

II. THEORETISCHE GRUNDLAGEN

Reactive Oxygen Species (ROS):

Mit Reactive Oxygen Species (ROS) wird eine Gruppe radikalischer und nichtradikalischer hochreaktiver Sauerstoffmetaboliten bezeichnet. Die Zahl hochreaktiver Sauerstoffmetabolite, die in biologischen Systemen auftreten ist, begrenzt (Hill 1979). Einige typische Beispiele sind in Tabelle 1 aufgeführt. Die Stärke der Reaktivität von freien Radikalen kann über die extrem kurze Halbwertszeit der ROS abgeschätzt werden (YU 1994). Die hohe Reaktivität entsteht durch die instabile Elektronenkonfiguration der Radikale. Sie extrahieren schnell Elektronen aus anderen Molekülen, mit denen sie kollidieren. Diese Moleküle werden dann selbst zu freien reaktionsfähigen Radikalen. Eine Kettenreaktion kann gestartet werden. Die toxischen Sauerstoffmetabolite entstehen während des Elektronentransports auf Sauerstoff in der mitochondrialen Atmungskette (McCord und Fridovich 1970, Halliwell 1989, Yu 1994) und bei verschiedenen Hydroxylierungs- und Oxidierungsreaktionen. Wahrscheinlich treten sie als Intermediärprodukte im aktiven Zentrum solcher Enzyme auf (Lehninger 1985, Frank 1985, Yu 1994, Robert 1996).

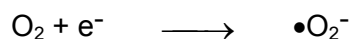
Reactive Oxygen Species		Eigenschaften	T _{1/2} [s]
Superoxidradikal	O ₂ ^{•-}	Entstehung bei vielen Autoxidationsreaktionen	1 x 10 ⁻⁶
Hydroxylradikal	HO [•]	Entstehung metallkatalysiert, hochreaktiv (Addition, Abstraktion, Elektronen Transfer Reaktionen), geringe Diffusionsfähigkeit	1 x 10 ⁻⁹
Perhydroxylradikal	HO ₂ [•]	Protonierte Form von O ₂ ^{•-} , fettlöslicher als Superoxid, kann Lipidperoxidation initiieren	?
Alkoxyradikal	RO [•]	Entstehung bei Lipidperoxidation, in der Reaktivität mit Lipiden Mittelstellung zwischen HO [•] und ROO [•]	1 x 10 ⁻⁶
Peroxyradikal	ROO [•]	Entstehung bei Lipidperoxidation, im Vergleich mit HO [•] niedrige Oxidationsfähigkeit, aber große Diffusionsfähigkeit	1 x 10 ⁻²
Hydroperoxyd	ROOH	Entstehung bei Lipidperoxidation, Protonierte Form von ROO [•]	?
Wasserstoffsuperoxid	H ₂ O ₂	Entstehung enzymatisch, Reaktionen mit organischen Substraten sind träge, hohe Diffusionsfähigkeit	?
Singulett-Sauerstoff	¹ O ₂	starkes Oxidationsmittel	1 x 10 ⁻⁶

Tabelle 1 Übersicht Reactive Oxygen Species (Florence 1990, Ross und Moldeus 1991)

Wenn das normale Oxidations-Antioxidationsgleichgewicht gestört wird, kann ein unkontrollierter Angriff von Sauerstoffradikalen auf nahezu alle Zellbestandteile einsetzen (Frank 1985, Löffler und Patrides 1998). Lipide können durch Peroxidation von ungesättigten Fettsäuren, Proteine durch Oxidation von Sulfhydrylgruppen, Kohlenhydrate durch Polysacchariddepolymerisation und Nukleinsäuren durch Basenhydroxylation, "nicking", "cross-linkage" und DNA Brüche geschädigt werden (Frank 1985).

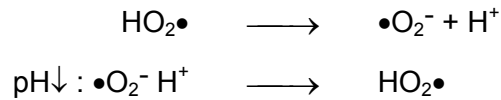
Superoxidradikale:

Das ROS, das die Lipidperoxidation in biologischen Systemen initiiert, ist noch nicht sicher identifiziert. Allerdings wird allgemein vermutet, daß das Superoxidradikal eine Hauptrolle in dieser Reaktion spielt (Michelson et al. 1985). Eine Vielzahl von enzymatischen und Autoxidationsreaktionen sind in der Lage O₂ univalent zu reduzieren und Superoxid zu generieren (Kellogg und Fridovich 1977, Kappus 1981, Frank 1985).



Perhydroxylradikale:

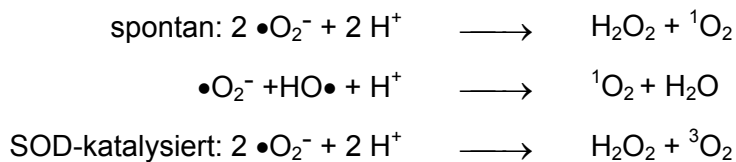
Das Perhydroxylradikale ist die protonierte Form von $\bullet\text{O}_2^-$. In wässriger Lösung und bei physiologischem pH liegt das Gleichgewicht zwischen Superoxid und dem protonierten Perhydroxylradikal ganz auf der Seite von Superoxid.



Superoxid kann im Gegensatz zum Perhydroxylradikal kein Wasserstoffatom von einer ungesättigten Fettsäure abspalten. Nur das undissoziierte Perhydroxylradikal, das allerdings nur bei niedrigem pH in ausreichenden Mengen vorkommt, kann die Lipidperoxidation starten (Bielski et al. 1983, Gebicki und Bielski 1981). Wenn das Perhydroxylradikal in ausreichenden Mengen gebildet wird, ist es ein guter Initiator der Lipidperoxidation, zudem seine Reaktivität in Lipidphasen, wie z.B. in Membranen, besonders hoch ist (Kappus 1981).

Singulett-Sauerstoff:

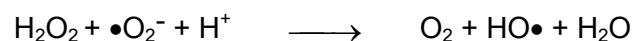
Superoxid kann spontan oder durch Superoxid Dismutase (SOD) katalysiert dismutieren. Im Gegensatz zur spontanen Dismutation, die reaktiven Singulett-Sauerstoff generiert, wird durch die SOD katalysierte Reaktion Triplett-Sauerstoff im Grundzustand erzeugt (Fridovich 1974).



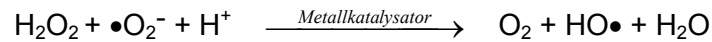
Singulett-Sauerstoff ist in der Lage, die Lipidperoxidation zu starten (Kellogg und Fridovich 1975). Da in jedem Gewebe SOD vorkommt, kann Singulett-Sauerstoff erst dann die Lipidperoxidation auslösen, wenn die Kapazität der SOD überschritten ist (Frank 1985, Kappus 1981). Allerdings kann das entstehende Wasserstoffsuperoxid, selbst nicht in der Lage Lipide zu oxidieren, zum Hydroxylradikal weiter reagieren und damit die Lipidperoxidation auslösen.

Hydroxylradikale:

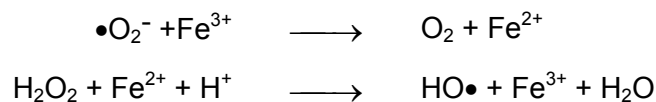
Hochreaktive Hydroxylradikale sind in der Lage Lipide zu peroxigenieren. Hydroxylradikale entstehen bei der Dekompensation von Wasserstoffsuperoxid nach einer von Haber und Weiss 1934 postulierten Reaktion.



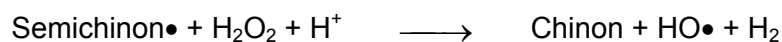
Da die Reaktionskonstante dieser Reaktion fast gleich Null ist, kann sie in einem chemisch definierten System nicht beobachtet werden (Gutteridge 1982, Gudderidge et al. 1982, Halliwell 1982). Nur wenn Metallionen als Katalysator vorhanden sind, werden Hydroxylradikale gebildet. Deshalb wurde die Reaktion zur eisen-katalysierten Haber-Weiss-Reaktion weiterentwickelt (Kappus 1981).



In Gegenwart von Eisen läßt sich der Reaktionsmechanismus mit der klassischen Fenton-Reaktion beschreiben (Kappus 1981).



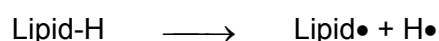
Andere Metalle, z.B. Kupfer, sind ebenfalls in der Lage diese Reaktion zu katalysieren (Gutteridge und Wilkins 1982, Rowley und Halliwell 1983). Hydroxylradikale können ebenfalls entstehen, wenn Semichinonradikale mit Wasserstoffsuperoxid reagieren (Gutteridge und Toeg 1982, Richmond und Halliwell 1982, Nohl und Jordan 1983). In diesem Fall sind Metallkatalysatoren nicht notwendig.



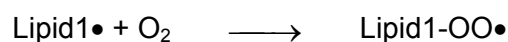
Hydroxylradikale sind so reaktiv, daß sie sofort mit benachbarten Molekülen reagieren. Superoxid und Wasserstoffperoxid sind weniger reaktiv, können von ihrem Entstehungsort wegdiffundieren und dann Hydroxylradikale produzierende Reaktionen in Gang setzen. Wasserstoffsuperoxid diffundiert durch Plasmamembranen, für Superoxid existieren Transportkanäle. Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die zentrale Rolle von Superoxidradikalen und Metallionen als Katalysator in der Literatur allgemein anerkannt, der genaue Reaktionsweg aber bis jetzt noch unbekannt ist.

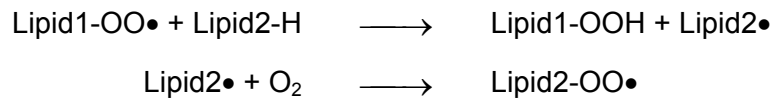
Lipidperoxidation:

Initiiert wird die Lipidperoxidation durch Abspaltung eines H• von einer ungesättigten Fettsäure.

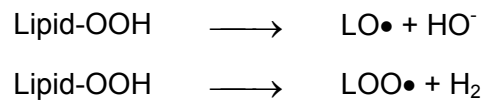


Mit Sauerstoff kann das Lipidradikal reagieren und eine Kettenreaktion in Gang setzen (Frankel 1983, Halliwell 1981, Kappus und Sies 1981, Mead 1976, Yagi 1982).





Die Reaktionsprodukte sind Lipidmonohydroperoxide. Diese können spontan, durch Erwärmen oder durch Metallkatalysatoren weitere Radikalkettenreaktionen initiieren (Kappus 1981).



Im Verlauf der Kettenreaktion entstehen messbare Endprodukte wie Ethan ($\text{CH}_3\text{-CH}_3$), n-Pentan ($\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_3$) und Malondialdehyd ($\text{O}=\text{CH-CH}_2\text{-CH}=\text{O}$) (Tappel 1980, Wendel und Dumelin 1981). Die Lipidperoxidation von ω -3 ungesättigten Fettsäuren ergibt Ethan, von ω -6 Säuren n-Pentan (Kappus 1981, Frankel 1999). Mindestens zwei isolierte Doppelbindungen sind notwendig, um Alkane zu bilden. Die Entstehung von MDA über Endoperoxidradikale wird in Abbildung 2 beschrieben. Um MDA zu bilden, sind mindestens drei isolierte Doppelbindungen notwendig (Kappus 1981). Die Radikalkettenreaktion wird gestoppt, wenn zwei Radikale miteinander reagieren.

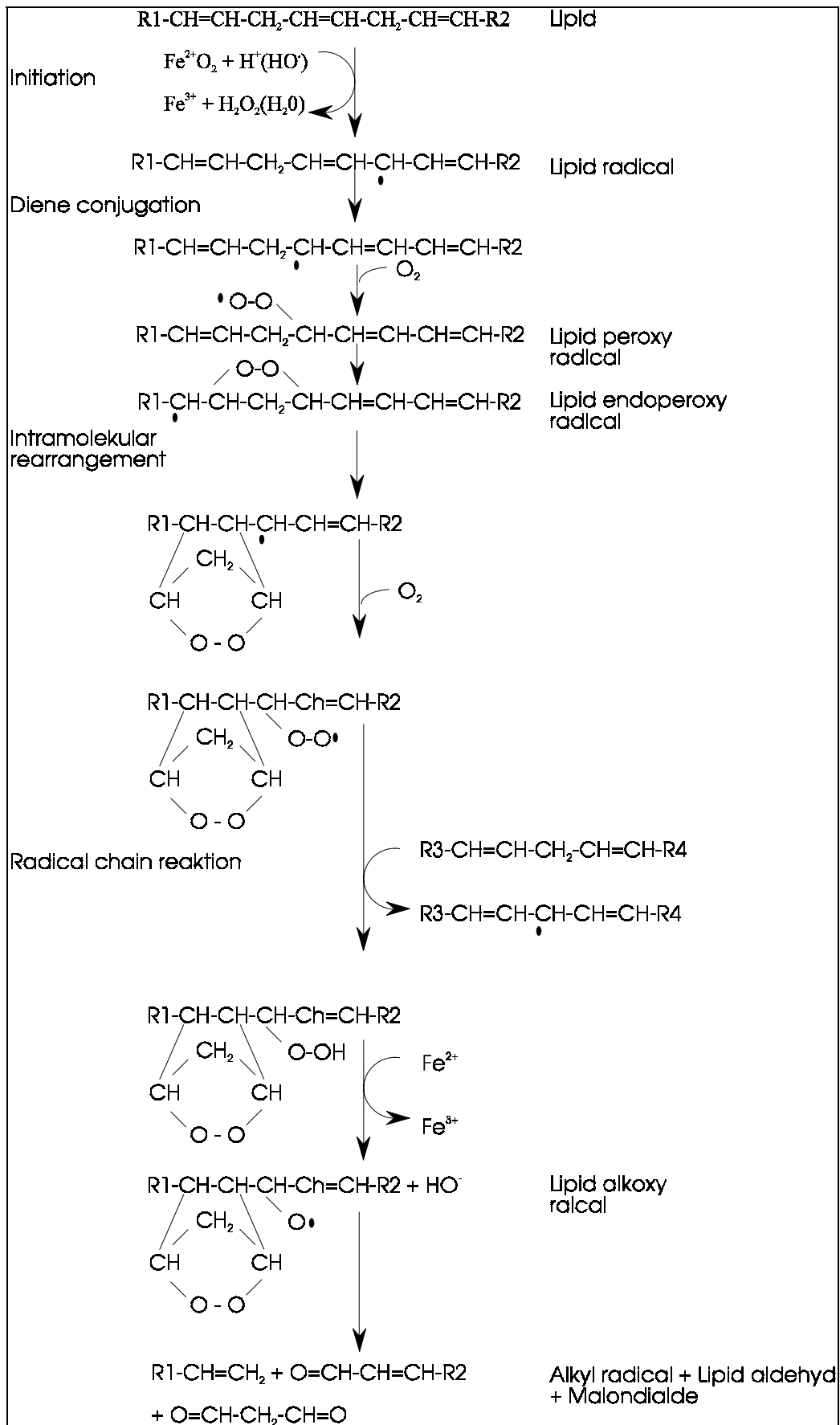


Abbildung 2 Bildung von MDA durch Lipidperoxidation (Kappus 1985, S.280)

Protektive Mechanismen:

Antioxidative Systeme werden in ein primäres und ein sekundäres System unterteilt. Primäre Systeme reduzieren die Bildung neuer reaktiver Sauerstoffmetabolite, während sekundäre schon gebildete Radikale neutralisieren (Burton et al. 1985).

Primäres antioxidatives Potential:

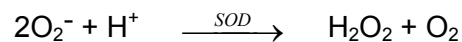
Die enge elektrochemische Kopplung der mitochondrialen Atmung verhindert die Freisetzung der als Intermediärprodukte in den aktiven Zentren der Enzymkomplexe entstehenden ROS. Transferrin und Ferritin binden Eisenionen, so daß sie nicht als Katalysatoren verfügbar sind. Coeruloplasmin oxidiert Eisen zum dreiwertigen Eisenion, das die Lipidperoxidation nicht katalysieren kann.

Sekundäres antioxidatives Potential:

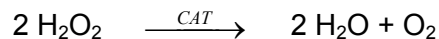
Sind ROS erst einmal gebildet, werden diese durch verschiedene Mechanismen neutralisiert.

Superoxid Dismutase (SOD):

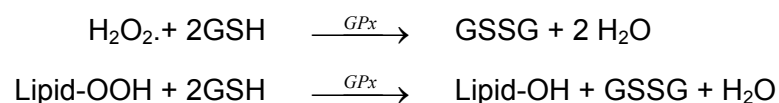
SOD fängt Superoxid ab und wandelt es in das weniger reaktive Wasserstoffsuperoxid um (Kappus und Sies 1981, Frank 1985, Robert 1996).

**Katalase (CAT):**

CAT entfernt Wasserstoffsuperoxid, das mit zweiwertigem Eisen reagiert und Hydroxylradikale bilden könnte (Kappus und Sies 1981, Frank 1985).

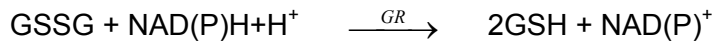
**Gluthationperoxidase (GPx):**

GPx entfernt Wasserstoffsuperoxid und Lipidhydroperoxide unter Oxidation von Gluthation (GSSH) zu oxidiertem Gluthation (GSSG) (Kappus 1981, Robert 1996).

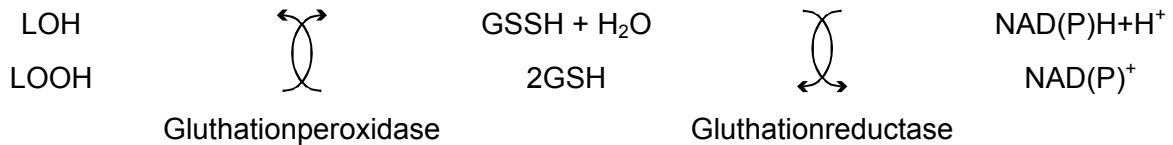


Da Gluthation Peroxidase Selen als Kofaktor benötigt, kann ein Mangel dieses Metalls zu gesteigerter Lipidperoxidation führen (Takeda et al. 1984). Niedrige GSSH Konzentrationen erhöhen die Hydroperoxytotoxizität durch Limitierung der Entgiftung

von Hydroperoxiden durch GPx (Michiels und Remacle 1988). GSSH wird durch die NADH₂-abhängige Gluthationreductase (GR) regeneriert (Robert 1996).

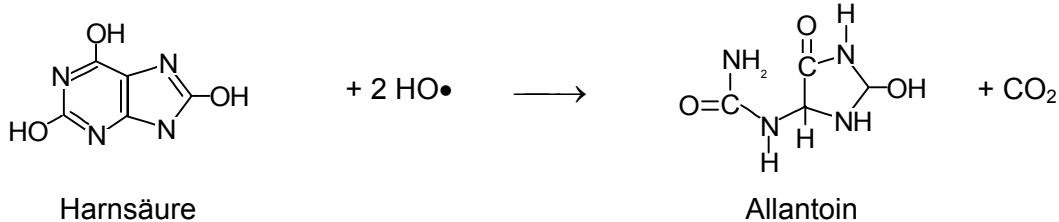


GPx, GR, GSH und NAD(P)H + H⁺ bilden ein gekoppeltes antioxidative System (Bühler 1992, Biesalski et al. 2000).



Harnsäure (HS):

HS stellt den größten Anteil des antioxidativen Potentials des Plasmas (Mikami et al. 2000). Hydroxylradikale, Superoxid und Singulett Sauerstoff werden zerstört, indem sie mit HS reagieren und diese zu Allantoin oxidieren (Robert 1996, Stryer 1996). Allerdings kann bei der Reaktion der HS mit Radikalen auch ein HS Radikal (HS•) entstehen. Das HS• wird durch Ascorbinsäure reduziert und HS wird regeneriert (Halliwell and Gutteridge 1990). HS ist in seiner antioxidativen Wirkung etwa gleich wirksam wie Ascorbinsäure, die Konzentration im Plasma ist aber wesentlich höher.



Tocopherol (TH₂):

Das lipophile TH₂ ist das wichtigste Antioxidanz in Lipidmembranen. (Takeda et al. 1984, Frank 1985, Huang et al. 2000). TH₂ kann mit Lipidradikalen reagieren und so die Kettenreaktion unterbrechen (Burton et al. 1983, Wispé et al. 1986). Es hat eine sehr hohe Affinität zu Lipidradikalen (Lipid•) und Lipidperoxyradikalen (Lipid-OO•) und fängt diese daher ab, bevor sie in der Propagation neue Fettsäuren angreifen können. Bei Anwesenheit von TH₂ kommt es daher zum Abbruch der Kettenreaktion. Die Kettenabbruchreaktion besteht in der Übertragung des Wasserstoffatoms der phenolischen Hydroxylgruppe des TH₂ auf Lipid-OO•, wobei nun ein Tocopheryloxylradikal (TH•) entsteht. Dieses Radikal ist aber durch Resonanzstabilisierung sehr reaktionsträge und kann die Kettenreaktion nicht fortsetzen (Robert 1996, Biesalski et al. 2000).

**Nachweismethoden für oxidative Schäden am Membranlipiden und –
proteinen:**

Das Ausmaß der Lipidperoxidation kann mit Messung der thiobarbitursäurereaktiven Substanzen (Frankel 1987, Alessio 1992), der Dienkonjugate (Kappus 1981) und der spontanen Chemolumineszenz (Popov et al. 1989) bestimmt werden. Proteinmodifikation und – degradation durch Radikale kann mittels Analyse von Spectrinveränderungen (Deuticke et al. 1984, Wolff et al. 1986), Messung der H₂O₂-stimulierten Chemolumineszenz (Popov et al. 1989) und Visualisierung von Zellschwellung nach Membranschädigung (Jordan et al. 1998) untersucht werden. Zellmembranschäden können über das Ausmaß des Übertritts von intrazellulär lokalisierten Enzymen in das Plasma (Armstrong 1984, Janssen et al. 1986, Kanter et al. 1988) abgeschätzt werden. Ein Überblick ist in Abbildung 3 dargestellt.

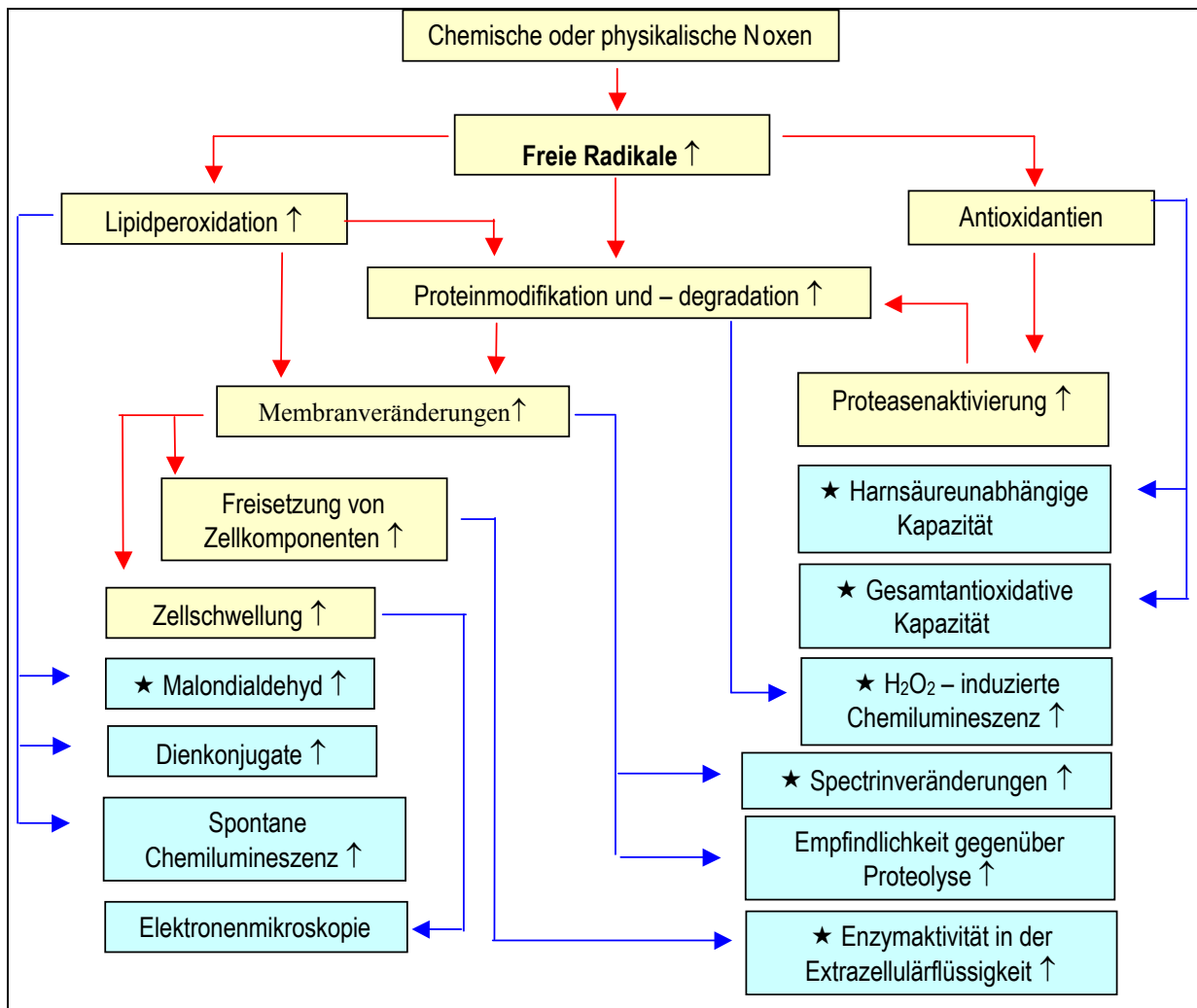


Abbildung 3 Nachweismethoden für oxidative Schäden an Membranlipiden und -proteinen (Popov und Lewin, 1999), Nachweismethoden, die in der vorliegenden Arbeit benutzt wurden, sind mit ★ markiert, Pathomechanismus →, Nachweismethoden →