

## Freie Radikale und Antioxidantien

Univ.Doz. Dr. Manhart Nicole  
Medizinische Universität Wien

### Einleitung

„Freie Radikale“ werden immer öfter in Zusammenhang mit der Entstehung verschiedener Krankheiten, vor allem Arteriosklerose und Krebs, erwähnt. Tagtäglich erfahren wir über die Medien, in Drogeriemärkten und in Apotheken, daß wir zum Schutz gegen die negativen Auswirkungen von freien Radikalen sogenannte Radikalfänger, die als Wundermittel gegen Arteriosklerose, Krebs, das Altern, Diabetes usw. gepriesen werden, vermehrt aufnehmen sollen. Aber was sind eigentlich freie Radikale, Radikalfänger und oxidativer Stress?

### Von freien Radikalen und einsamen Elektronen

Freie Radikale sind Atome oder Moleküle, die ein oder mehrere ungepaarte (freie) Elektronen besitzen (gekennzeichnet mit einem Punkt als Zeichen des freien Elektrons) und dadurch instabile, kurzlebige und hochreaktive Moleküle darstellen. Sie sind bestrebt ihren instabilen Zustand auszugleichen, indem sie anderen Molekülen Elektronen entreißen. Als reaktive Sauerstoffspezies (ROS) werden auch reaktive Sauerstoffverbindungen ohne Radikalcharakter, wie Wasserstoffperoxid, Singulett-Sauerstoff, hypochlorige Säure oder Ozon bezeichnet.

Spezies	Name	Entstehung	Halbwertszeit
Hydroxylradikal	HO <sup>•</sup>	aus H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> durch Übergangselemente	10 <sup>-9</sup> sek
Superoxidradikal	O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	Respiratory burst	10 <sup>-6</sup> sek
Alkoxyradikal	RO <sup>•</sup>	Lipidperoxidation	10 <sup>-6</sup> sek
Peroxyradikal	ROO <sup>•</sup>	Lipidperoxidation	2 - 10 sek
Singulett-Sauerstoff	<sup>1</sup> O <sub>2</sub>	Bestrahlung	10 <sup>-5</sup> sek
Wasserstoffperoxid	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Respiratory burst	?

Da „einsame“ Elektronen ihren Elektronenpartner aus fast allen Biomolekülen gewinnen können, und diese damit in ihrer Funktion verändern, stellen freie Radikale eine potentielle Gefahr für den Organismus dar. Reaktive Sauerstoffspezies erfüllen aber auch positive Funktionen im Organismus, so dienen sie beispielsweise dazu, eindringende Mikroorganismen abzutöten oder als Mediatoren die Synthese von Interleukinen zu stimulieren. Ein zuviel an ROS kann durch Umwelttoxene (z.B. Luftschadstoffe, Schwermetalle, Pestizide), Genußmittel (Alkohol, Tabak), inadäquate körperliche Belastung wie z.B. falsches Training entstehen. Die Metabolisierung diverser Medikamente wie Zytostatika, orale Kontrazeptiva, Paracetamol, Antibiotika wie Chloramphenicol oder Nitrofurantoin führt ebenfalls zu einer vermehrten Radikalfreisetzung.

Das bedeutet, dass der menschliche Organismus täglich mit einer Vielzahl an reaktiven Sauerstoffspezies konfrontiert ist. Damit es nicht zu einer übermäßigen Gewebeschädigung kommt, hat sich ein ausgeklügeltes System an Schutzmechanismen gegen den Angriff freier Radikale und ROS entwickelt.

### **Antioxidantien**

Unter Antioxidantien versteht man Substanzen, die in niedrigen Konzentrationen den Organismus vor unerwünschten oxidativen Schäden schützen. Man unterscheidet zwischen enzymatischen und nicht-enzymatischen antioxidativen Abwehrsystemen. Zu den enzymatischen Antioxidantien gehören vor allem die Superoxiddismutase, die Glutathionperoxidase und die Katalase. Damit diese Enzyme arbeiten können benötigen sie Selen, Kupfer, Mangan, Zink und Eisen. Bei den nicht-enzymatischen Antioxidantien unterscheidet man zwischen endogenen niedermolekularen Antioxidantien (z.B. Glutathion) und den exogenen Antioxidantien, die über die

Nahrung zugeführt werden müssen, wie L-Ascorbinsäure (Vitamin C),  $\alpha$ -Tocopherol, Karotinoide ( $\beta$ -Carotin, Lycopin, Kryptoxanthin,...) und sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe (Polyphenole, Flavonoide,...).

### **Oxidativer Stress**

Das Gleichgewicht zwischen antioxidativen und prooxidativen Faktoren ist also für die physiologische Zellfunktion von entscheidender Bedeutung. Ist dieses Gleichgewicht gestört, indem z.B. mehr reaktive Sauerstoffverbindungen gebildet werden, als durch die Antioxidantien abgefangen werden können, so spricht man von oxidativem Stress. Bei der Entstehung von oxidativem Stress spielen sowohl endogene wie auch exogene Faktoren eine wesentliche Rolle (Graphik).

Durch dieses Ungleichgewicht werden Pathomechanismen in Gang gesetzt, die in Zusammenhang mit einer Vielzahl von Erkrankungen gebracht werden. Zu nennen wäre hier an erster Stelle Arteriosklerose mit Herzinfarkt und Schlaganfall als Folge. Aber auch die Beteiligung an Entzündungsvorgängen, Sepsis, Karzinogenese und neurodegenerativen Prozessen ist augenscheinlich. Ein kausativer Zusammenhang zwischen oxidativem Stress und diesen Erkrankungen konnte allerdings noch nicht aufgezeigt werden.

Die beste Möglichkeit einen ausgeglichenen Zustand zwischen Oxidantien und Antioxidantien aufrechtzuerhalten, ist ein ausgewogener Lebensstil. Dazu zählt eine ausgewogene Ernährung, mit der eine Kombination an möglichst vielen Antioxidantien aufgenommen wird. Im Vordergrund einer solchen Ernährung stehen Obst- und Gemüseprodukte. Weiters kann durch adäquates körperliches Training einerseits die Effizienz der antioxidativen Enzyme gesteigert werden und andererseits bilden Trainierte weniger ROS. Die Vermeidung von exogenen ROS-Quellen (Tabak-, Alkoholkonsum) führt ebenfalls zum Einsparen von Antioxidantien.

### **Stand der Forschung**

## **Interventionsstudien**

In zahlreichen epidemiologischen Untersuchungen wurde klar gezeigt, daß Personen, die viel Obst und Gemüse verzehren, ein verringertes Risiko aufweisen, an Krebs oder Herz-Kreislaufkrankungen zu erkranken. Da Obst und Gemüse reich an Antioxidantien sind, geht man davon aus, dass die in der Nahrung enthaltenen Antioxidantien zur Prävention beitragen. Deshalb wurden in den vergangenen Jahren groß angelegte Interventionsstudien, bei denen gezielt ausgewählte Antioxidantien verabreicht wurden, durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Studienreihen sind jedoch alarmierend. Bei keiner dieser über mindestens eineinhalb bis maximal dreizehn Jahre laufenden Untersuchungen erreichte man mit der Antioxidantiensupplementation positive Ergebnisse. So wurde in Interventionsstudien mit hohen Dosen Beta-Carotin unerwarteterweise ein erhöhtes Lungenkrebsrisiko in Hochrisikogruppen beobachtet. Weiters zeigte Beta-Carotin einen leichten aber signifikanten Anstieg in der Gesamtmortalität und in der kardiovaskulären Mortalität. Da angenommen wurde das Antioxidantien bei Hochrisikopatienten eine positive Wirkung zeigen würden, sind diese Studienergebnisse umso enttäuschender. Interessanterweise scheint ein verminderter Serumspiegel an  $\beta$ -Carotin nicht ursächlich mit dem Krebsrisiko zu korrelieren, sondern vielmehr ein Indikator für den Verzehr von Obst und Gemüse zu sein. Es konnte kein präventiver Effekt von  $\alpha$ -Tocopherol hinsichtlich der Gesamtmortalität, des Risikos der kardiovaskulären Mortalität, oder der cerebrovaskulären Ereignisse aufgezeigt werden. Die Ergebnisse dieser Interventionsstudien zeigen nicht nur, dass man den gewünschten präventiven Effekt nicht erreichen konnte sondern, dass man auch sehr vorsichtig mit langfristigen Supplementationen umgehen muss (Tabelle 3). Zurzeit ist eine längerfristige zusätzliche Aufnahme von Antioxidantien abzulehnen.

## **Klinische Studien**

Im klinischen Bereich liegen zahlreiche Beobachtungsstudien vor, die einen Abfall an Antioxidantien (Serum Vitamin C, Vitamin E,  $\beta$ -Carotin, Mikronährstoffe), eine verminderte Aktivität der antioxidativen Enzyme, eine Vermehrung von oxidativ geschädigten Biomolekülen und eine verminderte antioxidative Kapazität beschreiben. Dies gilt sowohl für akute Krankheitsbilder (Polytrauma, ARDS, Verbrennungspatienten,...), als auch für chronische wie cystische Fibrose, rheumatoide Arthritis, Morbus Crohn, etc. Wenn oxidativer Stress nicht nur ein unbedeutendes Epiphänomen bei diversen Erkrankungen darstellt, dann müsste eine Supplementation mit Antioxidantien, die auf eine Verringerung der durch ROS entstehenden Folgeschäden abzielt, zu einer Besserung des pathophysiologischen Zustandes führen. Eine erwartete Verbesserung der Symptomatik durch die Gabe von Antioxidantien bleibt allerdings in den meisten Untersuchungen aus. Einzelne Studien zeigen zwar positive Effekte, wie z.B. die Verringerung der Mortalität bei Verbrennungspatienten mit extrem hohen Dosierungen an Vitamin C, dennoch können keine generellen Schlüsse über die positive Wirkung von Antioxidantien gezogen werden.

### **Fazit:**

Zurzeit besteht keine wissenschaftlich fundierte Begründung für die Gabe von Antioxidantien. Randomisiert kontrollierte Studien zeigen keinen Benefit einer Antioxidantiengabe. Ganz im Gegenteil die Einnahme an Antioxidantien zeigte in großen Interventionsstudien sogar negative Effekte. So unglaublich diese Ergebnisse auch sein mögen, die Entscheidungen für Patienten werden nicht auf hypothetischen Grundlagen, sondern anhand von randomisierten, doppelblind plazebokontrollierten Studien am Menschen gefällt. Aus diesem Grund sollte im Moment keine Empfehlung für eine Supplementation erfolgen. Wenn wir wissen welche

Antioxidantien, in welcher Menge und zu welchem Zeitpunkt verabreicht werden sollen, besteht die Hoffnung, daß Antioxidantien tatsächlich in die Therapie von diversen Erkrankungen einbezogen werden.

### **Diagnostische Methoden**

Da freie Radikale eine extrem kurze Lebensdauer haben, ist es bis jetzt praktisch unmöglich, sie direkt im Organismus zu bestimmen. Aus diesem Grund versucht man Surrogatparameter zu bestimmen. Diese können a) die Konzentration der Antioxidantien im Plasma, b) die durch oxidativen Stress geschädigten Biomoleküle oder c) die antioxidative Kapazität sein.

### **Konzentration von Antioxidantien in Plasma/Serum**

Für die Bestimmung der Antioxidantien im Plasma oder Serum werden am häufigsten folgende Parameter herangezogen: Vitamin E, Vitamin C,  $\beta$ -Carotin, Selen und Zink.

Die Bestimmung von Vitamin E, Vitamin C und  $\beta$ -Carotin wird aus Serum mit Hilfe der HPLC durchgeführt. Die Spurenelemente Selen und Zink werden ebenfalls aus Serum oder EDTA-Plasma mit Hilfe der Atomabsorptionsspektroskopie bestimmt.

Der Verlust an einem individuellen Antioxidans kann im Serum oder Plasma gemessen werden und als Index für oxidativen Stress gelten. Man sollte aber nicht außer Acht lassen, daß eine Verminderung eines Antioxidans nicht notwendigerweise bedeutet, daß oxidativer Stress vorliegt, es kann einfach bedeuten, daß der Abwehrmechanismus seine normale Funktion erfüllt hat.

### **Durch oxidativen Stress geschädigte Biomoleküle**

#### **Malondialdehyd (MDA)**

Eine der am häufigsten verwendeten Methoden zur Bestimmung der oxidativen Schädigung von Biomolekülen stellt die Messung von Malondialdehyd als

Abbauprodukt der Lipidperoxidation dar. Bei dieser Methode wird die biologische Probe mit Thiobarbitursäure inkubiert, welche ein Addukt mit Malondialdehyd bildet und spektrophotometrisch bestimmt werden kann. So einfach diese Methode zu sein scheint, gibt es auch hier erhebliche methodische Schwierigkeiten. So reagiert Thiobarbitursäure nicht nur mit Malondialdehyd, sondern auch mit anderen Molekülen (z.B. Biliverdin, einige Aminosäuren).

#### oxidiertes LDL Antikörper (OxLAB)

Eine relativ neue Methode ist die Bestimmung von Antikörpern gegen oxidiertes LDL. Diese Antikörper stellen einen körpereigenen Schutz gegen oxidiertes LDL dar und verhindern dessen Permeabilität durch die Gefäßwand. Eine Erhöhung der Antikörper gegen oxidiertes LDL wird als Indikator für oxidativen Stress gewertet. So konnte eine erhöhte Menge an diesen Antikörpern bei Patienten mit akutem Myokardinfarkt, Inflammation sowie Sepsis festgestellt werden. Die Messung erfolgt mittels „enzyme-linked-immuno assay“ (ELISA).

#### Totale antioxidative Kapazität

Es stehen verschiedene Assays für die Bestimmung der antioxidativen Kapazität in Körperflüssigkeiten zur Verfügung. Das Grundprinzip all dieser Methoden ist gleich. Die in der biologischen Probe enthaltenen Antioxidantien schützen ein chromogenes Substrat vor dem durch ein Radikal induzierten oxidativen Angriff. Die Zeitspanne und das Ausmaß, mit der die Probe diese Oxidation verhindert, kann bestimmt werden und wird meist mit Trolox (wasserlösliches Vitamin E) oder Vitamin C als Standard verglichen. Je länger es dauert, um ein Chromogen zu oxidieren, desto höher ist die antioxidative Kapazität. Durch verschiedene Extraktionen kann man die antioxidative Kapazität von lipidlöslichen und wasserlöslichen Substanzen untersuchen.

Die Bestimmung der totalen antioxidativen Kapazität in Körperflüssigkeiten ist nützlich, um einen pauschalen Eindruck über die relative antioxidative Aktivität der biologischen Probe zu bekommen. Die Resultate sollten aber im Licht der biochemischen Grundlagen dieser Methoden beurteilt werden. Eine erhöhte antioxidative Kapazität des Plasmas oder Serums bedeutet also nicht zwangsläufig einen besseren Schutz vor Radikalen. Die totale antioxidative Kapazität des Serums ist z.B. in Patienten mit chronischem Nierenversagen erhöht. Diese Erhöhung kommt fast ausschließlich durch die relativ hohen plasmatischen Harnsäurewerte zustande, beide Parameter, die totale antioxidative Kapazität und die Harnsäure, fallen nach einer Hämodialyse ab. Andererseits kann ein Anstieg an Harnsäure eine Depletion an Vitamin C verschleiern und trotzdem eine verbesserte antioxidative Kapazität vortäuschen.

In ähnlicher Weise bedeutet eine geringe totale antioxidative Kapazität nicht unbedingt, daß der Organismus einem erhöhten oxidativen Stress ausgesetzt war. Es kann genauso gut sein, daß die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies vermindert war und daher auch die antioxidativen Schutzmechanismen angepaßt wurden.

### **Indikation zur Messung des oxidativen Stresses:**

Da oxidativer Stress offensichtlich in engem Zusammenhang mit dem Lebensstil steht, kann die Messung des oxidativen Stresses ein guter Anstoß für eine Bewusstseinsänderung in Sachen Ernährung, Bewegung und Umgang mit Stress sein. Aus ernährungsmedizinischer Sicht ist eine Kost reich an Obst und Gemüse zu empfehlen.



Untersuchung	Benötigtes Material	Normalbereiche	Methode	Anmerkung
Antioxidative Kapazität lipidlöslicher Substanzen	Serum	55-137 µmol/l	photometrisch	Bei Verminderung Bestimmung von Vitamin E evt. β-Carotin, Ubichinon
Antioxidative Kapazität wasserlöslicher Substanzen	Serum	M: 534-915 mmol/l F: 213-629 mmol/l	photometrisch	Bei Verminderung Bestimmung von Vitamin C
Vitamin E	Serum lichtgeschützt	4-16 mg/l	HPLC	
Vitamin C	Serum lichtgeschützt	5-15 mg/l	HPLC	
β-Carotin	Serum lichtgeschützt	150-1100 µg/l	HPLC	
Selen	Serum	60-140 µg/l	AAS	Bestimmung der GSH-Pxd
Zink	Serum ohne Trenngel	M: 11,1-17,5 µmol/l F: 10,7-17,5 µmol/l	AAS	
Malondialdehyd (MDA)	EDTA-Blut	< 1 µmol/l	HPLC; spektrophotometrisch	
oxLab	Serum	< 900 U/l	ELISA	
Glutathion-Peroxidase (GSH-Pxd)	EDTA-Blut	27,5-73,6 U/l	photometrisch	Bestimmung bei Selenmangel
Superoxiddismutase (SOD)	EDTA-Blut	700-1100 U/g Hb	photometrisch	

### **Zusammenfassung**

Insgesamt zeichnet sich ab, daß Antioxidantien ein beträchtliches biologisches Potential aufweisen, welches, wenn richtig und kritisch genutzt, für den Menschen in der Prävention aber auch Intervention von Krankheiten von Bedeutung sein könnte. Voraussetzung ist jedoch, daß nicht nur eine Wirkung bejubelt, sondern auch die Langzeitsicherheit der Anwendung geprüft ist, da sonst Gefahren resultieren könnten, die möglicherweise weitaus schwerwiegender sind als die Krankheiten, die wir mit der Anwendung von Antioxidantien verhindern wollen. Obwohl so viele Krankheiten mit einer Erhöhung des oxidativen Stresses korrelieren, ist es dennoch schwierig Empfehlungen für die Supplementation mit Antioxidantien auszusprechen, die Gründe dafür sind folgende:

- 1) Antioxidantien können in höheren Mengen oder durch veränderte Umgebungsbedingungen (Vorhandensein von Übergangselementen, freies Eisen, Kupfer,..) auch prooxidative Wirkungen entfalten.
- 2) Große Interventionsstudien (20.000 – 30.000 Studienteilnehmer !) über die chronische Supplementierung mit  $\beta$ -Carotin und  $\alpha$ -Tocopherol zeigen wenig Erfolg bzw. sogar negative Ergebnisse.
- 3) Für den Großteil an antioxidativ wirkenden Nährstoffen liegen keine vergleichbaren Studien vor.
- 4) Die von niedergelassenen Ärzten durchgeführten Therapien mit Antioxidantien haben leider nur anekdotischen Wert, da keine wissenschaftlichen Publikationen über diese Behandlungen vorliegen und sie sich damit einer evidenzbasierten Beurteilung entziehen.
- 5) Die kurzfristige klinische Gabe von Antioxidantien, v.a. Vitamin C und Vitamin E, zeigten bei einigen Krankheitsbildern positive Effekte. Allerdings stehen auch hier größere systematische Studien aus.

**Literatur:**

- 1) Halliwell B. and Gutteridge JMC. Free radicals in biology and medicine; Oxford University Press Third Edition 1999; ISBN 0 19 850045 9
- 2) Sies H. Strategies of antioxidant defense. Eur J Biochem 1993; 215:213-219
- 3) Biesalski HK. The role of antioxidants in nutritional support. Nutrition 2000; 16:593-596

- 4) Stephens Ng Parsons A., Schofield PM et al. Randomised controlled trial of vitamin E in patients with coronary disease: Cambridge Heart Antioxidant Study (CHAOS) Lancet 1996; 347:781-786
- 5) Leppälä JM, Virtamo J, Fogelholm R et al. Controlled trial of  $\alpha$ -Tocopherol and  $\beta$ -carotene supplements on stroke incidence and mortality in male smokers. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2000; 20:230-235
- 6) GISSI Prevenzione Investigators; Dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids and vitamin E after myocardial infarction: results of the GISSI-Prevenzione trial. Lancet 1999; 354:447-455
- 7) Albanes D, Heinonen OP, Taylor PR et al. Alpha-Tocopherol and beta-carotene supplements and lung cancer incidence in the alpha-tocopherol, beta-carotene cancer prevention study : effects of base-line characteristics and study compliance. J Natl Cancer Inst 1996;88:1560-1570
- 8) Cook NR, Le IM, Manson JE et al. Effects of beta-carotene supplementation on cancer incidence by baseline characteristics in the Physicians' Health Study (United States). Cancer Causes Control 2000; 11:617-626
- 9) Omenn GS, Goodman GE, Thornquist MD et al. Effects of a combination of beta carotene and vitamin A on lung cancer and cardiovascular disease. N Engl J Med 1996; 334:1150-1155
- 10) The Heart Outcome Prevention Evaluation study investigators. Vitamin E supplementation and cardiovascular events in high-risk patients. N Engl J Med 2000;343:154-360