

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?

- Sehr reaktionsfreudige, instabile Sauerstoffmoleküle oder Atome, denen ein Elektron fehlt => „Elektronenklau“
- Zwischenprodukte des Stoffwechsels, die ständig in jeder Zelle des menschlichen Körpers entstehen

Was sind freie Radikale?

- Sehr reaktionsfreudige, instabile Sauerstoffmoleküle oder Atome, denen ein Elektron fehlt => „Elektronenklau“
- Zwischenprodukte des Stoffwechsels, die ständig in jeder Zelle des menschlichen Körpers entstehen
- können durch endogene oder exogene Faktoren entstehen
- können zu oxidativem und nitrosativem Stress führen

Was sind freie Radikale?

- Sehr reaktionsfreudige, instabile Sauerstoffmoleküle oder Atome, denen ein Elektron fehlt => „Elektronenklau“
- Zwischenprodukte des Stoffwechsels, die ständig in jeder Zelle des menschlichen Körpers entstehen
- endogene oder exogene Faktoren können Überschuss erzeugen
- Folgen sind oxidativer und nitrosativer Stress
- funktionelle Moleküle werden zu dysfunktionalen umgewandelt
- durch molekulare Veränderungen der DNA entstehen Mutationen und andere DNA-Schäden

Was sind freie Radikale?

O₂^{-•} Hyperoxid-Anion = Superoxid-Anion

HO• Hydroxyl-Radikal

H₂O₂ Wasserstoffperoxid

HOO• Perhydroxyl-Radikal

ROS

„**R**eactive **O**xygen **S**pecies“

⇒ Oxidativer Stress

NO• Stickoxidradikal

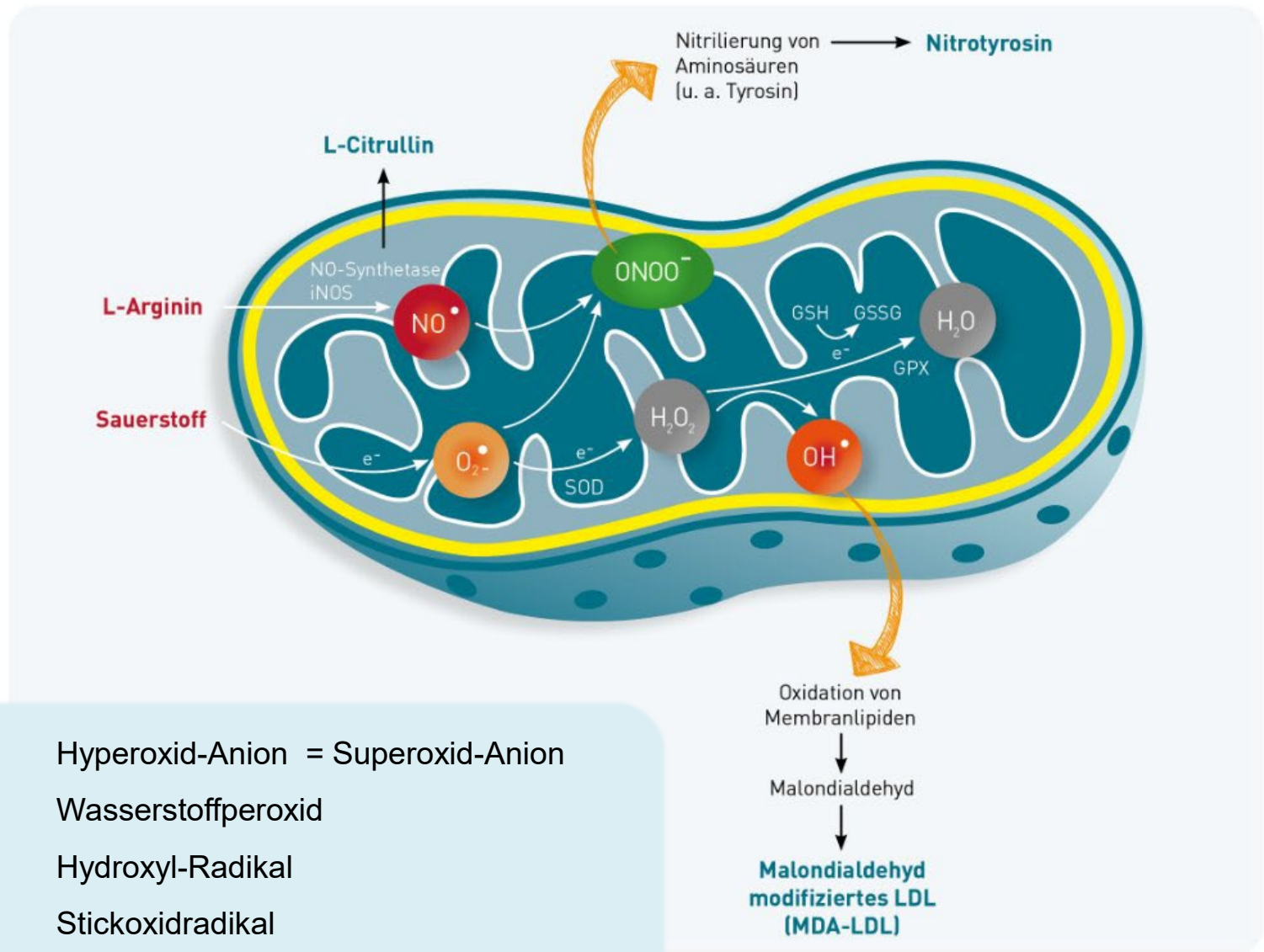
ONOO⁻ Peroxynitrit-Anion

RNS

„**R**eactive **N**itrogen **S**pecies“

⇒ Nitrosativer Stress

Sauerstoffradikale entstehen u.a. in Mitochondrien



O ₂ ^{•-}	Hyperoxid-Anion = Superoxid-Anion
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HO•	Hydroxyl-Radikal
NO•	Stickoxidradikal
ONOO ⁻	Peroxynitrit-Anion

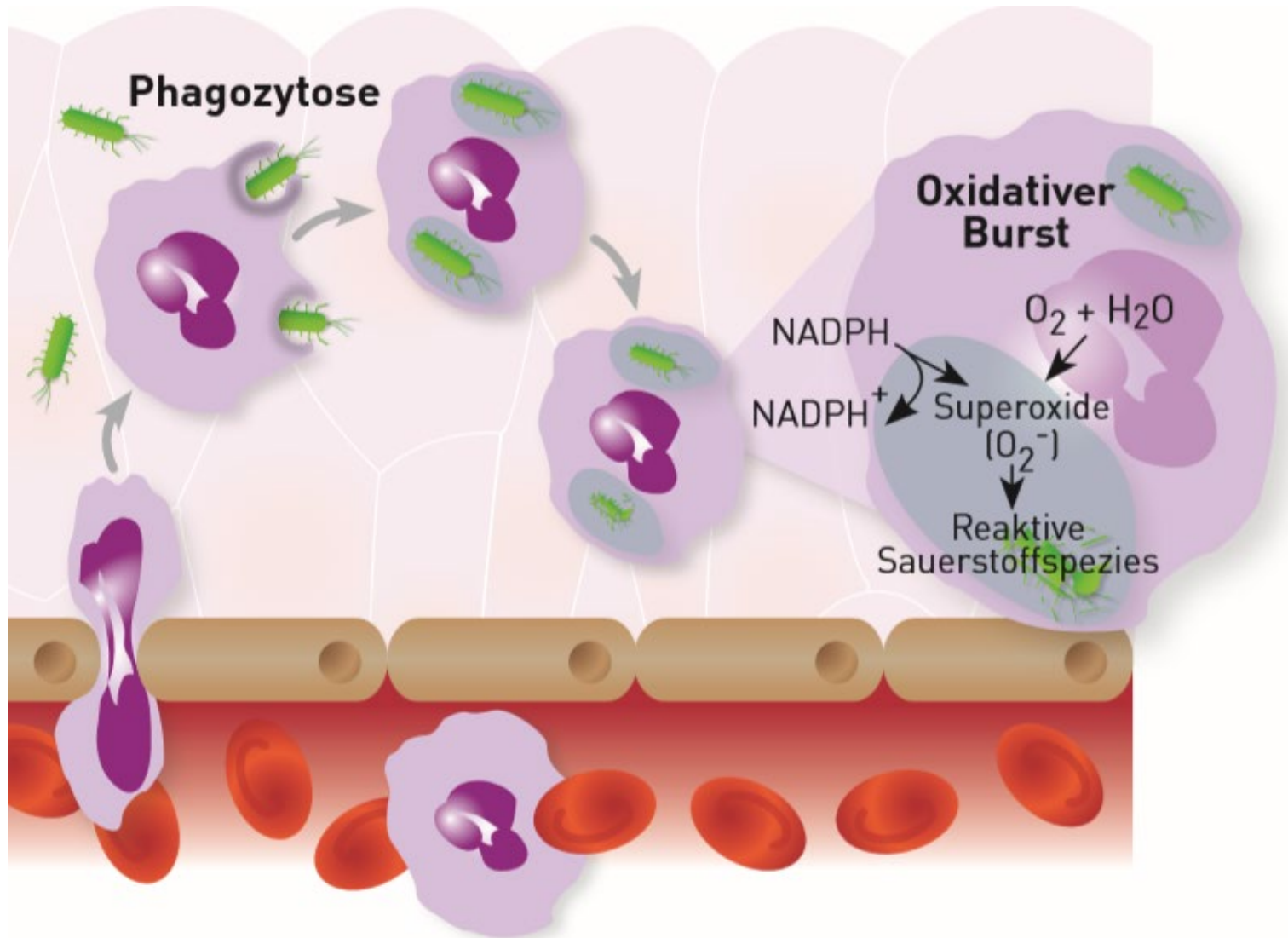
Wann entstehen freie Radikale?

physiologisch:

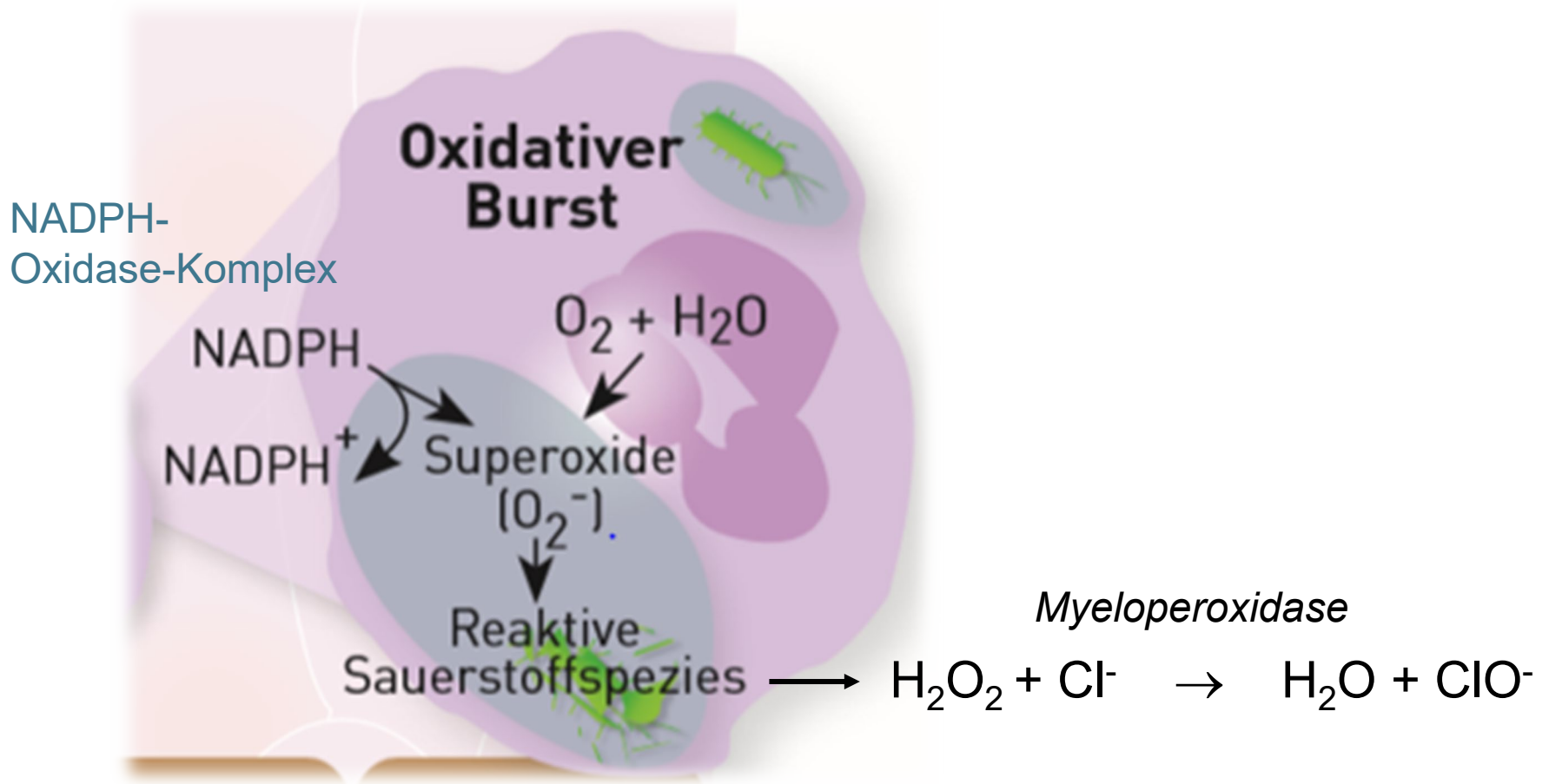
- in Mitochondrien als Nebenprodukt der Zellatmung
- im Neurotransmitterstoffwechsel im Gehirn
- in phagozytierenden Immunzellen
→ neutrophile Granulozyten

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

Beim oxidativen Burst werden Sauerstoff-Radikale produziert



Oxidativer Burst im Inneren der Phagolysosomen



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

Nachweis einer intakten Granulozytenfunktion anhand des Oxidativen Burst

Untersuchung	Ergebnis	Einheit	Referenzbereich
<u>Granulozytenfunktion</u>	.		
Freisetzung von reaktiven Sauerstoffmetaboliten nach Stimulation. (Heparin-Blut)			
Burst-positive Zellen	98.7	%	> 90
Stimulationsindex E.coli	67		> 23
Stimulationsindex PMA	42		> 23
Interpretation	.		
Kein Hinweis auf einen Defekt der Phagozytose oder des oxidativen Burst. Eine septische Granulomatose (CGD) oder eine Beeinflussung der Granulozytenfunktion durch Medikamente ist damit ausgeschlossen.			

Stimulation mit E. coli ⇒ Phagozytose der Bakterien + Aktivierung ROS-produzierender Enzyme
Stimulation mit PMA ⇒ Aktivierung ROS-produzierender Enzyme ohne Phagozytose

Reduzierter Oxidativer Burst, reduzierte Abwehrfunktion

Untersuchung	Ergebnis	Einheit	Referenzbereich
<u>Granulozytenfunktion</u>	.		
Freisetzung von reaktiven Sauerstoffmetaboliten nach Stimulation. (Heparin-Blut)			
Burst-positive Zellen	97.7	%	> 90
Stimulationsindex E.coli	11		> 23
Stimulationsindex PMA	12		> 23
Interpretation	.		
Verminderte Produktion von Sauerstoffradikalen nach Stimu- lation mit E. coli und PMA in neutrophilen Granulozyten.			

- in seltenen Fällen CGD = septische Granulomatose
- 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 $\text{TNF-}\alpha$ und $\text{IL-1}\beta$ auf Granulozyten

Ursachen für eine sekundäre (latente) Störung des Oxidativen Burst

1. Akute und chronische systemische Entzündungen

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

2. Antioxidative Therapien

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

Ursachen für eine sekundäre (latente) Störung des Oxidativen Burst

1. Akute und chronische systemische Entzündungen

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

2. Antioxidative Therapien

- z.B. Vitamine C und 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!

Untersuchung

Granulozytenfunktion

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

Burst-positive Zellen

86.3

%

> 90

Stimulationsindex E.coli

34

> 23

Stimulationsindex PMA

13

> 23

Interpretation

Leicht verminderte Burst-positive Granulozyten.

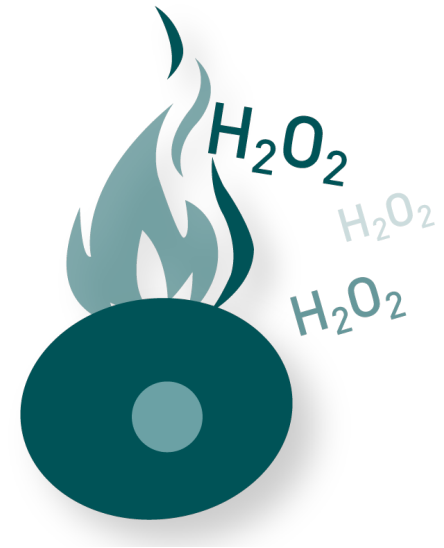
Verringerte 123-DHR-Fluoreszenz nach Aktivierung mit PMA.

Dieses Ergebnis spricht für eine Verminderung der oxidativen
Burst-Kapazität der Neutrophilen Granulozyten. Diese kann
hervorgerufen werden durch:

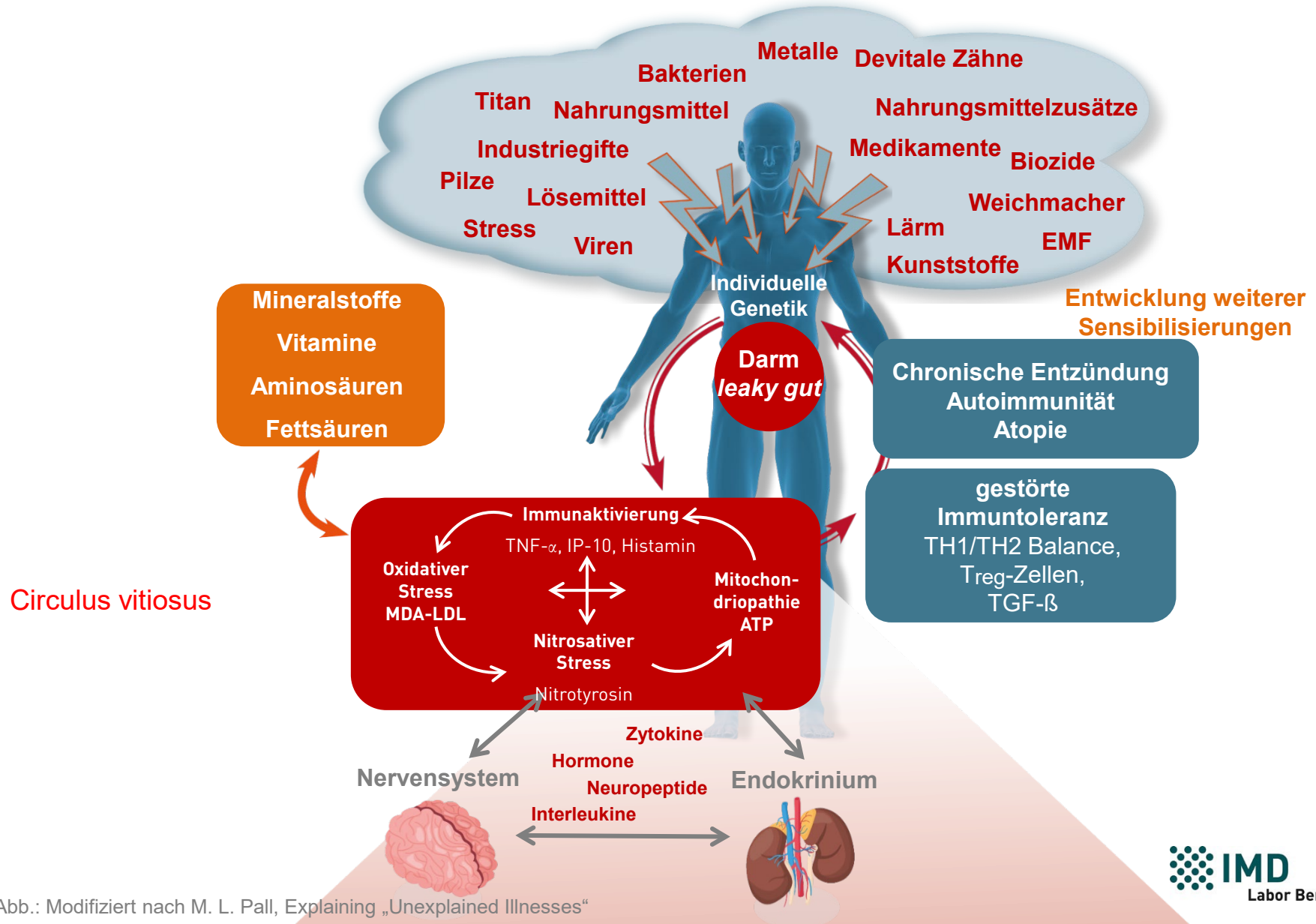
- Gabe von Antioxidantien, z.B. Acetylcystein
- Schwere Infektionen
- hohes Alter
- Medikamente (Chlortetrazyklin, Amphotericin B, Amoxycillin,
Doxycyclin, Tetrazyklin, Sulfomethoxazol, Rifampicin,
Fucidinsäure, Erythromycin, Clindamycin, Tobramycin)

Was bedeutet oxidativer und nitrosativer Stress?

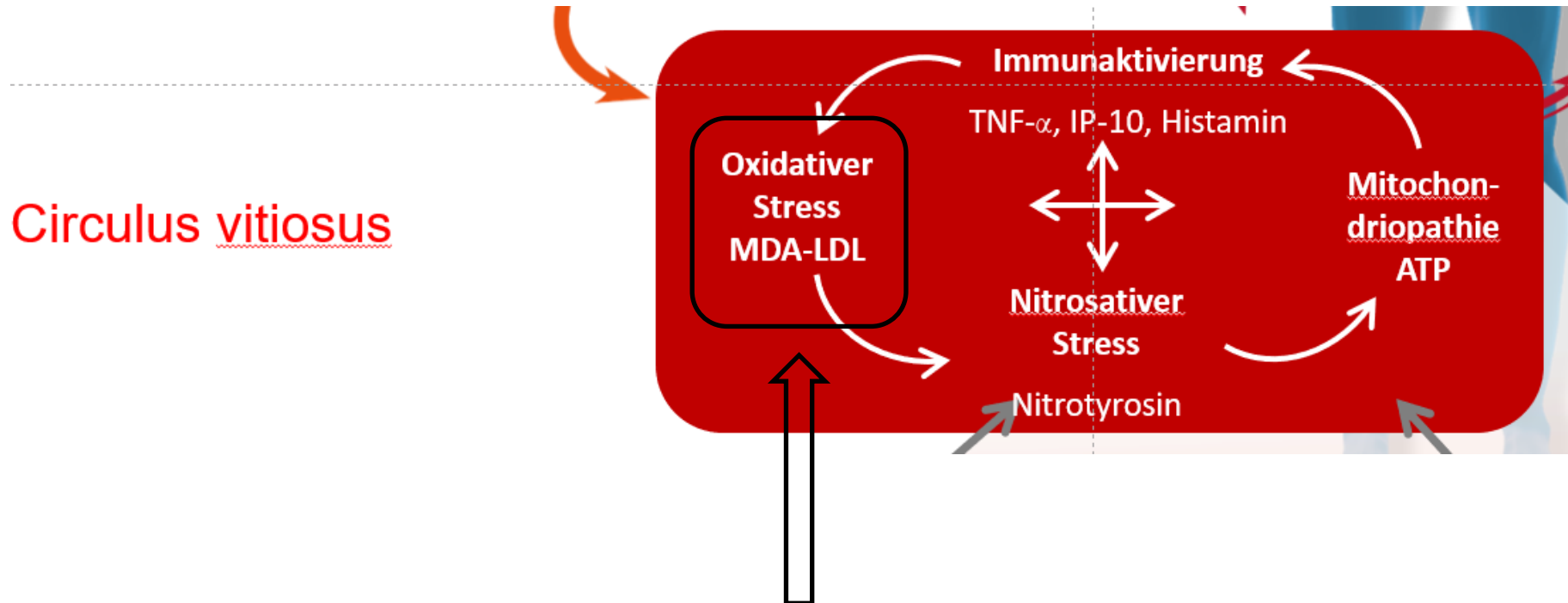
⇒ Stoffwechselleage, bei der im Organismus eine Menge an ROS und RNS gebildet wird, die das normale physiologische Ausmaß überschreitet



Freie Radikale sind „Brennstoff“ des Circulus vitiosus bei Multisystemerkrankungen



Freie Radikale sind „Brennstoff“ des Circulus vitiosus bei Multisystemerkrankungen



Zu starker Anstieg von Sauerstoffradikalen führt zu oxidativem Stress, was in der Folge zu nitrosativem Stress führt.

Wann entstehen freie Radikale?

physiologisch:

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

pathophysiologisch

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

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)

Diagnostik: **MDA-LDL**

➤ Proteinoxidation

- Strukturänderung von Proteinen:
 - Fragmentierung der Polypeptidkette (Zerlegung in zwei Stränge)
 - Aminosäuren sind der Hauptangriffspunkt in Proteinen für freie Radikale (v.a. Prolin, Arginin, Lysin, Threonin)
 - Bildung von Protein-Cross-Links
 - Funktionsverlust → Akkumulation in der Zelle

Diagnostik: **Carbonylproteine**

Welche Folgen hat oxidativer Stress?

➤ Schädigung der DNA

- Einzel- oder Doppelstrangbrüche, Basenveränderungen (v.a. Guanin ist anfällig für Oxidation)
- führt zu Mutationen, beschleunigter Zellalterung, Apoptose bzw. unkontrolliertem Zellwachstum

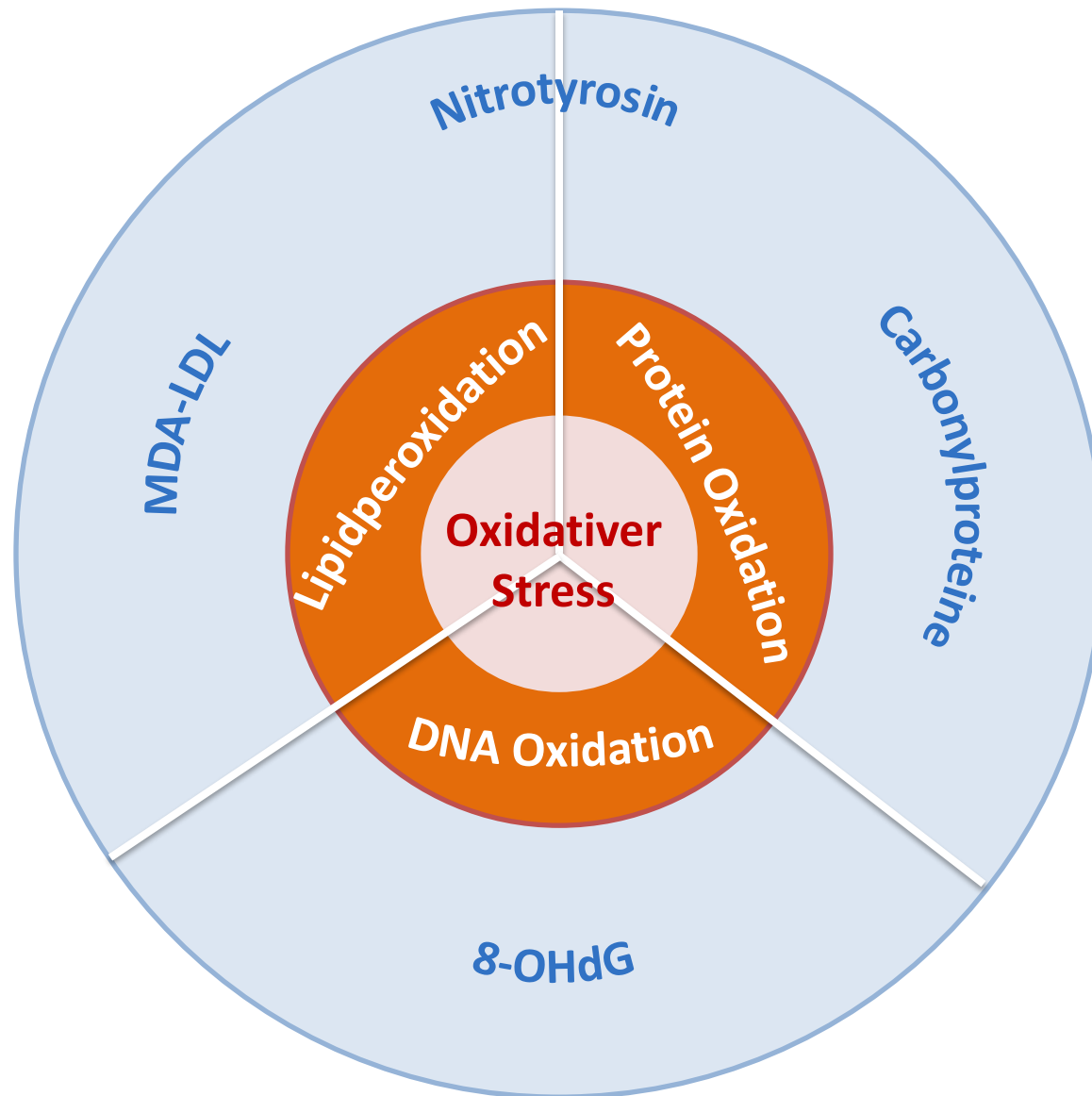
Diagnostik: **8-OHdG** (8-Hydroxydesoxyguanosin)

➤ Nitrosativer Stress

- Sauerstoffradikale (ROS) fördern die Bildung von Stickstoffmonoxid (NO), welches bei Überschuss zu Peroxynitrit (ONOO^-) reagiert
- Peroxynitrit (ONOO^-) schädigt Zellen und Mitochondrien
- Folgen sind: mitochondriale Dysfunktion, neurologische Symptome, chronische Erkrankungen, Organschäden

Diagnostik: **Nitrotyrosin**

Biomarker für oxidativen und nitrosativen Stress



Biomarker für oxidativen und nitrosativen Stress

Untersuchung	Ergebnis	Einheit	Referenzbereich
Klinische Immunologie			
→ MDA-LDL i.S. Erhöhtes MDA-modifiziertes LDL als Hinweis auf Lipidperoxidation als Folge eines signifikanten oxidativen Stress.	++ 84.0	U/l	< 70
→ Carbonylproteine i.S. Eine erhöhte Carbonylierung von Proteinen ist Hinweis auf eine verstärkte Bildung von Sauerstoffradikalen und oxidativen Stress.	++ 95.5	IU/ml	< 77.3
→ Nitrotyrosin i.S. Das erhöhte Nitrotyrosin weist auf eine gesteigerte Bildung von Stickstoffmonoxid (NO) und Peroxynitrit hin (nitrosativer Stress).	++ 678	nmol/l	

oxidativer Stress

nitrosativer Stress

Oxidativer und nitrosativer Stress stören die Mitochondrienfunktion

- Stickoxidradikal ($\text{NO}\bullet$) und Peroxynitrit-Anion (ONOO^-)
hemmen die Cytochrom C-Oxidase der mitochondrialen
Atmungskette

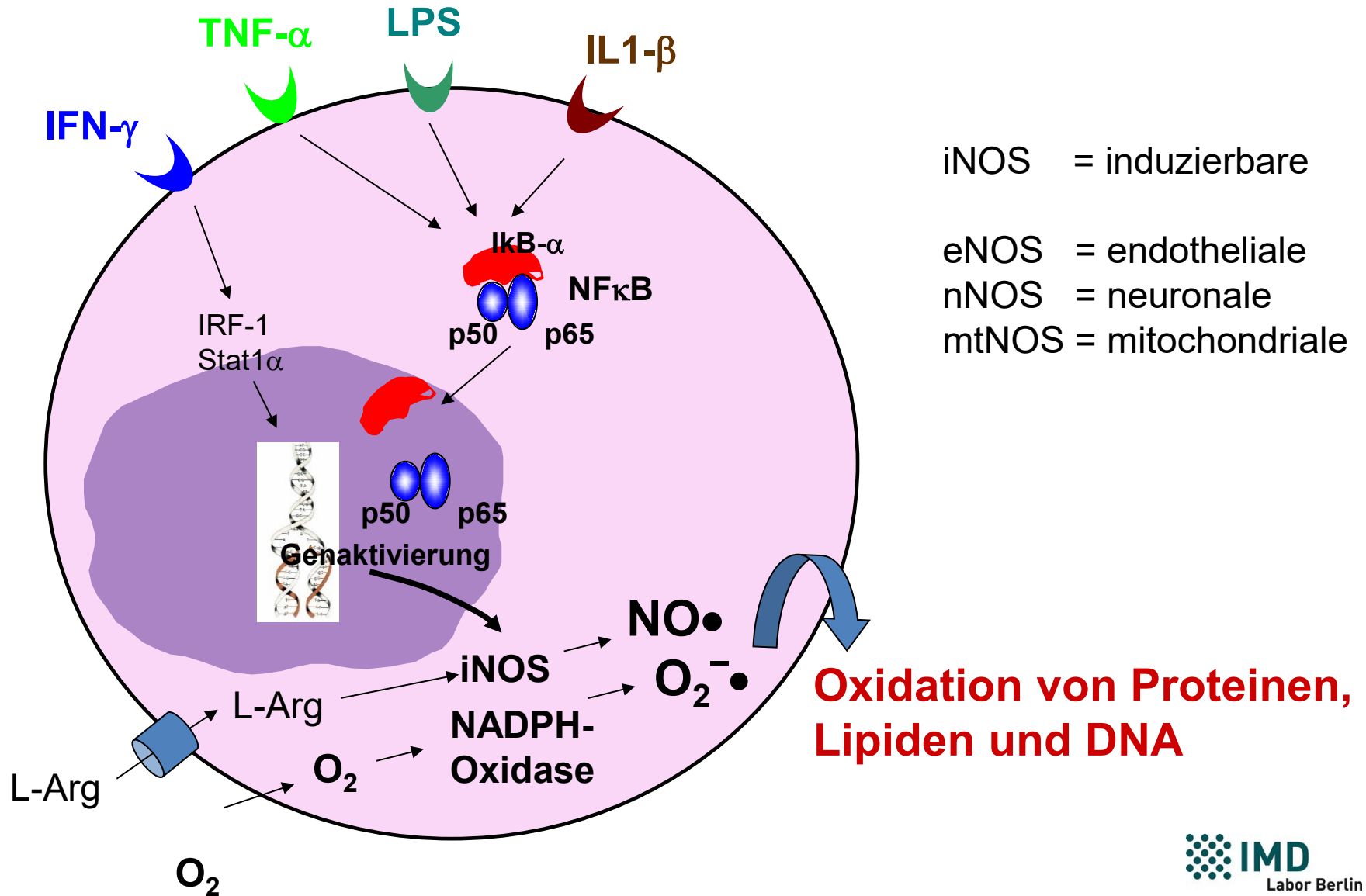
→ Hemmung der ATP-Synthese
- v.a. Superoxid- und Peroxynitrit-Anionen ($\text{O}_2^-\bullet$ und ONOO^-)
stören die Struktur der inneren Mitochondrienmembran

→ Zelluntergang

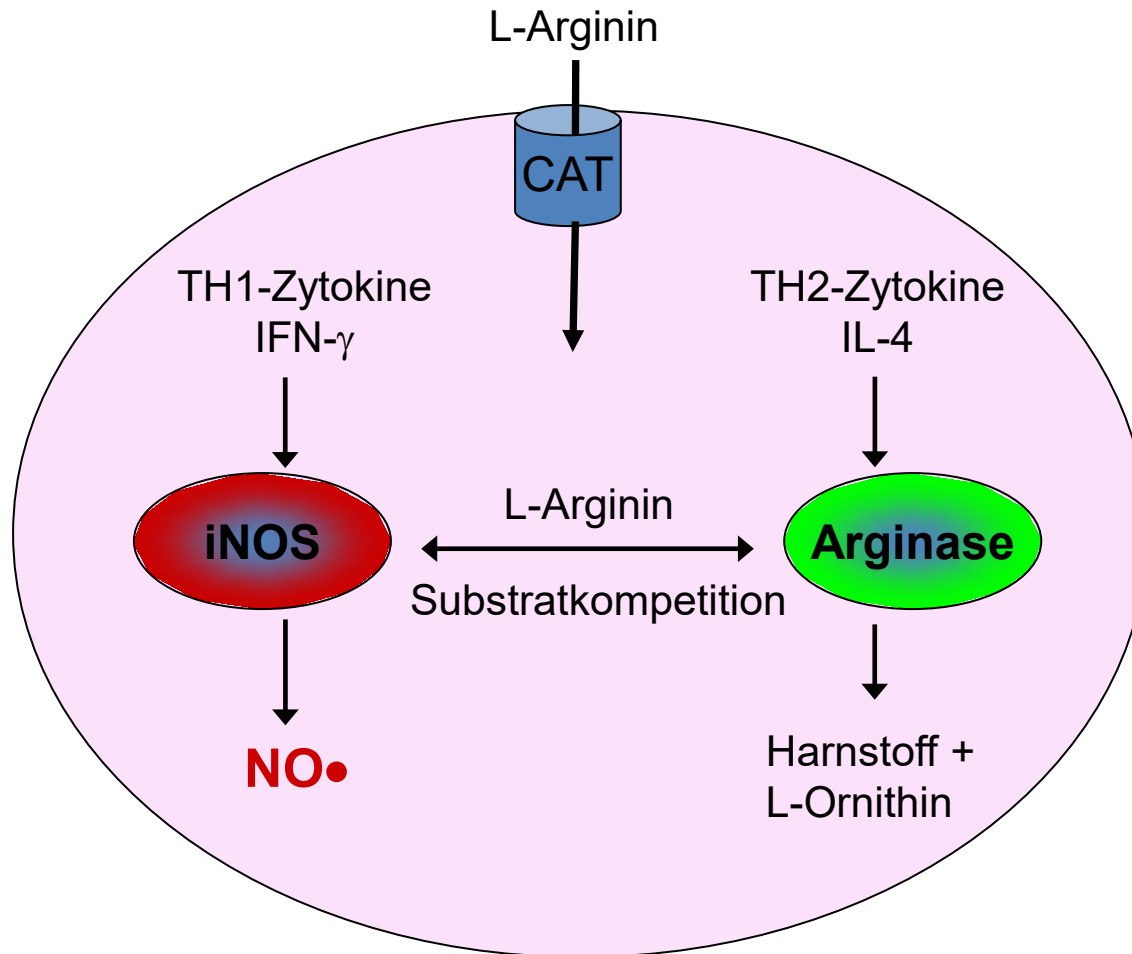
Oxidativer und nitrosativer Stress stören die Mitochondrienfunktion

Untersuchung	Ergebnis	Einheit	Referenzbereich
Klinische Immunologie			
→ MDA-LDL i.S. Erhöhtes MDA-modifiziertes LDL als Hinweis auf Lipidperoxidation als Folge eines signifikanten oxidativen Stress.	(ELISA) ++ 84.0	U/l	< 70
→ Carbonylproteine i.S. Eine erhöhte Carbonylierung von Proteinen ist Hinweis auf eine verstärkte Bildung von Sauerstoffradikalen und oxidativen Stress.	(ELISA) ++ 95.5	IU/ml	< 77.3
→ Nitrotyrosin i.S. Das erhöhte Nitrotyrosin weist auf eine gesteigerte Bildung von Stickstoffmonoxid (NO) und Peroxynitrit hin (nitrosativer Stress).	(ELISA) ++ 678	nmol/l	nitrosativer Stress
→ ATP intrazellulär ^{oo} Der Messwert bezieht sich standardisiert auf 2x10 ⁶ PBMC. Vermindertes intrazelluläres ATP als Hinweis auf eine gestörte Mitochondrienfunktion der Leukozyten.	(CLIA) -- 1.04	µM	Energie-Defizit .5

Entzündung aktiviert die iNOS (induzierbare NO-Synthetase)



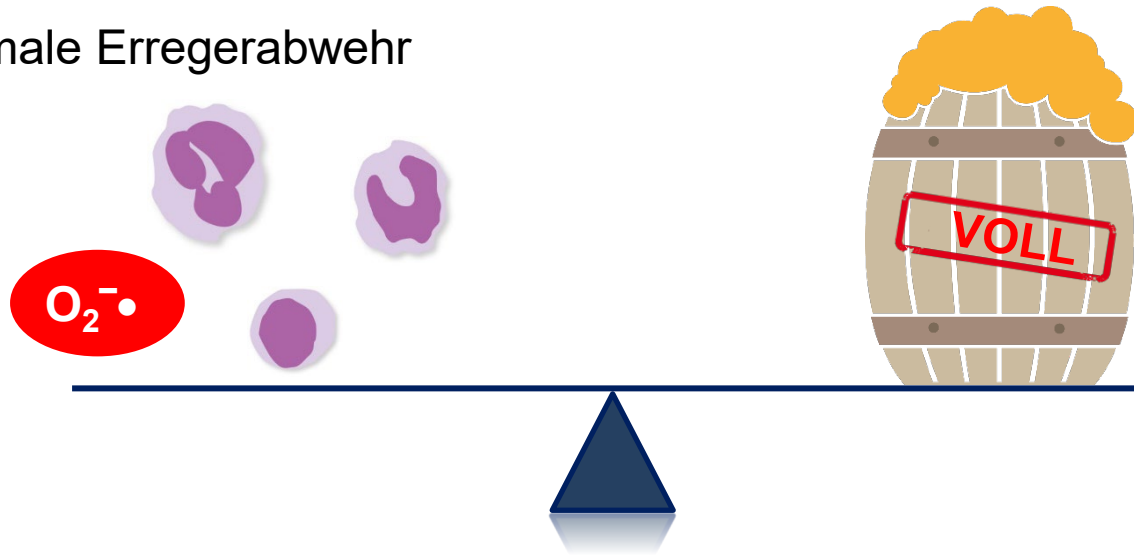
TH2-Dominanz: Selbstschutzmechanismus bei Patienten mit chronisch entzündlichen Erkrankungen?



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

Balance zwischen ROS/RNS und Antioxidantien

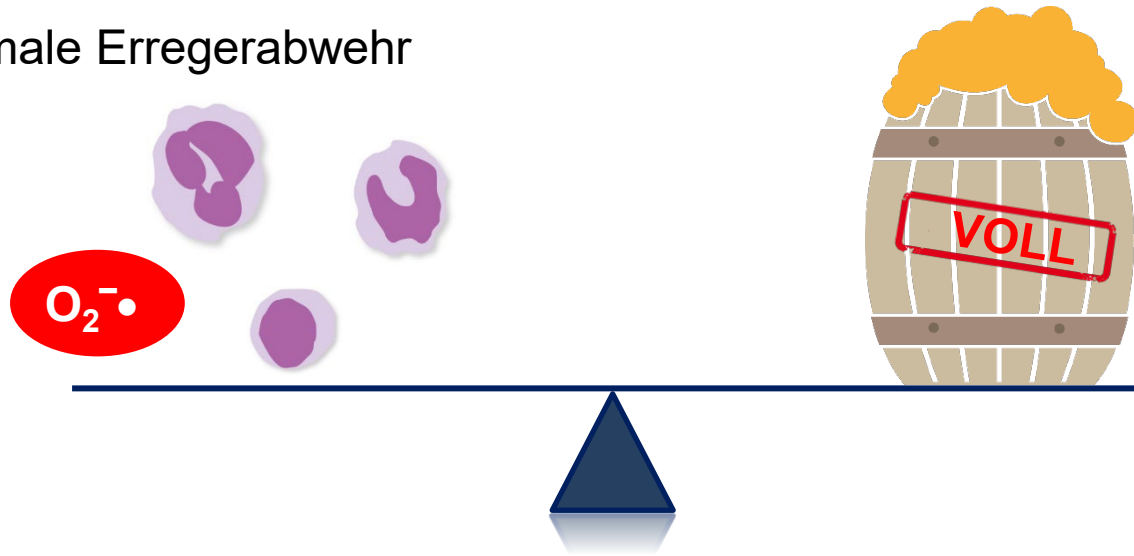
Normale Erregerabwehr



Antioxidantien-Status

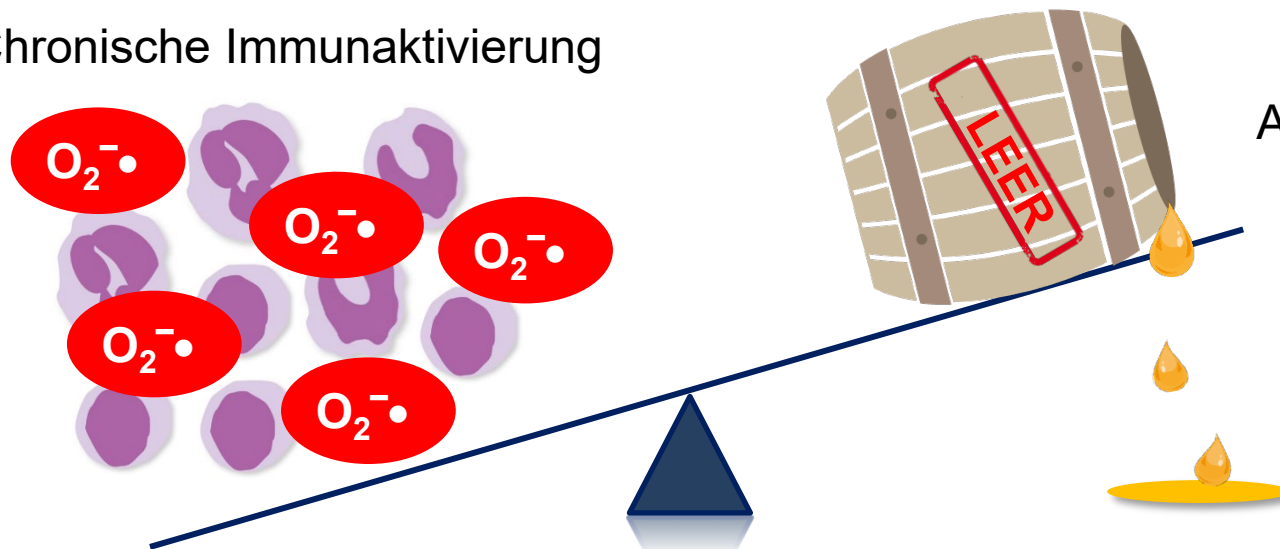
Balance zwischen ROS/RNS und Antioxidantien

Normale Erregerabwehr



Antioxidantien-Status

Chronische Immunaktivierung



Antioxidantien-Status

Antioxidative Kapazität wichtig!

Antioxidatives Schutzsystem

→ enzymatische und nichtenzymatische Radikalfänger und Antioxidantien

- Glutathion (GSH)
- Extrazelluläre Thiolgruppen
- Superoxid-Dismutase (SOD)
- Glutathion-Peroxidase (GPX)
- Coenzym Q10 (stabilisiert auch Zellmembranen, regeneriert Vitamin E)
- alpha-Liponsäure (recycelt auch Antioxidantien wie Vitamin C, E und GSH)
- Vitamin C
- Vitamin E (lipophil, daher v.a. Schutz vor Lipidperoxidation)
- Vitamin B12 (Gegenspieler des NO•)
- Kupfer, Zink, Eisen, Mangan und Selen (Kofaktoren der Enzyme des antioxidativen Systems)
- Polyphenole und Carotinoide (wirken antientzündlich)

Sekundärer Schutz

= Reparaturmechanismen der DNA und geregelte Degradation von Proteinen

Wirkmechanismus der Antioxidantien

- **Elektronen-Donor**

Vitamin C und E => stabilisieren freie Radikale und reduzieren Reaktivität

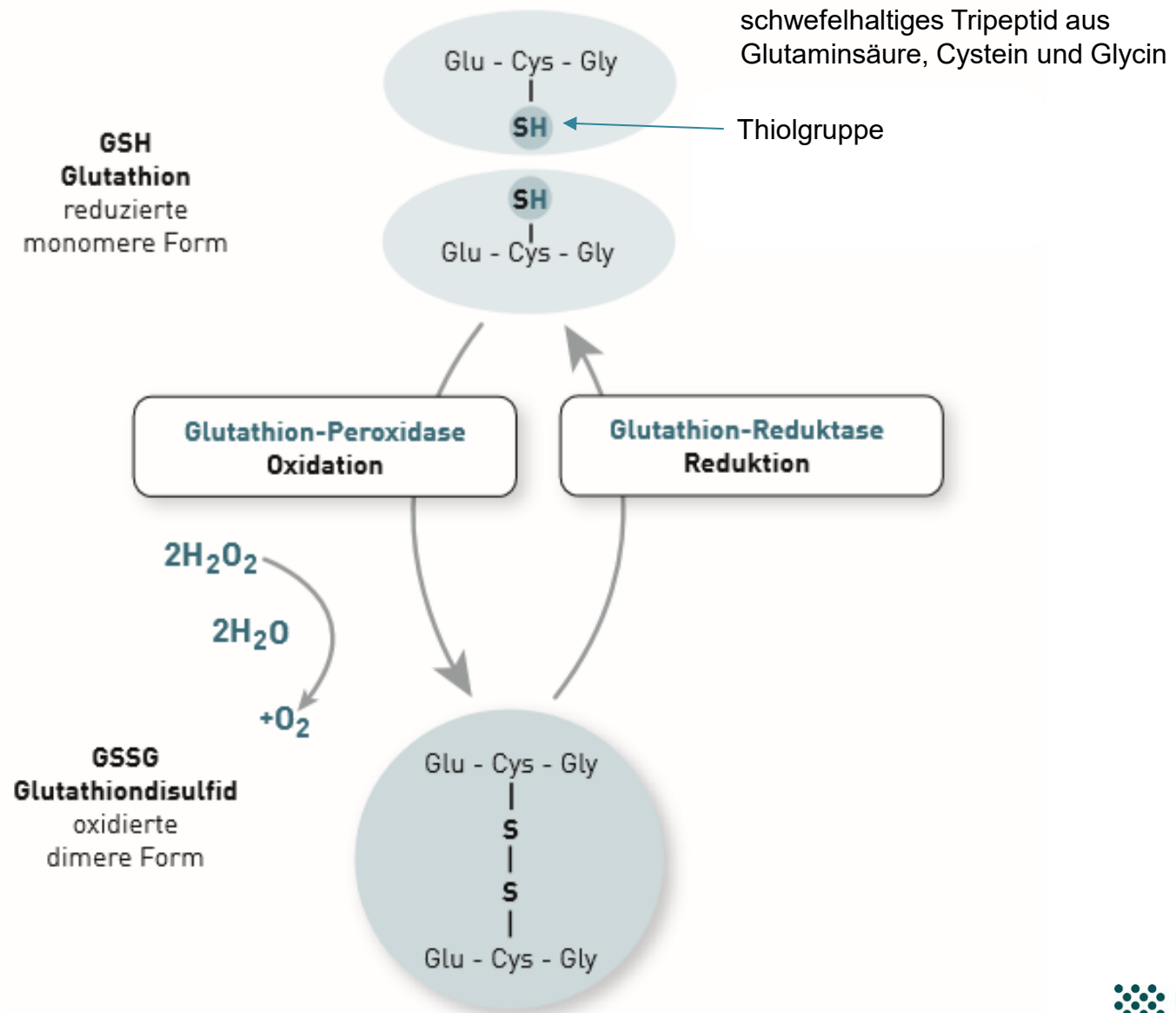
- **Radikalfänger**

Polyphenole bilden stabile Komplexe mit freien Radikalen

- **Katalytische Reaktion**

Enzymatische Antioxidantien (SOD, Glutathionperoxidase) wandeln freie Radikale in harmlose Moleküle um (Wasser oder Sauerstoff)

Intrazelluläres Glutathion wirkt antioxidativ



Intrazelluläres Glutathion wirkt antioxidativ

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

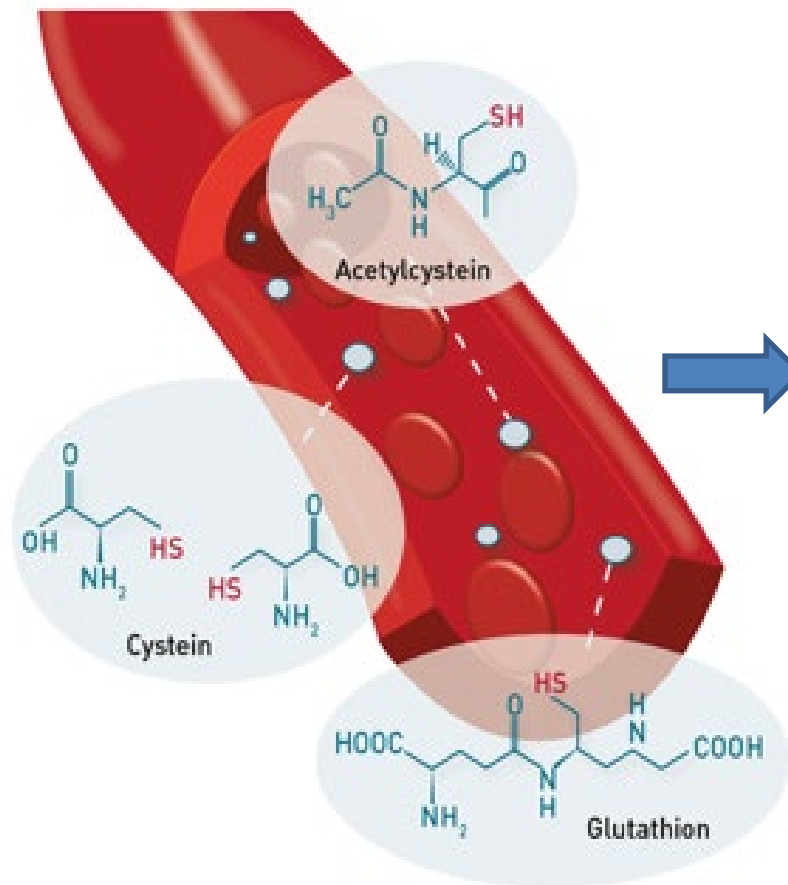
> 30500

Reduziert in allen 3 Zellpopulationen→ Hinweis auf reduzierte Neusynthese

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

Extrazelluläre Thiole wirken antioxidativ

Freie Thiole



Im Serum zirkulierende Moleküle mit freien SH-Gruppen [Thiole]



Labor Berlin

Ärztlicher Befundbericht

Untersuchung

Ergebnis

Einheit

Referenzbereich

Thiol-Status im Serum

291

μmol/l

> 361

Verminderte antioxidative- und Metall-Entgiftungskapazität. Thiole nehmen eine wichtige Rolle bei der extrazellulären Neutralisation von radikalischen Sauerstoffspezies (ROS) ein. Des Weiteren tragen sie durch Bindung von toxischen Metallen zu ihrer Entgiftung bei.

weitere Gradmesser für die antioxidative Kapazität

Coenzym Q10 / alpha-Liponsäure / Vitamin B12...

Material: Vollblut 3, Vollblut, Vollblut 2, Heparinblut, EDTA-Blut,

Untersuchung

Ergebnis Einheit

Referenzbereich

Mikronährstoffe

25-Hydroxy-Vitamin-D i.S. (CMIA) -- 28 ng/ml 30 - 100

Unzureichende Vitamin D (25-OH) Versorgung.

→ Coenzym Q10 (Ubichinon 50) i.S.°° - 0.43 mg/l > 0.60

Die Analyse erfolgt mittels UHPLC.

Hinweis auf einen latenten Mangel an Coenzym Q10 im Serum.

Bitte beachten Sie, dass die vorliegende Gesamt-Q10-Konzentration in der Regel mit einem reduzierten Anteil an antioxidativ wirksamen (reduziertem) Q10 einhergeht. Dieses Verhältnis kann durch Supplementierung verbessert werden.

→ alpha Liponsäure i.S. (LC-MS) -- 12.3 µg/l > 12.5

Ein Defizit an alpha-Liponsäure kann die antioxidative Kapazität beeinträchtigen.

Vitamin B1 bioaktiv i. EDTA-Blut -- 38.7 µg/l > 39.8

Vitamin B2 bioaktiv i.S. >300 µg/l > 85.4

Vitamin B3 (Nicotinamid) bioaktiv >80.0 µg/l > 17.0

→ Vitamin B12 bioaktiv i.S. -- 316 ng/l > 358

weitere Gradmesser für die antioxidative Kapazität

Mineralstoffprofil

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	27,2 mg/l	30 - 40		-20 %
Selen	75,6 µg/l	90 - 230		-29 %
Zink	4,1 mg/l	4,5 - 7,5		-24 %
Calcium	56 mg/l	55 - 70		-8 %
Kalium	1616 mg/l	1386 - 1950		2 %
Natrium	1723 mg/l	1500 - 1850		5 %
Phosphor	444 mg/l	403 - 577		3 %
Chrom	0,15 µg/l	0,14 - 0,52		-37 %
Kupfer	0,71 mg/l	0,70 - 1,39		-13 %
Mangan	5,3 µg/l	8,3 - 15,0		-53 %
Molybdän	0,4 µg/l	0,3 - 1,3		-20 %

Wechselwirkungen mit toxischen Metallen:

Aluminium	10,2 µg/l	< 11,4		
Arsen	1,8 µg/l	< 1,2		
Blei	19,4 µg/l	< 28		
Cadmium	0,3 µg/l	< 0,6		
Nickel	1,4 µg/l	< 3,8		
Quecksilber	2,7 µg/l	< 1,0		

weitere Gradmesser für die antioxidative Kapazität

Mineralstoffprofil

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	27,2 mg/l	30 - 40		-20 %
Selen	75,6 µg/l	90 - 230		-29 %
Zink	4,1 mg/l	4,5 - 7,5		-24 %
Calcium	56 mg/l	55 - 70		-8 %
Kalium	1616 mg/l	1386 - 1950		2 %
Natrium	1723 mg/l	1500 - 1850		5 %
Phosphor	444 mg/l	403 - 577		3 %
Chrom	0,15 µg/l	0,14 - 0,52		-37 %
Kupfer	0,71 mg/l	0,70 - 1,39		-13 %
Mangan	5,3 µg/l	8,3 - 15,0		-53 %
Molybdän	0,4 µg/l	0,3 - 1,3		-20 %

Wechselwirkungen mit toxischen Metallen:

Aluminium	10,2 µg/l	< 44,4		
Arsen	1,8 µg/l			⇒ gesteigerte Ausscheidung von Selen; fördert oxidativen Stress
Blei	19,4 µg/l	< 28		
Cadmium	0,3 µg/l	< 0,6		
Nickel	1,4 µg/l	< 3,8		
Quecksilber	2,7 µg/l			⇒ Bindung und Inhibition von Selen, Verdrängung von Eisen, Kupfer und Zink

Zusammenfassung

- Entstehung von freien Radikalen (ROS/RNS) im Organismus ist physiologisch
- neutrophile Granulozyten nutzen freie Radikale zur Erregerabwehr
- oxidativer/nitrosativer Stress ist das Missverhältnis zwischen Entstehung von ROS/RNS und deren Reduktion durch Antioxidantien
- proentzündliche Mediatoren aktivieren die iNOS; NADPH-Oxidase und andere Enzyme fördern oxidativen bzw. nitrosativen Stress
- MDA-LDL, Carbonylproteine, 8-OHdG und Nitrotyrosin sind Biomarker für den oxidativen bzw. nitrosativen Stress
- Antioxidative Therapie => ggf. Antioxidantien messen
- zum Monitoring einer antioxidativen Therapie die „Respiratory Burst-Aktivität“ der Granulozyten bestimmen