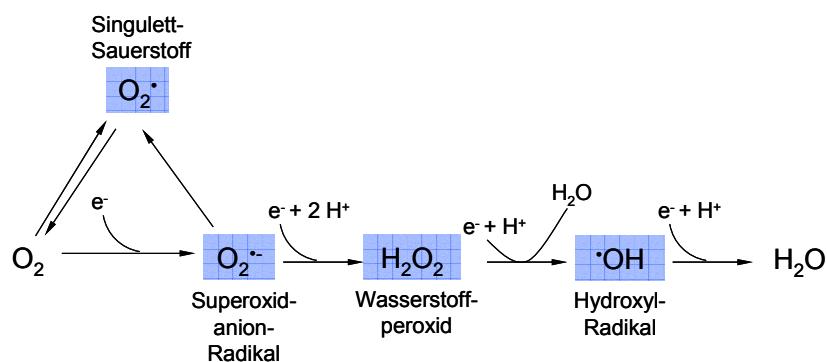


## 8 Reaktive Sauerstoffspezies

## 8 Reaktive Sauerstoffspezies

Reaktive Sauerstoffspezies (*Reactive Oxygen Species*, ROS) werden durch normale zelluläre Reaktionen in aeroben Organismen gebildet. Zu den ROS gehören neben Singulett-Sauerstoff die bei der Reduktion des Sauerstoffs zu Wasser auftretenden Zwischenprodukte: Superoxidanionen-Radikale ( $O_2^{\cdot-}$ ), Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) und Hydroxyl-Radikale ( $OH^{\cdot}$ ) (vgl. Abbildung 8.1). Häufig werden auch Hypochlorid ( $HOCl$ ), Peroxyl-Radikale ( $ROO^{\cdot}$ ), Alkoxy-Radikale ( $RO^{\cdot}$ ) und Stickstoffmonoxid ( $NO$ ) dazu gerechnet. Oxidations- und Destruktionsprozesse durch diese ROS können alle biologischen Makromoleküle, wie z.B. Lipide (insbesondere in den Zellmembranen), Proteine und die DNA betreffen und dabei zu letalen Zellschädigungen führen. Eine besondere Bedeutung für zytotoxische Effekte wird den Hydroxyl-Radikalen beigemessen, da sie als einzige ROS direkt mit biologischen Makromolekülen reagieren können.<sup>[5, 112, 174-177]</sup>



**Abbildung 8.1:** Die aktivierte Formen des Sauerstoffs. Dargestellt sind die Formen, die nach Aufnahme eines Elektrons durch Anlagerung von Protonen entstehen.<sup>[5, 175]</sup>

Wie aus Abbildung 8.1 ersichtlich, kann Wasserstoffperoxid durch Ein-Elektronen-Transfer in das stark oxidierende Hydroxyl-Radikal überführt werden. Mit einem Redoxpotential von +2 V ist diese Spezies in biologischen Systemen sehr kurzlebig, da sie mit fast jeder Art von Molekülen reagiert. Die Halbwertzeit liegt im Bereich von Mikrosekunden, wobei die meisten Reaktionen von  $OH^{\cdot}$  mit Biomolekülen lediglich diffusionslimitiert sind.<sup>[178]</sup>

Aerob lebende Organismen haben effektive Schutz- und Reparaturmechanismen aufgebaut, um ROS abzubauen und entstandene Schäden reparieren zu können. Ein Beispiel sind die in Abbildung 8.2 dargestellten enzymatischen Entgiftungsreaktionen.<sup>[5, 174, 177]</sup> Trotz allem sind ROS an der Entstehung verschiedener Krankheiten beteiligt, wie z.B. an Alzheimer, Parkinson, rheumatoider Arthritis, Atherosklerose und an Entzündungsprozessen.<sup>[174, 179]</sup>

Andererseits wird die gezielte Bildung von ROS in der Tumortherapie häufig genutzt. Ein Beispiel dafür ist die Photodynamische Therapie (PDT) mit Photosensitizern wie z.B. Temoporfin (Foscan®) und Verteporfin (Visudyne®), die systemisch oder auch direkt in den Tumor appliziert werden und mit Laserlicht einer geeigneten Wellenlänge aktiviert werden. Der dabei entstehende Singulett-Sauerstoff löst innerhalb seiner Diffusionsreichweite z.T. irreversible Zellschädigungen, wie Membrandestruktion, Nukleinsäureabbau und Störung des Energiestoffwechsels aus, die letztendlich zum Zelltod führen.<sup>[176, 180-182]</sup>

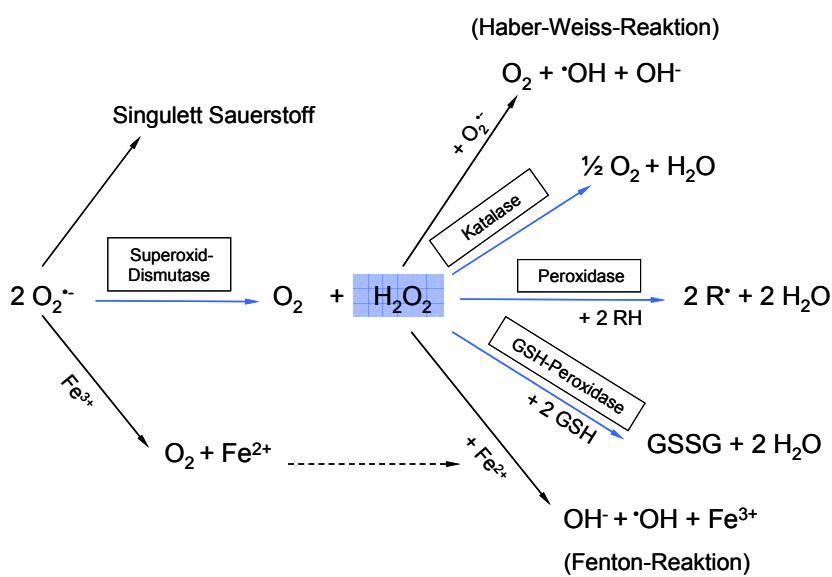
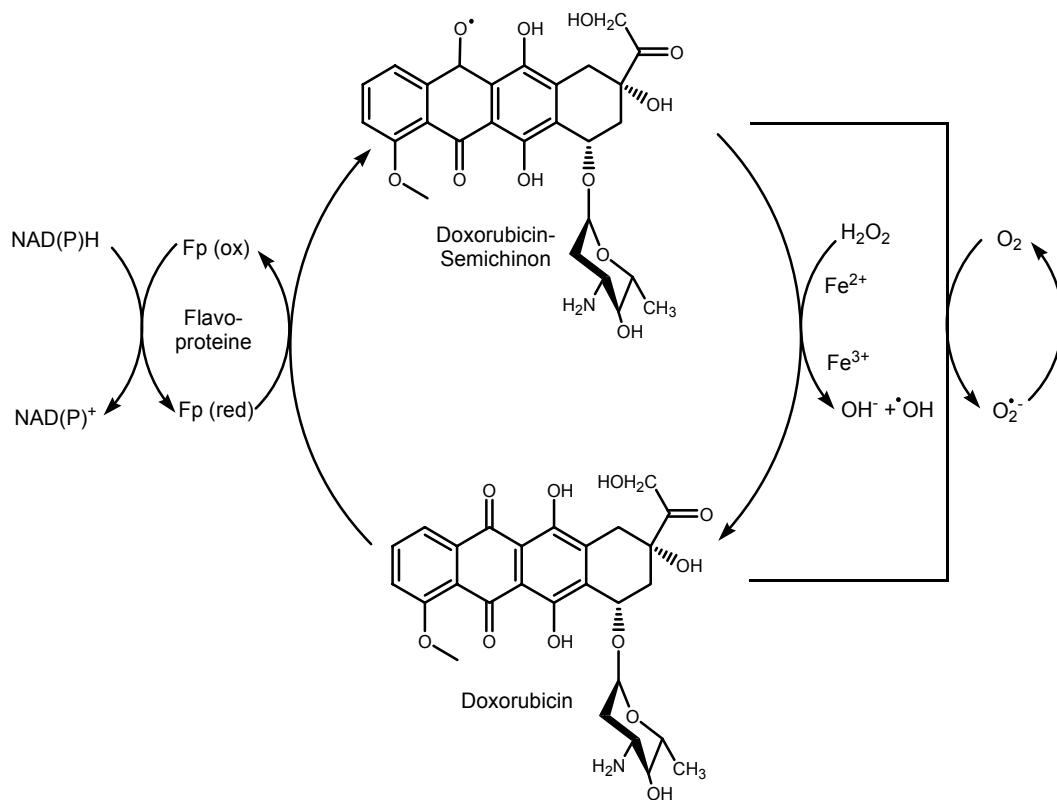


Abbildung 8.2: Enzymatische Inaktivierung von aktiviertem Sauerstoff nach [5]

Ein weiteres Beispiel sind die ebenfalls in der Chemotherapie angewendeten Anthracyclinantibiotika und das sogenannte „Metalloantibiotikum“ Bleomycin, das als Naturstoff in der therapeutisch angewendeten Form hauptsächlich aus den strukturell eng verwandten basischen Glykoproteiden Bleomycin A<sub>2</sub> und B<sub>2</sub> besteht.<sup>[5, 183]</sup>

Die Anthracycline, wie Daunorubicin und Doxorubicin, können einerseits in die DNA interkalieren, anderseits werden sie durch mikrosomale Cytochrom-P-450-Reduktase und NADPH zu Semichinon-Radikalen reduziert, die Radikalreaktionen auslösen und Sauerstoffradikal-Anionen produzieren können. In Anwesenheit von  $\text{Fe}^{2+}$  werden durch Reduktion von  $\text{H}_2\text{O}_2$  in einer Fenton-Reaktion die stark zytotoxischen Hydroxyl-Radikale gebildet (vgl. Abbildung 8.3). Die Folge davon sind DNA-Einzel- und Doppelstrangbrüche sowie DNA-Umlagerungsreaktionen und Abspaltung der Zuckerreste.<sup>[5]</sup> Dosislimitierende Nebenwirkung der Anthracycline ist die Kardiotoxizität, die ebenfalls auf die Produktion freier Radikale und deren Wechselwirkungen mit der Calcium- und Eisen-Homöostase, wie auch auf Wechselwirkungen mit Phospholipiden, zurückgeführt wird.<sup>[184]</sup>



**Abbildung 8.3:** Produktion von ROS durch Anthracyclinantibiotika am Beispiel von Doxorubicin nach [22, 184]

Das Glykooligopeptid-Antibiotikum Bleomycin (BLM) bildet mit verschiedenen Metallionen (z.B.  $\text{Fe}^{2+/3+}$ ,  $\text{Cu}^{+/2+}$ ,  $\text{Co}^{2+/3+}$  und  $\text{Zn}^{2+}$ ) Chelate und kann ebenfalls in die DNA interkalieren. Aufgrund der hohen Konzentration an Eisen in biologischen Systemen ist die wirksame Form *in vivo* der  $\text{Fe}^{2+}$ -BLM-Komplex, der in Anwesenheit von Sauerstoff und einem Reduktionsmittel (z.B. NADPH-Cytochrom-P-450-Reduktase) aktiviert wird.

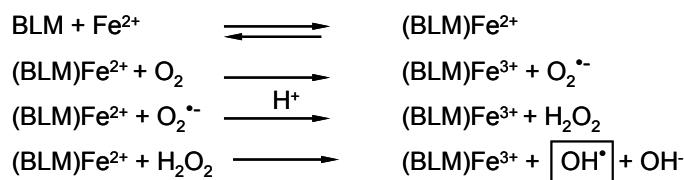


Abbildung 8.4: Produktion von ROS durch Bleomycin nach [178]

Der aktivierte Eisenkomplex verhält sich wie eine mischfunktionelle Oxygenase. Dabei werden Sauerstoffradikal-Anionen erzeugt, die für DNA-Strangbrüche, Translokationen und DNA-Fragmentierung verantwortlich gemacht werden können (vgl. Abbildung 8.4). Die DNA-Strangbrüche werden dabei durch Oxidation des C-4'-Kohlenstoffs der Desoxyribose der DNA und nachfolgendem Verlust des C-2'-Protons erzeugt.<sup>[5, 183]</sup> Über die Bildung von Hydroxyl-Radikalen wird die Wirkungsweise von Bleomycin, aber auch die Nebenwirkungen und die Toxizität des Glykopeptidantibiotikums erklärt.<sup>[178]</sup>

## 8.1 Fenton-Reaktion

1894 berichtete H.J.H. Fenton, dass Eisen die Oxidation von Malonsäure mittels Wasserstoffperoxid stark fördert.<sup>[185]</sup> Diese nach ihm benannte Reaktion findet auch in biologischen Systemen statt. Beispiele macht man sich wie bereits erwähnt in der Tumorthерапie zunutze. Andererseits scheint diese Reaktion auch an pathologischen Prozessen beteiligt zu sein. So fand man unnormal hohe Konzentrationen von Eisen in amyloiden Plaques bei Alzheimer-Patienten (1 mM) und in der Substantia nigra bei Parkinson-Patienten (13-15 µg Eisen/g Trockengewicht).<sup>[186]</sup>

Auch für andere Metalle wie Cr<sup>4+</sup>, V<sup>5+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup> und Mn<sup>2+</sup> ist die Produktion von ROS über eine Fenton-analoge Reaktion und den Haber-Weiss-Zyklus (Abbildung 8.2) in Zellsystemen gut beschrieben.<sup>[117, 186]</sup> Allerdings besitzt die Haber-Weiss-Reaktion *in vivo* aufgrund niedriger Konzentrationen von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und O<sub>2</sub><sup>·-</sup> kaum Bedeutung.<sup>[5, 175]</sup>

Nukleinsäuren können Eisenionen gut binden.<sup>[187]</sup> Die durch Fenton-Reaktion entstehenden hochreaktiven Hydroxyl-Radikale können nicht weit von ihrem Entstehungs-ort diffundieren, bevor sie unselektiv abreagieren. Damit gilt die DNA als bevorzugtes Target der durch Fenton-Reaktion ausgelösten Schädigungen.<sup>[175]</sup> OH<sup>·</sup>-Radikale können dabei Elektronen von den Zucker- oder Baseneinheiten abstrahieren oder sich an ungesättigte Basen addieren.

Auf ganz unterschiedlichen Wegen kann es so zu einem breiten Spektrum an Schädigungen kommen, die man auch in der Bioanalytik bei sogenannten *Footprint*-Analysen ausnutzt (vgl. Kapitel 7).<sup>[175]</sup> Der Reaktionszyklus ist in Abbildung 8.5 nochmals dargestellt.

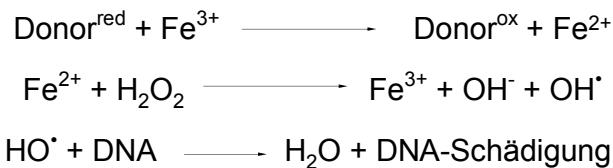


Abbildung 8.5: Reaktionszyklus der Fenton-Reaktion *in vivo* nach [175]

## 8.2 Entfärbung von *p*-Nitrosodimethylanilin (PNDA)

Eine einfache Reaktion zum Nachweis vorhandener Hydroxyl-Radikale ist die Entfärbung von *p*-Nitrosodimethylanilin (PNDA), die bei einer Wellenlänge von 440 nm photometrisch verfolgt werden kann. PNDA reagiert mit Hydroxyl-Radikalen nach dem in Abbildung 8.6 aufgezeigten Reaktionsschema.<sup>[177, 188, 189]</sup>

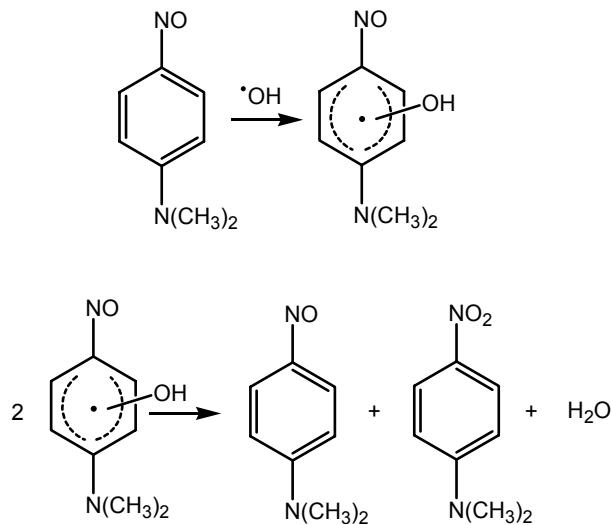
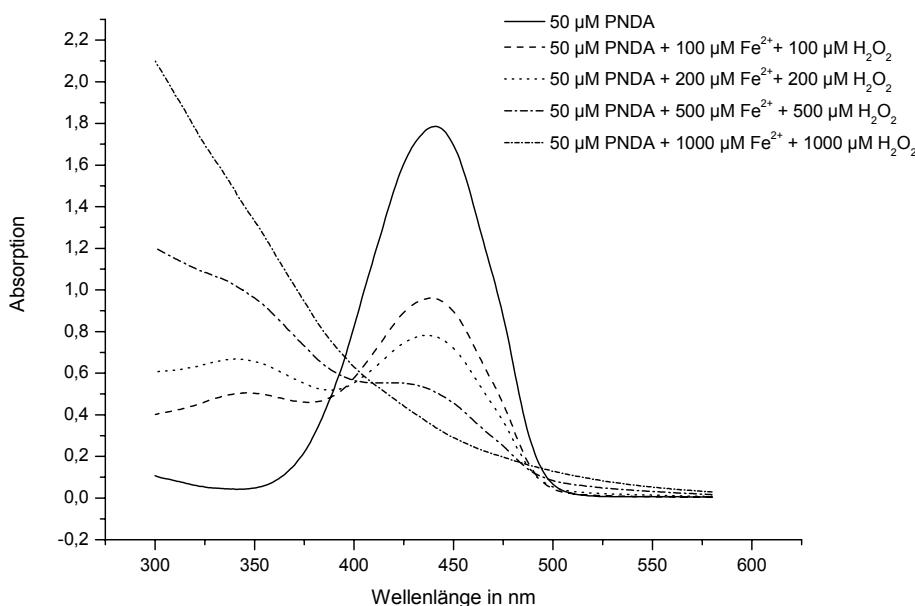


Abbildung 8.6: Reaktionsschema von PNDA mit  $\text{OH}^\cdot$  nach [190]

In verschiedenen radiolytischen und photolytischen Studien konnte belegt werden, dass PNDA nur mit OH<sup>·</sup> reagiert und durch Superoxid-Anionen (O<sub>2</sub><sup>·-</sup>) oder Singulett-sauerstoff (O<sub>2</sub><sup>·</sup>) nicht oxidiert wird.<sup>[190-193]</sup> In Abbildung 8.7 sind als Beispiel die erhaltenen UV/Vis-Spektren dargestellt, die bei Inkubation einer 50 µM PNDA-Lösung mit steigenden Mengen Fe(OAc)<sub>2</sub> und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nach 24-stündiger Inkubation erhalten wurden.

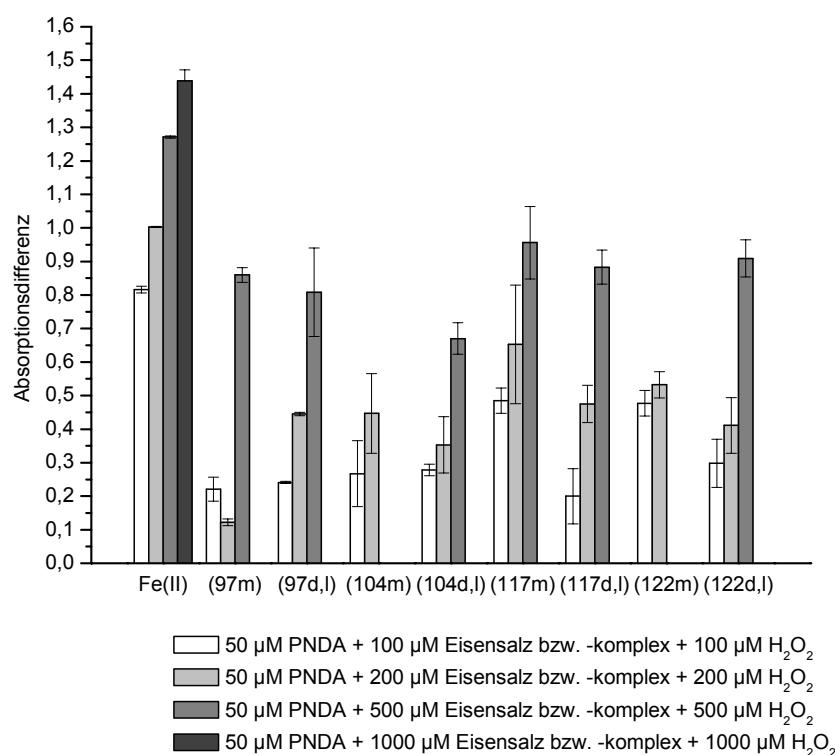


**Abbildung 8.7:** Entfärbung einer PNDA-Lösung durch steigende Konzentrationen an Fe(OAc)<sub>2</sub> und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Die Inkubation von PNDA-Lösung mit 100 µM Fe(OAc)<sub>2</sub> führte zu einer deutlichen Entfärbung der Lösung. Eine Steigerung der Fe(OAc)<sub>2</sub>- und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentration bewirkte eine weitere Abnahme der Absorption und damit eine Zunahme der Absorptionsdifferenz. In Abbildung 8.8 sind die erhaltenen Absorptionsdifferenzen nach Zusatz von Fe(OAc)<sub>2</sub> bzw. der ausgewählten Eisen(diarylsalen)-Komplexe zusammenfassend dargestellt. Aufgetragen wurden dabei die Differenzen der Absorptionen der Vergleichslösungen (50 µM PNDA-Lösungen, die die entsprechend konzentrierten Eisenkomplex-Lösungen ohne Zusatz von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> enthielten) und der Absorption der PNDA-Lösungen, denen die Eisenkomplexe und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in entsprechender Konzentration zugesetzt wurden.

Die Zugabe der Eisen(diarylsalen)-Komplexe zur PNDA-Lösung hatte ebenfalls eine deutliche Entfärbung der Lösung zur Folge. Allerdings waren die erhaltenen Absorptionsdifferenzen durch die unkomplexierten  $\text{Fe}^{2+}$ -Lösungen wesentlich höher als die Absorptionsdifferenzen, die nach Zusatz der Eisenkomplex-Lösungen erhalten wurden.

Die Absorptionsdifferenzen der Eisen(II)- und Eisen(III)-Komplexe wiesen keinen erkennbaren Unterschied auf. Interessanterweise sind die erhaltenen Absorptionsdifferenzen der fluorsubstituierten Diarylsalen-Komplexe (**(117m)**, **(117d,I)** und **(122m)**, **(122d,I)**) etwas höher als die der 4'-methoxysubstituierten Komplexe (**(97m)**, **(97d,I)** und **(104m)**, **(104d,I)**). Insgesamt konnte damit für die Eisen(diarylsalen)-Komplexe eine  $\text{OH}^-$ -Produktion nachgewiesen werden, die allerdings geringer ausfiel als die von  $\text{Fe(OAc)}_2$ . Eine Abhängigkeit der Menge der entstehenden  $\text{OH}^-$ -Radikale von der Struktur der Liganden ist denkbar.



**Abbildung 8.8:** Absorptionsdifferenzen zwischen einer 50  $\mu\text{M}$  PNDA-Lösung und gleich konzentrierter PNDA-Lösungen mit Zusatz der entsprechenden Konzentrationen der Eisenkomplexe