**Förderung arteriosklerotischer Veränderungen**

# Entstehung von freien Radikalen



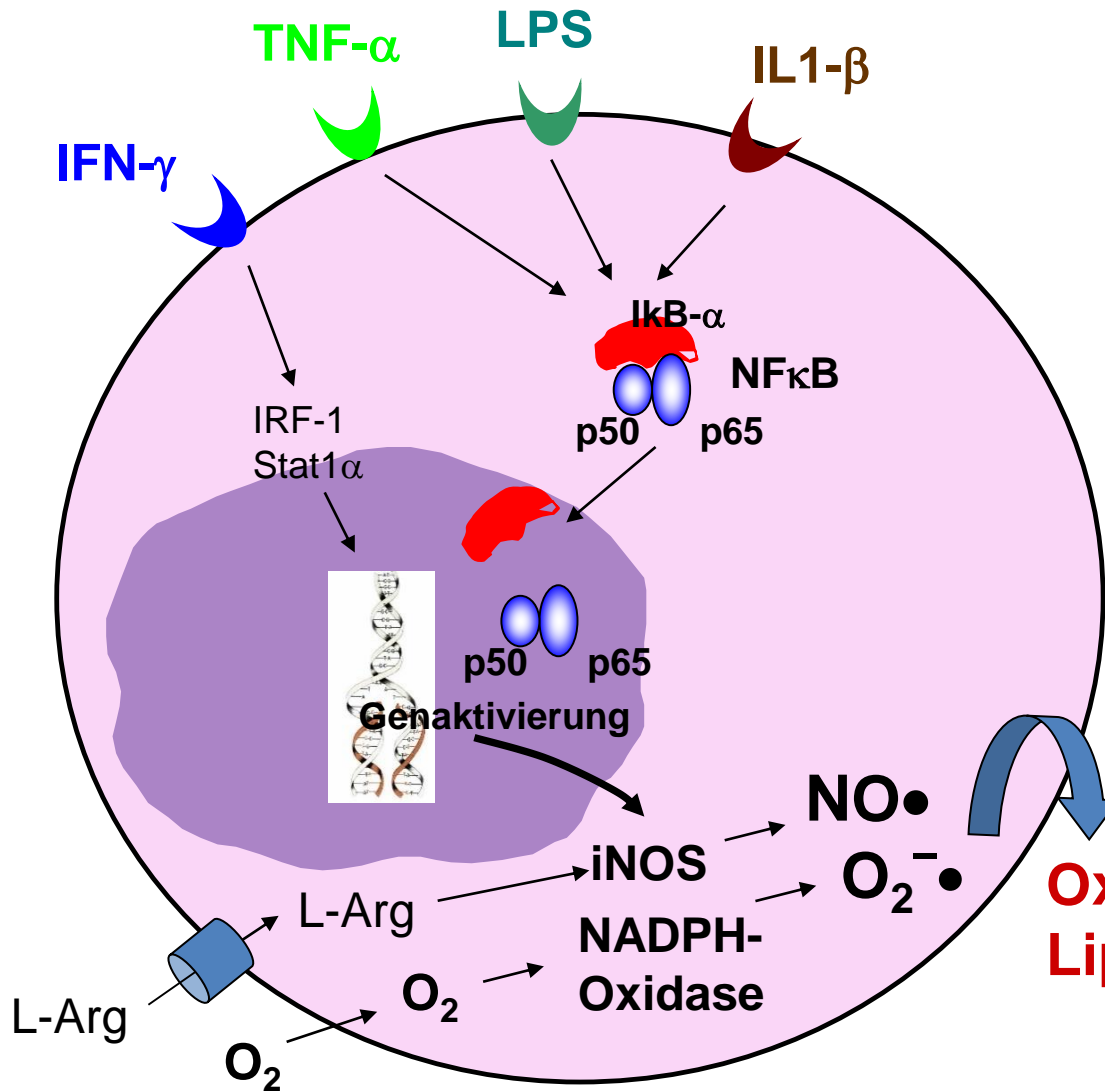
$O_2^{\bullet-}$       Hyperoxid-Anion = Superoxid-Anion

$H_2O_2$       Wasserstoffperoxid

$HO\bullet$       Hydroxyl-Radikal

$ONOO^-$     Peroxynitrit-Anion

Die induzierbare NO-Synthetase (iNOS) befindet sich v.a. in Immunzellen und wird über proentzündliche Signale stimuliert.



iNOS = induzierbare

eNOS = endotheliale

nNOS = neuronale

mtNOS = mitochondriale

**Oxidation von Proteinen,  
Lipiden und DNA**

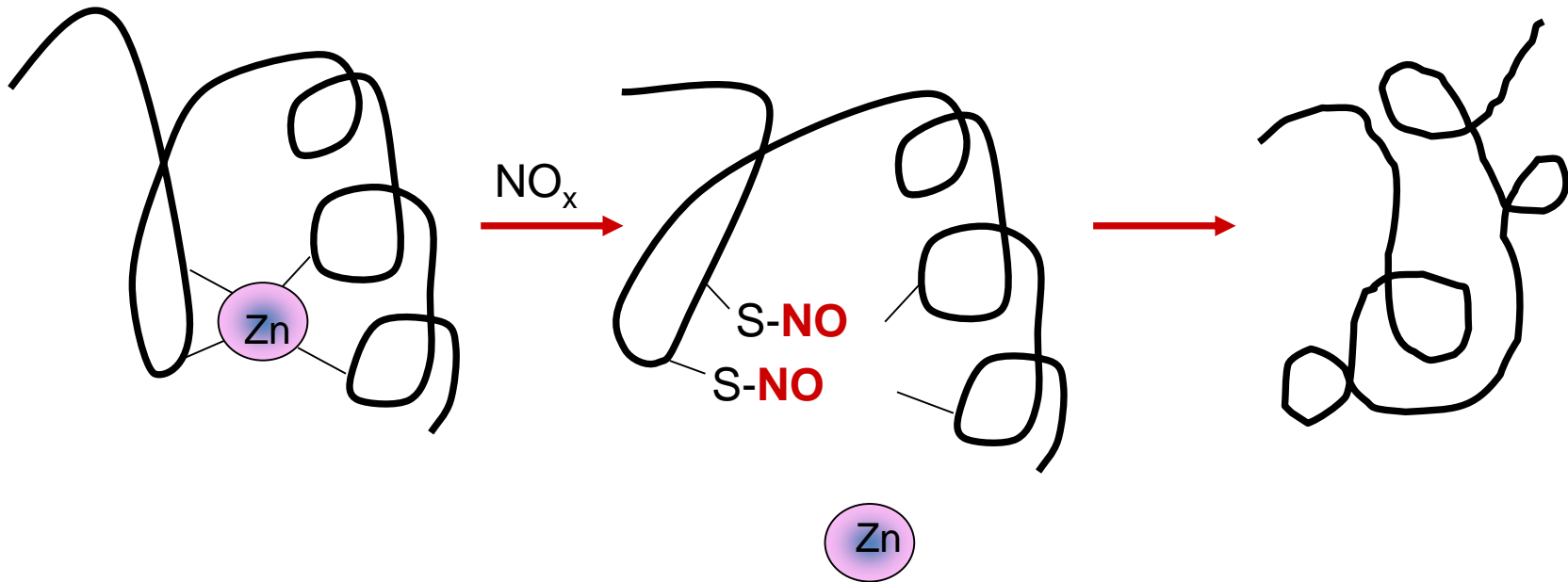
# Nitrosativer Stress kann isoliert auftreten

## Ärztlicher Befundbericht

Untersuchung	Ergebnis	Einheit	Referenzbereich
<b>Klinische Immunologie</b>			
MDA-LDL i.S. Ein normaler MDA-LDL-Spiegel spricht gegen eine signifikante Lipidperoxidation als Folge eines oxidativen Stress.	(EIA) 23.8	U/l	< 40
Nitrotyrosin i.EDTA-Plasma Das erhöhte Nitrotyrosin weist auf eine gesteigerte Bildung von Stickstoffmonoxid (NO) und Peroxynitrit hin (= nitrosativer Stress).	(ELISA) <b>944</b>	nmol/l	< 630

# NO• setzt Zink-Ionen aus Zinkfingerproteinen frei


















⇒ die meisten Transkriptionsfaktoren sind Zinkfingerproteine



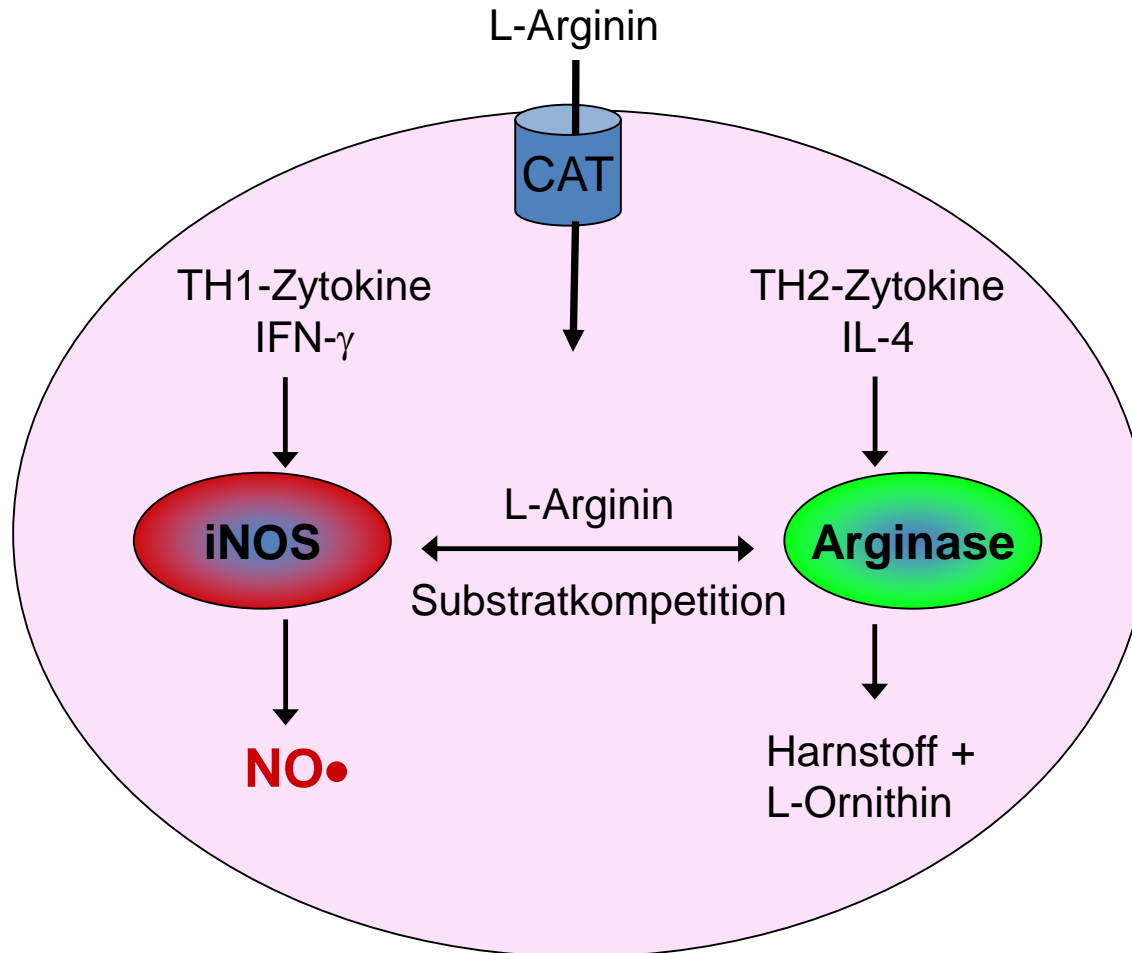
- nach S-Nitrosierung von Cysteinen in Zinkfingern kann das Zinkion nicht wieder komplexiert werden → Verlust der Proteinstruktur und Funktionsverlust
- Störung der Zink-Homöostase

## Mineralstoffanalyse im Vollblut - erweitertes Profil "11 + 6" (ICP-MS)

Die Analyse erfolgte im lysierten Heparin-Vollblut zur Bestimmung der intra- und extrazellulär lokalisierten Spurenelemente.

Analyt	Ergebnis	Referenzbereich		Abweichung vom Median *
Magnesium	33,2 mg/l	30 - 40		-3 %
Selen	65,6 µg/l	90 - 230		-39 %
Zink	3,4 mg/l	4,5 - 7,5		-37 %
Calcium	64 mg/l	55 - 70		5 %
Kalium	1602 mg/l	1386 - 1950		1 %
Natrium	1756 mg/l	1500 - 1850		7 %
Phosphor	441 mg/l	403 - 577		2 %
Chrom	0,3 µg/l	0,14 - 0,52		25 %
Kupfer	0,9 mg/l	0,70 - 1,39		10 %
Mangan	8,7 µg/l	8,3 - 15,0		-22 %
Molybdän	0,5 µg/l	0,3 - 1,3		0 %
<b>Wechselwirkungen mit toxischen Metallen:</b>				
Aluminium	<10,0 µg/l	< 11,4		
Arsen	0,2 µg/l	< 1,2		
Blei	4,3 µg/l	< 28		
Cadmium	3,5 µg/l	< 0,6		
Nickel	0,2 µg/l	< 3,8		
Quecksilber	11,2 µg/l	< 1,0		

# TH2-Dominanz: Selbstschutzmechanismus bei Patienten mit chronisch entzündlichen Erkrankungen?



Die Stimulation der Arginase durch TH2-Zytokine limitiert die NO-Freisetzung trotz erhöhter iNOS-Aktivität.

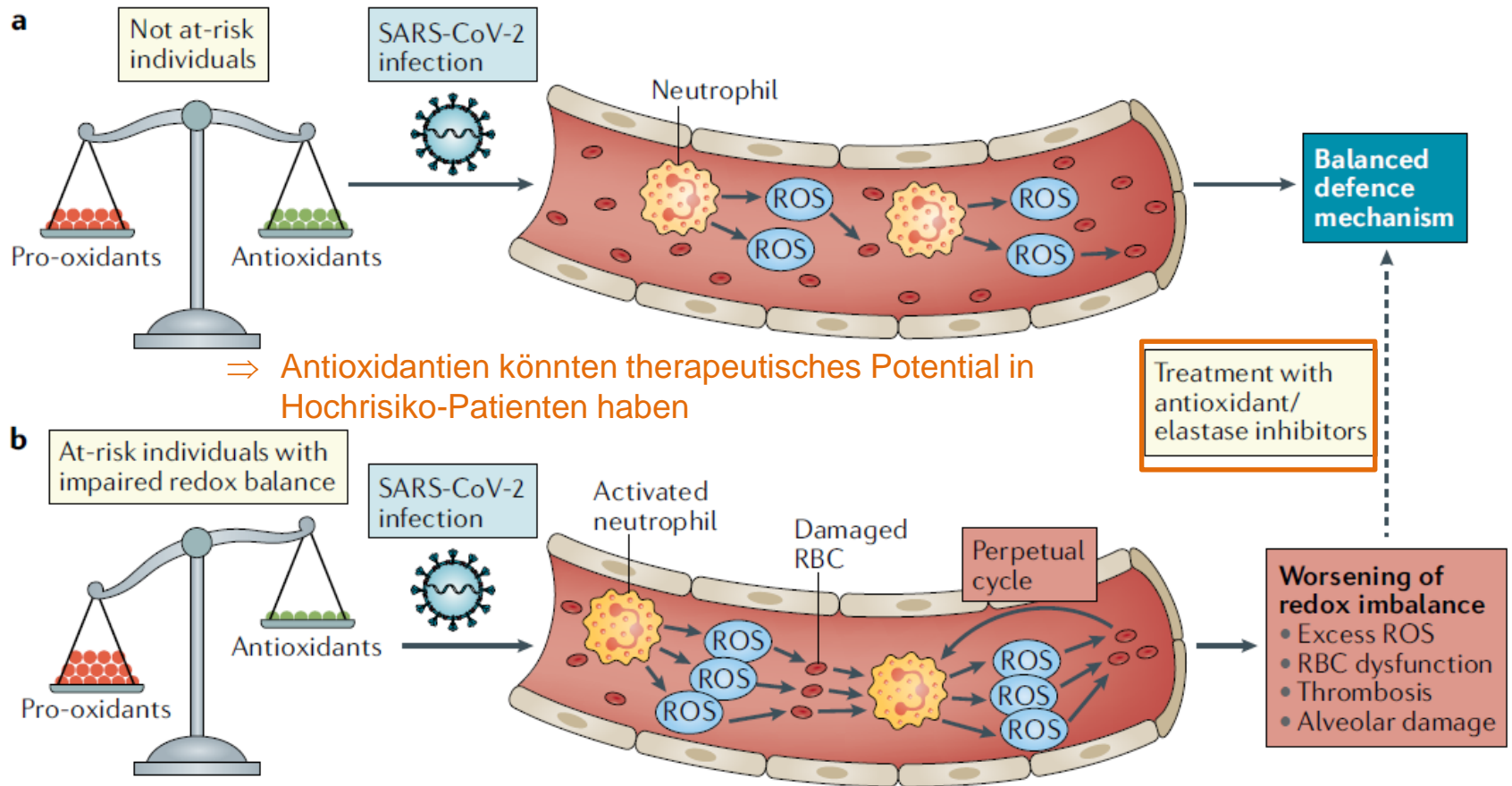
# Freie Radikale und COVID-19

## Tissue damage from neutrophil-induced oxidative stress in COVID-19

*Mireille Laforge<sup>1</sup>, Carole Elbim<sup>2</sup>, Corinne Frère<sup>3</sup>, Miryana Hémadi<sup>4</sup>, Charbel Massaad<sup>1</sup>, Philippe Nuss<sup>2,5</sup>, Jean-Jacques Benoliel<sup>1,6</sup> and Chrystel Becker<sup>1</sup>*

- erhöhte Neutrophilen/Lymphozyten-Ratio bei schweren Verläufen beobachtet
- erhöhte Level an reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) → oxidativer Stress
- resultiert in Gewebedestruktion, Thrombose etc.
- respiratorische virale Infektionen sind allgemein dafür bekannt, dass sie die antioxidativen Defenzmechanismen inhibieren

# Freie Radikale und COVID-19



→ Peroxidation der Membran der roten Blutkörperchen (RBC) führt zur weiteren Neutrophilen-Aktivierung und ROS-Produktion

# Freie Radikale und COVID-19

Advances in Biological Regulation 77 (2020) 100741



ELSEVIER

Contents lists available at [ScienceDirect](#)

Advances in Biological Regulation

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/jbior](http://www.elsevier.com/locate/jbior)



Devilishly radical NETwork in COVID-19: Oxidative stress, neutrophil extracellular traps (NETs), and T cell suppression

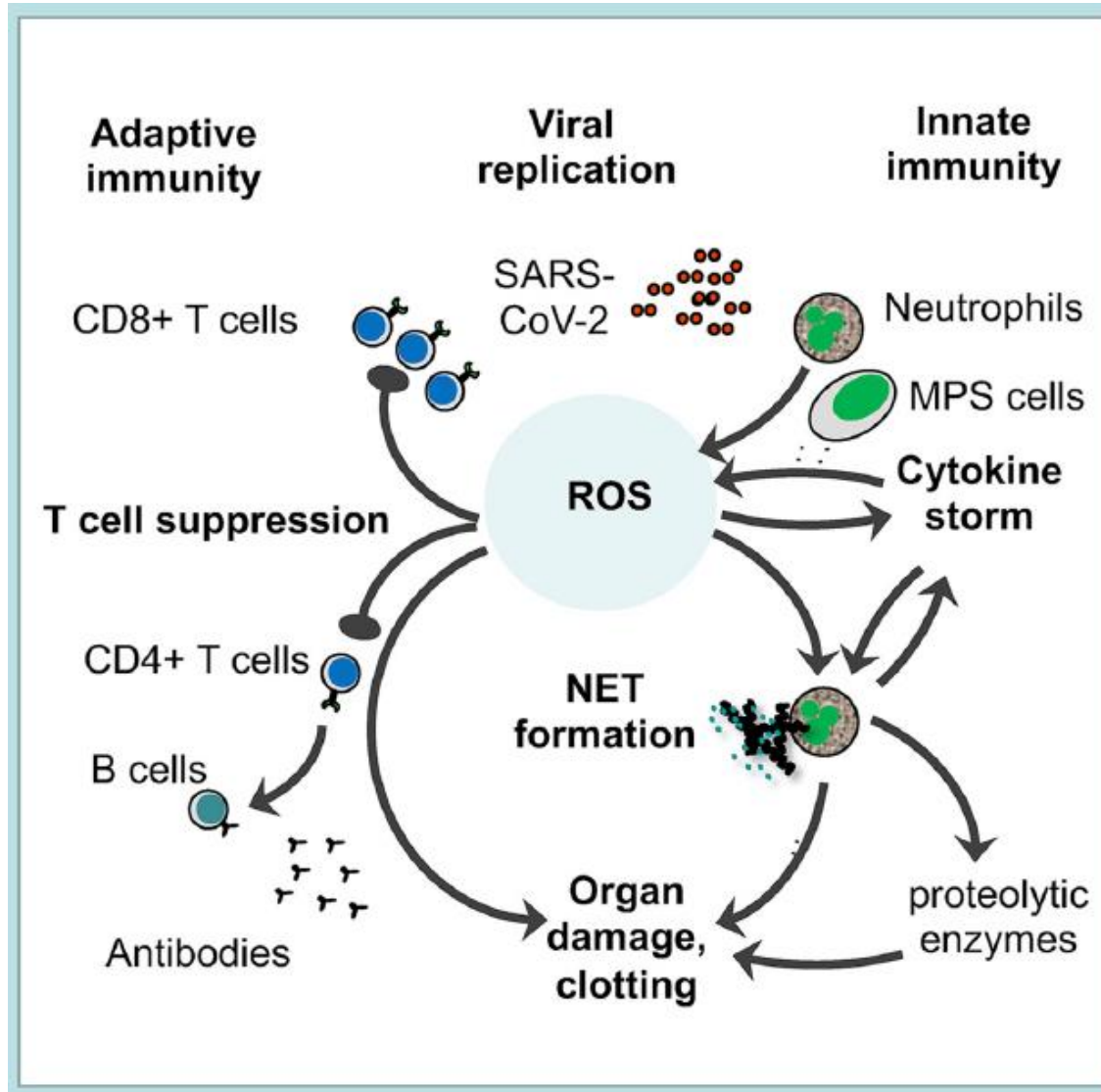
Günther Schönrich<sup>a, \*\*</sup>, Martin J. Raftery<sup>a</sup>, Yvonne Samstag<sup>b, \*</sup>

<sup>a</sup> Institute of Virology, Charité – Universitätsmedizin Berlin, Freie Universität Berlin, Humboldt-Universität zu Berlin, Berlin Institute of Health, Berlin, Germany

<sup>b</sup> Section Molecular Immunology, Institute of Immunology, Heidelberg University Hospital, Heidelberg, Germany

- ROS induzieren oxidativen Stress → eine Hauptursache für lokale/systemische Gewebeschäden → führt zu schweren COVID-19 Verläufen
- therapeutische Gegensteuerung durch Antioxidantien wie Vitamin C oder NAC und/oder durch Antagonisierung der ROS-Produktion

# Freie Radikale und COVID-19



# Schutz-Systeme

## Antioxidatives Schutzsystem

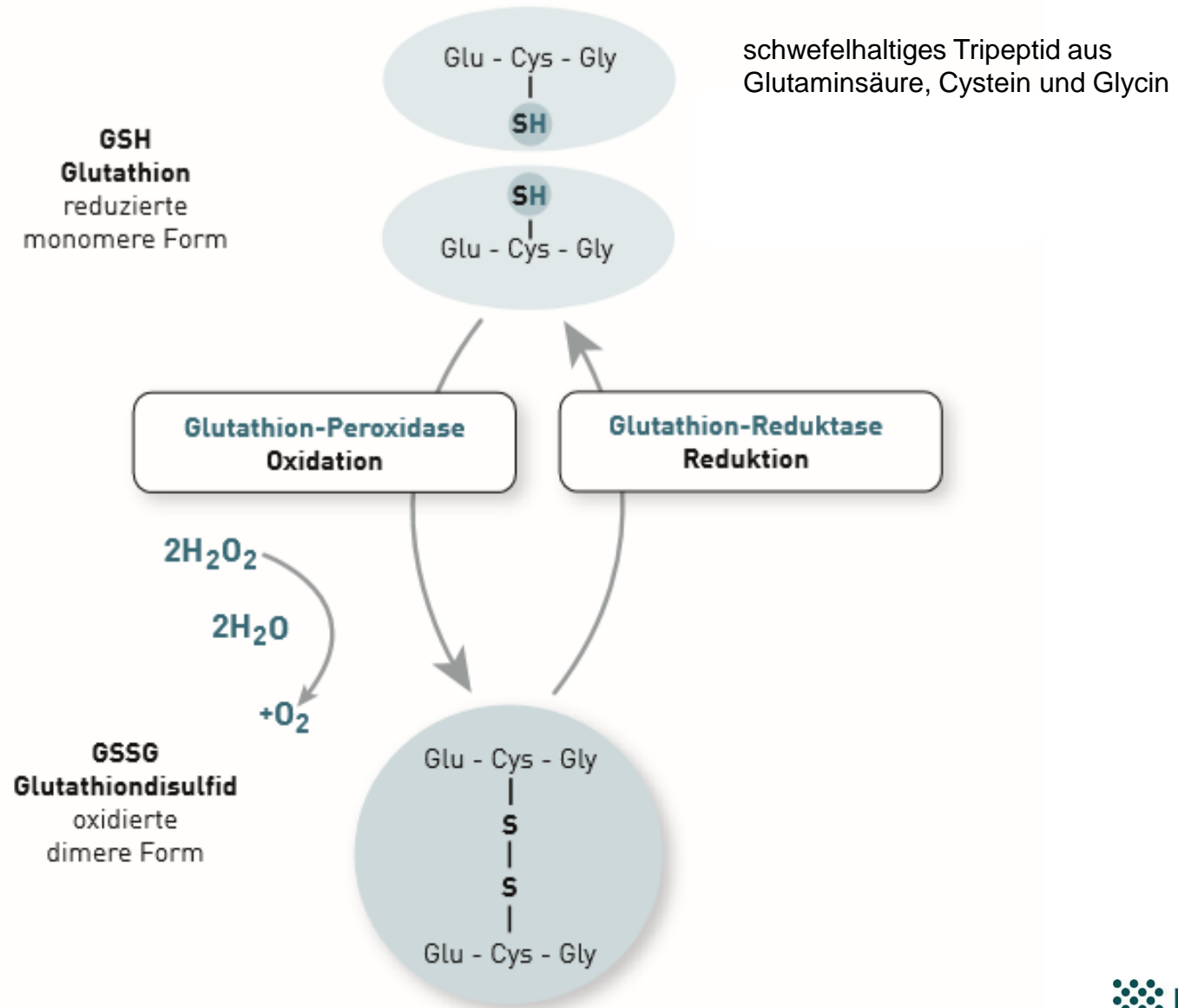
→ enzymatische und nichtenzymatische Radikalfänger und Antioxidantien

- Gluthathion (GSH)
- Superoxid-Dismutase (SOD)
- Gluthathion-Peroxidase (GPX)
- Coenzym Q10
- Liponsäure
- Vitamin C
- Vitamin E (lipophil, daher v.a. Schutz vor Lipidperoxidation)
- Vitamin B12 (Gegenspieler des NO•)
- Kupfer, Zink, Eisen, Mangan und Selen als Kofaktoren der Enzyme des antioxidativen Systems

## Sekundärer Schutz

= Reparaturmechanismen der DNA und geregelte Degradation von Proteinen

# Glutathion wirkt antioxidativ



# Gradmesser für die antioxidative Kapazität

## Intrazelluläres Glutathion

### Ärztlicher Befundbericht

**Material: 1x Heparinblut**

**Untersuchung**

**Ergebnis Einheit**

**Referenzbereich**

#### Klinische Immunologie

Glutathion (GSH) intrazellulär

in T-Lymphozyten (CD3)

**14696**

mfi

> 21600

in Monozyten (CD14)

**46669**

mfi

> 66600

in NK-Zellen (CD16/56)

**18005**

mfi

> 30500

**Reduziert in allen 3 Zellpopulationen → Hinweis auf reduzierte Neusynthese**

Glutathion (GSH) intrazellulär

in T-Lymphozyten (CD3)

**16611**

mfi

> 21600

in Monozyten (CD14)

72574

mfi

> 66600

in NK-Zellen (CD16/56)

**29467**

mfi

> 30500

**Reduziert in T- und NK-Zellen → Folge einer zellulären Immunaktivierung**

**Hinweis:** T-Lymphozyten zirkulieren bis zu 3 Monaten im Blut, NK-Zellen 4-7 Tage und Monozyten weniger als 24 Stunden.

# Gradmesser für die antioxidative Kapazität

Coenzym Q10 (Ubichinon) / Liponsäure / Vitamin B12

## Ärztlicher Befundbericht

**Material: Vollblut, 1x EDTA-Blut, Serum, 1x Heparinblut**

Untersuchung	Ergebnis	Einheit	Referenzbereich
<b>Klinische Immunologie</b>			
TNF-alpha i.S. (CLIA)	5.4	pg/ml	< 8.1
MDA-LDL i.S. (EIA)	<b>34.4</b>	U/l	< 35
Coenzym Q10 (Ubichinon 50) i.S. Präventiv sollten Werte > 2,5 mg/l angestrebt werden.	<b>1.67</b>	mg/l	> 1.70
alpha Liponsäure i.S.°° (LC-MS) Bitte beachten Sie den geänderten Referenzbereich (März 2021)!	743	µg/l	> 12.5

### Bioaktive Vitaminanalytik

Der Test erfasst den Gehalt an bioaktivem Vitamin im Patientenblut durch Messung des Wachstums selektiv Vitamin-abhängiger Indikatormikroorganismen.

Vitamin B1 bioaktiv i.EDTA Blut	>60.0	µg/l	> 39.8
Vitamin B2 bioaktiv i.S.	300	µg/l	> 85.4
Vitamin B6 bioaktiv i.S.	13.1	µg/l	> 10.1
Vitamin B12 bioaktiv i.S.	448	ng/l	> 358
Folsäure bioaktiv i. EDTA-Blut	>160	µg/l	> 100
Biotin (Vitamin H) bioaktiv i.S.	1671	ng/l	> 1250
Vitamin B3 (Nicotinamid) bioaktiv	51.2	µg/l	> 17.0
Pantothersäure (B5) bioaktiv i.S.	>147	µg/l	> 36.0

# Zusammenfassung

- Entstehung von freien Radikalen (ROS/RNS) im Organismus ist physiologisch
- neutrophile Granulozyten nutzen freie Radikale zur Erregerabwehr
- oxidativer/nitrosativer Stress ist nur das Missverhältnis zwischen Entstehung von ROS/RNS und deren Reduktion
- proentzündliche Mediatoren aktivieren die iNOS, NADPH-Oxidase und andere Enzyme fördern oxidativen bzw. nitrosativen Stress
- MDA-LDL und Nitrotyrosin sind Biomarker für den oxidativen bzw. nitrosativen Stress
- pro- und antioxidative Therapiemaßnahmen werden häufig gleichzeitig verabreicht (z.B. Immunstimulation + antioxidative Therapie)
- zum Monitoring einer oxidativen Therapie die „Respiratory Burst-Aktivität“ bestimmen