

07.08.2013

"Dexamethason und Selenige Säure als Beispiele für ultraschnell wirksame direkte Radikalfänger: Quantenpharmakologische Untersuchungen"

Hans-Georg Mack, Manfred Müsse

**Institut für Physikalische und Theoretische Chemie,
Universität Tübingen, Auf der Morgenstelle 18, 72076 Tübingen
e-mail: hans-georg.mack@uni-tuebingen.de**

Der Begriff "**Reaktive Sauerstoffspezies (ROS)**" bezieht sich sowohl auf radikalische (z.B. das Hydroxyl-Radikal, HO \cdot) wie auch auf nicht-radikalische Verbindungen (z.B. Wasserstoffperoxid, H $_2$ O $_2$) [1]. In Tabelle 1 sind verschiedene ROS zusammengestellt. Als Radikale bezeichnet man Moleküle (und Atome), die mindestens ein freies, ungepaartes Elektron enthalten, das "einen Partner sucht", bzw. eine chemische Bindung ausbilden möchte. Daher sind Radikale in der Regel chemisch äußerst aggressive Substanzen. Radikale bzw. ROS im allgemeinen (besonders in hohen Konzentrationen) sind aus diesem Grund extrem schädlich für den Organismus insgesamt [1]. Die ROS können aus exogenen (z.B. Ozonspaltung durch UV-Licht, Radiolyse von Wasser, aus Zigarettenrauch oder durch Strahlentherapie) oder endogenen (z.B. unvollständige Reduktion von Sauerstoff in der Atmungskette in den Mitochondrien, Aktivierung von Eosinophilen und Makrophagen bei Entzündungsprozessen) Quellen stammen (siehe Tabelle 1) [2].

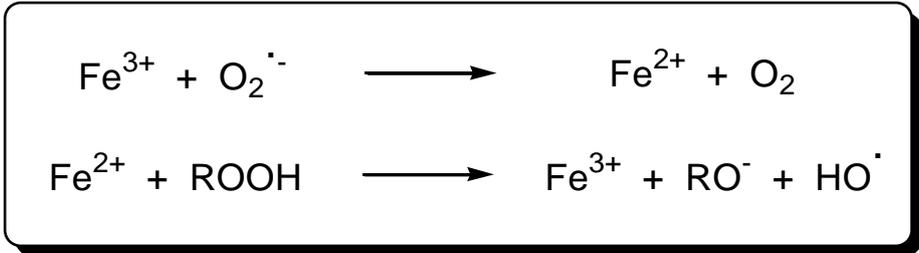
Tabelle 1: Verschiedene ROS und deren mögliche Quellen

| | |
|---|--|
| Singulett-Sauerstoff, $^1\text{O}_2$ | Elektromagnetische Strahlung, Entzündungsprozesse, |
| Superoxidradikal-Anion, $\text{O}_2^{\cdot-}$ | Mitochondriale Atmungskette, Makrophagen (Entzündungen), Photosynthese in Chloroplasten, |
| Wasserstoffperoxid, H_2O_2 | Mitochondriale Atmungskette, Makrophagen |
| Hydroxyl-Radikal, HO \cdot | Umweltverschmutzung (Ozonolyse), Elektromagnetische Strahlung, Radioaktive Strahlung, Mitochondrien, Makrophagen, Chloroplasten |
| Stickstoffmonoxid, NO \cdot | Zigarettenrauch, Makrophagen |
| Peroxyinitrit, ONOO $^-$ | Makrophagen (aus $\text{O}_2^{\cdot-}$ und NO \cdot) |

Der plötzliche Anstieg der Sauerstoffaufnahme von Eosinophilen und Makrophagen bei Entzündungsprozessen ("respiratory burst") führt u.a. zur Bildung von Superoxidanionen, Wasserstoffperoxid, Hydroxylradikalen, Stickstoffmonoxidradikalen

sowie von Singulett-Sauerstoff [2]. Beim Singulett-Sauerstoff, $^1\text{O}_2$, handelt es sich um eine elektronisch angeregte Form des "normalen", atmosphärischen Sauerstoffs $^3\text{O}_2$, den der Organismus fürs Leben braucht. $^3\text{O}_2$, der sogenannte Triplett-Sauerstoff, ist ein Biradikal, d.h. er besitzt zwei ungepaarte Elektronen, er ist aber dennoch sehr reaktionsträge, im Gegensatz zum sehr aggressiven, hochenergetischen Singulett-Sauerstoff, der z.B. zu Schäden an der DNA führen kann und bei der Lipidperoxidation (Zerstörung von Membranen, siehe unten) eine wichtige Rolle spielt [1]. Desweiteren bildet sich beim "respiratory burst" aus $\text{O}_2^{\cdot-}$ und NO^{\cdot} das Peroxynitrit-Anion, ONOO^{\cdot} . Dieses stellt ebenfalls ein Zellgift dar, es schädigt und zerstört z.B. wichtige Proteine und Enzyme. Da jede Entzündung mit der Aktivierung von Eosinophilen und Makrophagen einhergeht, wird auch heute im weißen Blutbild eine der Hauptursachen der Genese von Radikalen gesehen.

Das bei weitem reaktivste und aggressivste Teilchen ist das Hydroxylradikal, HO^{\cdot} [3]. Es hat bei einem physiologischen pH-Wert (im Blut bzw. im Serum) von 7.37 - 7.45 eine extrem kurze Lebenszeit von ca. 10^{-8} s. Seine Lebensdauer und Konzentration steigen mit sinkendem pH-Wert an, insbesondere auch nach der Aktivierung von Phagocyten durch Erreger beim Entzündungsgeschehen. Im hypoxisch azidotischen Milieu führen Hydroxylradikale und protonierte, radikalische Lewis-Basen wie $\text{HO}_2^{\cdot-}$ und $\text{HNO}^{\cdot+}$ neben anderen reaktiven Spezies rasch zur Oxidation von polyungesättigten Fettsäuren (PUFA) und Steroiden in Membranen (Lipidperoxidation). Aus den dabei gebildeten Lipidperoxiden, ROOH , können in einer gekoppelten Haber-Weiss- / Fenton-Reaktion, katalysiert durch kleinste Mengen von Übergangsmetallionen wie z.B. Fe^{2+} oder Cu^+ , extrem schnell enorme Mengen von Hydroxylradikalen gebildet werden [1, 2]:



Die Lipidperoxidation wird so zu einem sich selbst steigernden Prozeß (radikalische Kettenreaktion). Jede Mehrfachbindung reagiert wieder mit einem Hydroxylradikal und geht dabei selbst in den radikalischen Zustand über.

Hauptangriffspunkte der ROS sind u.a. DNA und RNA bzw. deren Bausteine (Adenin, Guanin, Cytosin, Thymin), Proteine und Enzyme sowie die Lipide jeglicher Biomembranen (Zellen, Organellen, etc.). Hier spielt auch die Aktivierung von Komplementproteinen eine Rolle, die zur Ausbildung von Ionenkanälen, zum Einstrom von Ca^{2+} -Ionen und damit zur Zellnekrose führen. ROS spielen nicht nur bei der Nekrose und beim programmierten Zelltod (Apoptose) eine Rolle, sondern auch bei der Onkogenese z.B. durch Punktmutationen (Abb. 1) [4]:

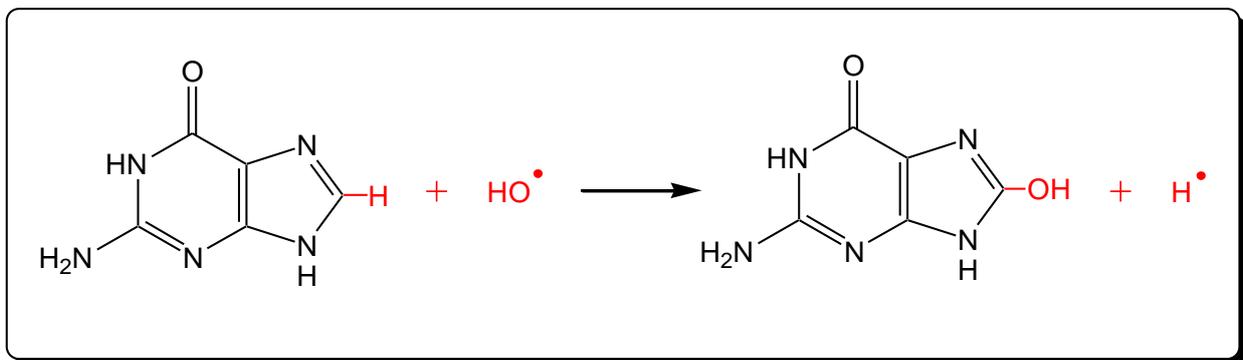


Abb. 1: Umwandlung von Guanin in 8-Hydrox-Guanin durch ein Hydroxyl-Radikal. 8-Hydrox-Guanin paart sich nicht mehr mit Cytosin, sondern mit Adenin, dies entspricht somit einer $\text{G} \rightarrow \text{T}$ Transversion.

Das durch Reaktion eines Hydroxylradikals mit Guanin gebildete 8-Hydroxy-Guanin paart sich bei der DNA-Replikation nicht mehr mit seinem "Standard-Partner" Cytosin, sondern "falsch" mit Adenin, das normalerweise mit Thymin Wasserstoffbrückenbindungen eingeht. Man spricht in diesem Fall von einer $\text{G} \rightarrow \text{T}$ Transversion. Es ist daher wichtig, daß der Störung der DNA-Biosynthese durch ROS in der Zelle besondere Reparaturmechanismen entgegenwirken. Weitere DNA- / RNA-Schädigungen sind z.B. Strangbrüche, die ebenfalls in Schädigungen des Erbgutes resultieren. Punktmutationen und Ablesefehler bei der DNA-Replikation können zu deletären Folgen führen und u.a. in die Onkogenese einmünden [5].

Neben direkten chemischen Schäden wirken ROS auch über Signale [6]. Diese Signaltransduktionen verlaufen mit unterschiedlichsten Geschwindigkeiten in verschiedene Richtungen im Organismus ab. Sprungmechanismen bilden dabei den schnellsten Weg, mit dem Radikal-Eigenschaften bis zur Peripherie gelangen können. Mittels Reizleitung können ebenfalls ROS-Effekte zentrifugal in periphere Bereiche vermittelt werden [6].

Radikale können also Zellmembranen und ganze Zellen zerstören. Diese schädlichen Aktionen sind aber im Organismus bei der phagozytären Abwehr (Einzeller, Infekterreger) und bei der Strahlentherapie (Krebszellen) durchaus erwünscht und gezielt [1].

ROS können durch **Radikalfänger (Antioxidantien)** abgefangen und "vernichtet" werden. Neben dem bekannten Abbau giftiger Peroxide durch Enzyme (Katalasen, Peroxidasen wie die Glutathion-Peroxidase) und antioxidativ wirksamen Vitaminen sowie indirekt über Chelat-Bildner (Abbruch bzw. Verhinderung der gekoppelten Haber-Weiss- / Fenton-Reaktion bei der Lipidperoxidation), gibt es Reaktionen zur "Entsorgung" von Radikalen, die auch vom intensivmedizinischen Standpunkt aus von Nutzen sind [1].

Bei den Wirkungsmechanismen von Radikalfängern muß man zwischen zwei Reaktionsschemata unterscheiden: (i) Katalytische Mechanismen sowie (ii) "verbrauchende Reaktionen". Bei der primär autokatalytischen Reaktion (i) bleibt der Radikalfänger "unbeschädigt", z.B. **Dexamethason** (siehe Abb. 2). Entsprechend den Ergebnissen von quantenpharmakologischen Untersuchungen (ab initio und Dichtefunktional-Methoden) [7] verläuft die Entsorgung von Hydroxylradikalen durch Dexamethason (**1**) über folgenden katalytischen Zyklus: Der Angriff eines Hydroxylradikals an der Carbonylgruppe des Ringes A von (**1**) führt zur Bildung eines kurzlebigen, aber stabilen radikalischen Intermediates (**2**). Der Angriff eines zweiten HO[•]-Radikals an diesem "Peroxid" (**2**) führt zu einer weiteren kurzlebigen Spezies (**3**), die in (**1**) und Wasserstoffperoxid zerfällt. Die Zwischenstufen (**1**) und (**2**) konnten auch experimentell nachgewiesen werden [8]. Vorläufige Berechnungen zeigen weiterhin, dass speziell am Carbonyl-Sauerstoff Hydroxylradikale auch über Wasserstoffbrücken-Bindungen durch "Dimerisierung", d.h. zur Bildung von Wasserstoffperoxid,

HO-OH, gebracht werden können. H_2O_2 ist etwa 10^5 bis 10^6 mal langlebiger als das Hydroxylradikal. Andere Peroxide sind noch stabiler. Peroxide wie das H_2O_2 können durch Enzyme wie Katalase oder Peroxidasen entsorgt und unschädlich gemacht werden [1].

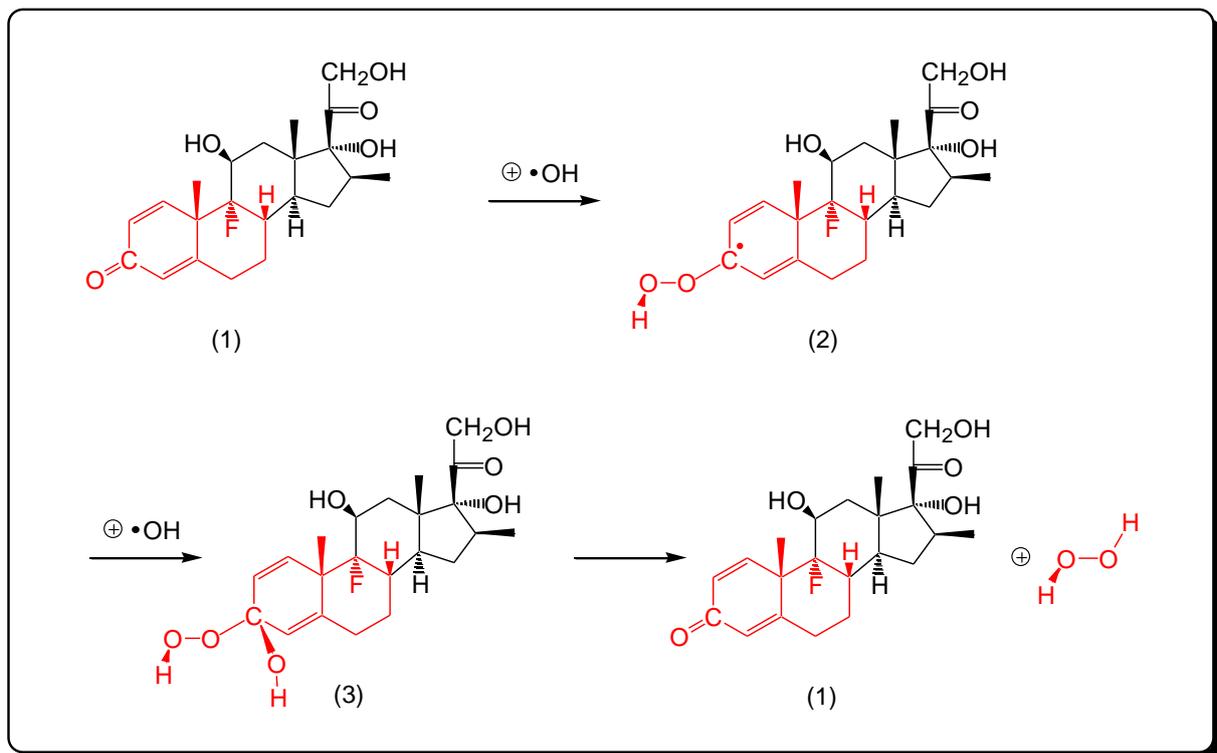


Abb. 2.: Katalytische Entsorgung (i) der Hydroxylradikale durch Dexamethason nach quantenpharmakologischen Berechnungen

Bei der verbrauchenden Reaktion (ii) wird der Radikalfänger stufenweise abgebaut, z.B. **Selenige Säure** (s. Abb. 3). Entsprechende Berechnungen weisen darauf hin, dass im Verlauf der Hydroxylradikal-Entsorgung die Selenige Säure zunächst bis zur Stufe des atomaren Selen abgebaut wird. Dieses Selen im "status nascendi" erfährt auf diversen Wegen Reduktionen bis zur Stufe Se^{2-} des extrem giftigen Selenwasserstoffs (H_2Se). Bevor jedoch im Organismus Selenwasserstoff als Noxe wirkt, kann H_2Se über verschiedene Biomethylierungsmechanismen entgiftet werden [9]. Bei der Trimethylierung entsteht das nierengängige Trimethyl-Selenoniumchlorid. Im Falle von Selenüberschuß assoziiert mit Selenvergiftung bzw. unzureichender Methylierungskapazität bilden sich Monomethylselenwasserstoff

(CH₃SeH) und Dimethylselenid ((CH₃)₂Se), die sehr flüchtig sind und über die Lunge abgeatmet werden können.

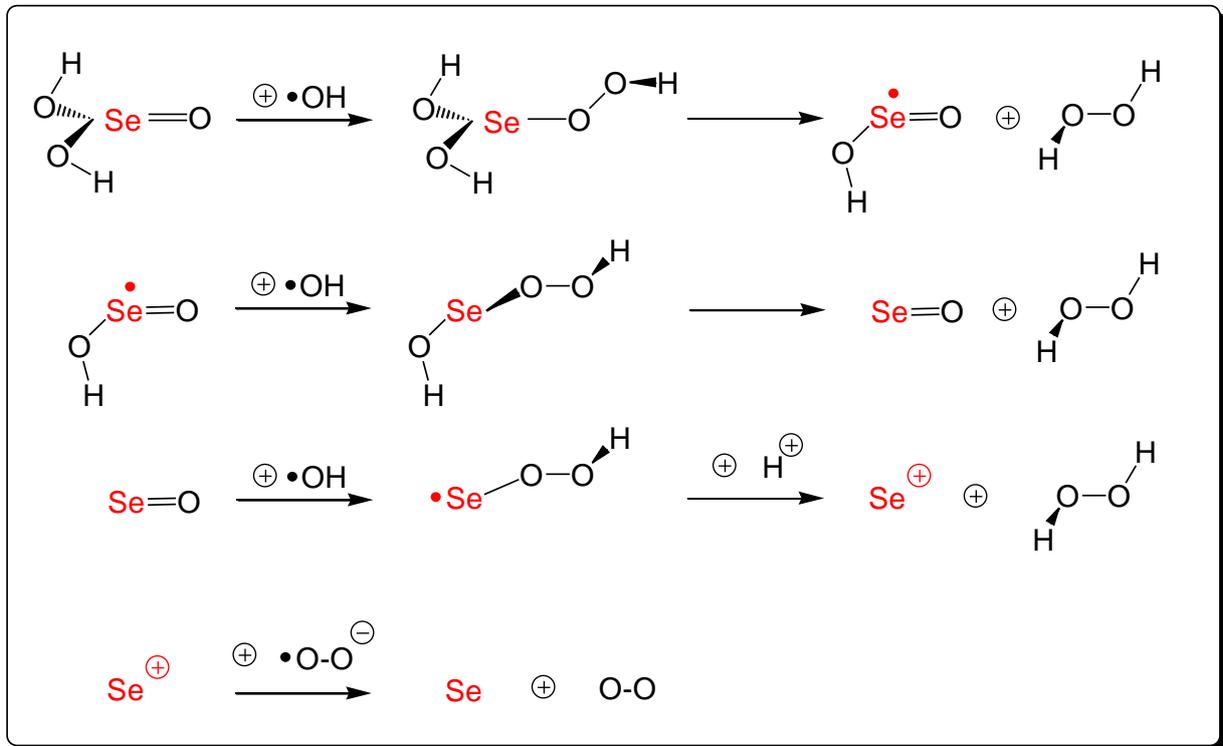


Abb. 3.: Verbrauchende Entsorgung (ii) der Hydroxylradikale durch Selenige Säure nach quantenpharmakologischen Berechnungen

Wie vollzieht sich nun die Reduktion des elementaren Selens bis zur Stufe des hochtoxischen Selenwasserstoffs, und wie verlaufen entgiftende Biomethylierungsreaktionen bis hin zur Exkretion von Trimethylselenonium-Ionen?

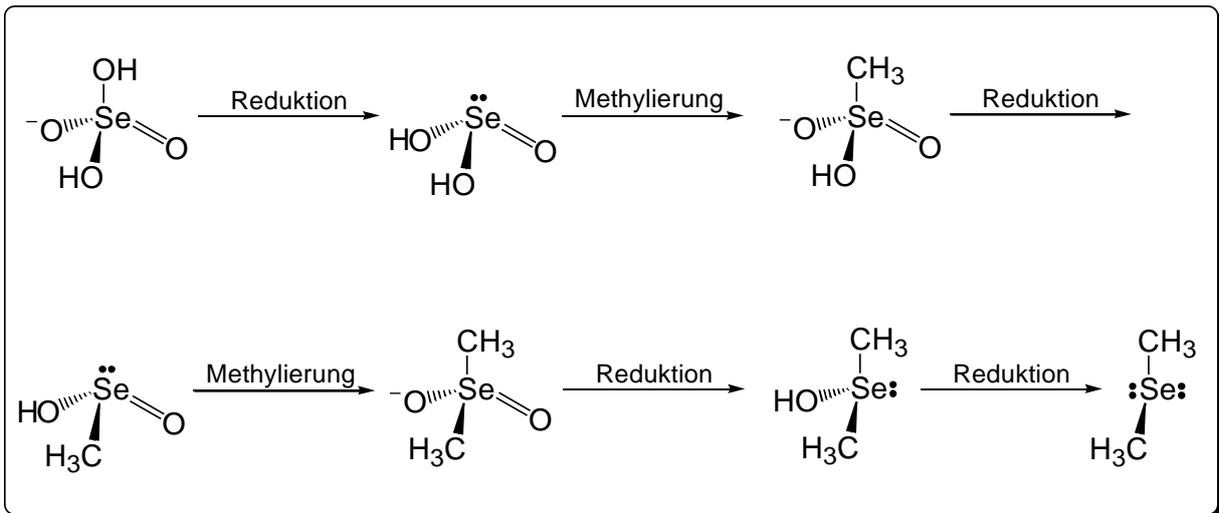
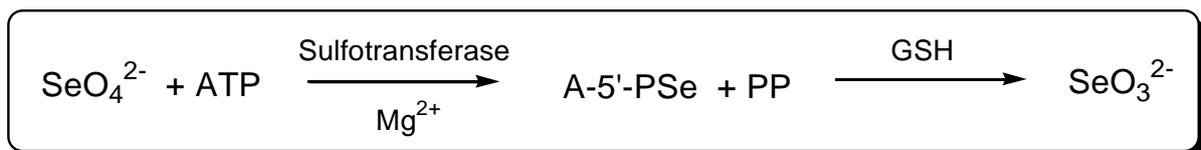


Abb 4: Stufenweise Reduktion und Methylierung von Selenat bzw. Selenit nach Challenger

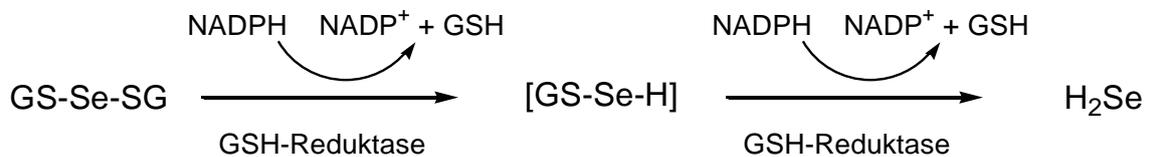
Ausgehend von biologischen und biochemischen Untersuchungen wurden dazu verschiedene Modellvorstellungen entwickelt: (i) Der von Challenger [10] bereits 1945 vorgeschlagene Mechanismus sieht eine stufenweise gekoppelte Reduktion und Methylierung vor (siehe Abb. 4). (ii) Neuere biochemische Untersuchungen weisen auf anorganische Teilreduktionen bei einer Dominanz enzymatisch katalysierter biochemischer Reduktionsschritte bis zum Selenwasserstoff hin [11], der anschließend durch Methylierungsreaktionen entgiftet wird. Da einige pharmazeutische Präparate, insbesondere Mikronährstoffe, auch Selenat (SeO_4^{2-}) enthalten, muß diese Oxidationsstufe des Selens bei der Entsorgung ebenfalls berücksichtigt werden. Dabei wird zunächst Selenat ATP-abhängig mittels Glutathion (GSH) zu Selenit (SeO_3^{2-}) reduziert [11]. Die Sulfotransferase katalysiert bei dieser Reaktion den Se-Transfer unter Bildung von Adenosyl-5'-phosphoselenat (A-5'-PSe), welches durch GSH zum Selenit reduziert wird:



Im nächsten Schritt überführt reduziertes Glutathion Selenit im sauren Milieu in Selenodiglutathion:



In einem NADP-abhängigen Prozeß katalysiert die Glutathionreduktase die Reduktion des Selenodiglutathions über Glutathionylselenwasserstoff ("Seleno-persulfid") als Zwischenstufe zum Selenwasserstoff, der wiederum durch entsprechende Biomethylierung entsorgt werden muss:



Die Biomethylierung verläuft sowohl gemäß dem Challenger-Mechanismus [10] als auch entsprechend den neueren Untersuchungen [11] über Methylkationen, wobei Hydridanionen das Reduktionsmittel darstellen. Bei diesen beschriebenen Mechanismen ergeben sich aber folgende Probleme:

- (a) Die pH-Abhängigkeit der Reduktion von Selen-Sauerstoffverbindungen wurde biologisch-biochemisch bisher nicht untersucht.
- (b) Zur Selen-Biomethylierung unter pathobiochemischen Bedingungen existieren weder biologische oder humanmedizinisch relevante Befunde noch überzeugende Modellvorstellungen.
- (c) Entsprechend der hier diskutierten konventionellen Betrachtungen sind Reduktion und oxidative Methylierung ausschließlich ionische Vorgänge, bei denen Hydridanionen und Methylgruppen (als Carbokationen) übertragen werden. Es ist aber davon auszugehen, daß Methylierungen (Haupt-Entgiftungs-Reaktionen) einem radikalischen Mechanismus folgen. Vorläufige quantenchemische Berechnungen für Modellsubstanzen (einfache Carbokationen und entsprechende anionische Strukturen) zeigen, daß die Ionen energetisch weniger stabil sind als die radikalischen Intermediate.

- (d) Radikale bzw. radikalische Zwischenstufen mit ungeraden Oxidationszahlen für die Se-Sauerstoffverbindungen (Se^{5+} , Se^{3+} , Se^{1-}) werden dabei nicht in Betracht gezogen.

Diese angesprochenen Punkte zeigen deutlich, dass auf diesem Gebiet weitere umfangreiche Grundlagenforschung unumgänglich ist. Insbesondere können dabei quantenpharmakologische Methoden (ab initio und Dichtefunktional-Verfahren) zu einem tiefergehenden Verständnis metabolischer Reaktionsmechanismen, die beim oxidativen Stress von Bedeutung sind, führen. Berechnungen dieser Art werden seit Jahren in der Physik, Chemie und Biologie erfolgreich zur Voraussage und Bestätigung experimenteller Daten eingesetzt. Sie sind insbesondere für das Studium ultraschneller Prozesse der Intensiv-, Notfall- und Katastrophenmedizin jeglichen experimentellen Untersuchungen hoch überlegen und unverzichtbar, da äußerst kurzlebige Metabolite normalerweise nicht isoliert werden können. Aus diesem sowie auch aus ethischen Gründen sind randomisierte prospektive crossover-Studien in diesen Fällen nicht sinnvoll durchführbar. Aus den obigen Darlegungen ergeben sich als weitere Zielsetzungen:

- 1.) **Die Erkenntnisse der konventionellen Medizin werden in vielerlei Hinsicht erweitert.**
- 2.) **Die Kassenmedizin wird nur so in die Lage versetzt, in absehbarer Zeit kostengünstige Therapieverfahren anzubieten und zu erheblichen Einsparungen im Gesundheitswesen beizutragen.**

Literatur:

- [1] (a) J.A. Knight, "Free Radicals, Antioxidants, Aging, and Disease", AACC Press, Washington, DC, 1999; (b) E.F. Elstner, "Sauerstoffabhängige Erkrankungen und Therapien", BI Wissenschaftsverlag, Mannheim, 1993.
- [2] C. Borek, "Antioxidants and Cancer", *Science&Medicine*, **Nov./Dec.** 1997, 52.
- [3] S. Chen, P. Schopfer, "Hydroxyl-radical production in physiological reactions", *Eur. J. Biochem.*, **260** (1999) 726.
- [4] K.Z. Guyton, T.W. Kensler, "Oxidative mechanisms in carcinogenesis", *Brit. Med. Bull.*, **49** (1993) 523.
- [5] J. Cadet, T. Delatour, T. Douki, D. Gasparutto, J.-P. Pouget, J.-L. Ravanat, S. Sauvaigo, "Hydroxyl radicals and DNA base damage", *Mutat. Res.*, **424** (1999), 9.
- [6] W. Dröge, "Free radicals in the physiological control of cell function", *Physiol. Rev.*, **82** (2002) 47.
- [7] H.-G. Mack, V. Maier, M. Müsse, "Dexamethasone – A direct free radical scavenger", Veröffentlichung in Vorbereitung.
- [8] P. Calza, E. Pelizzetti, M. Brussino, C. Baiocchi, "Ion Trap Tandem Mass Spectrometry Study of Dexamethasone Transformation Products on Light Activated TiO₂ Surface"
- [9] T.G. Chasteen, R. Bentley, "Biomethylation of Selenium and Tellurium: Micrororganisms and Plants", *Chem. Rev.*, **103** (2002), 1, sowie dort angegebene Literatur.
- [10] F. Challenger, *Chem. Rev.*, **36** (1945) 315.
- [11] (a) G.F. Combs Jr., S.B. Combs, "The Role of Selenium in Nutrition", Academic Press, Inc., Orlando, Florida, 1986; (b) C. Reilly, "Selenium in Food and Health", Blackie Academic & Professional, London, 1996; (c) R.A. Sunde, "Molecular Biology of Selenoproteins", *Ann. Rev. Nutr.*, **10** (1990) 451.