

Oxidativer Stress – Monitoring der oxidativen Belastung

WOLF D. KUHLMANN*

MVZ für Laboratoriumsmedizin Koblenz-Mittelrhein, 56068 Koblenz

Laboratory Diagnostics & Cell Science, 56112 Lahnstein

Ein personenbezogenes Analysenprogramm umfaßt die Messung von Spurenelementen, Antioxidantien und oxidativem Stress. Dabei lassen sich mit sog. Stress Checks oder mit gezielten Einzelanforderungen antioxidative Versorgung, Entgiftungskapazität und oxidative Belastungsparameter beurteilen. Die Einzelanforderung ist vor allem für die Differentialdiagnostik (z.B. bei bekanntem oxidativen Status des Patienten) oder für eine Verlaufskontrolle sinnvoll.

1. Untersuchungsverfahren für die Messung von Spurenelementen

Selen und Zink

Prinzip

Atomabsorptionsspektrometrie mit Graphitrohrtechnik (Selen im Serum), Hydridtechnik (Selen im Urin) oder Flamme (Zink) unter Mitführung von jeweiligen Standardlösungen.

Probenmaterial

Serum (Gerinnungszeit maximal 30 Min., Probe muß hämolysefrei sein); alternativ Spontanurin, z.B. 2. Morgenurin, Selen- und Zink-Werte werden auf Kreatinin bezogen, da dieses relativ konstant und unabhängig vom Diuresestatus ausgeschieden wird.

2. Untersuchungsverfahren für die Messung von Antioxidantien

Gesamte antioxidative Kapazität

2.1 Antioxidative Kapazität (TAS)

Prinzip

Die in der Untersuchungsprobe vorliegenden Antioxidantien reagieren während eines definierten Zeitraumes mit exogen zugeführtem Peroxid. Parallel zum Versuchsansatz werden Kontrollproben und Kalibrator mitgeführt. In einem zweiten Inkubationsschritt wird das nicht umgesetzte Peroxid mittels einer Peroxidase katalysiert und durch eine chromogene Reaktion bestimmt. Die photometrische Quantifizierung erfolgt durch Mitführung eines Kalibrators.

Probenmaterial

Serum (Gerinnungszeit maximal 30 Min.) oder Heparin-Plasma sind geeignet. Proben kühl und lichtgeschützt aufbewahren; bei 4° C für 24 Std. stabil, sonst bei -20° C lagern.

* Arzt- und Patienteninformation erstellt für das MVZ Koblenz-Mittelrhein

Präventive Antioxidantien

2.2 Coeruloplasmin, Albumin, Transferrin, Myoglobin

Prinzip

Quantitative nephelometrische Messung unter Mitführung von Standards/Kalibratoren.

Probenmaterial

Serum.

2.3 Ferritin

Prinzip

Radioimmunoassay oder analoge Testverfahren, z.B. Chemolumineszenzassay oder heterogener Enzymimmunoassay (ELISA) unter Mitführung von Standards.

Probenmaterial

Serum.

2.4 Glutathion (GSH/GSSG)

Prinzip

HPLC, Trennung in einem isokratischen Verfahren in zwei Läufen: a) für die Messung von reduziertem GSH und b) für die Messung von Gesamt-Glutathion (durch vorheriges Überführen des oxidierten GSSG in reduziertes GSH, Zugabe eines internen Standards). Bei beiden Verfahren wird eine Derivatisierungsreaktion durchgeführt, wodurch Glutathion in ein fluoreszierendes Produkt umgesetzt wird; Aufnahme der Chromatogramme mit einem Fluoreszenz-Detektor. Die Quantifizierung erfolgt über einen EDTA-Vollblut-Kalibrator; Berechnung der Ergebnisse (über die interne Standard-Methode) anhand der Integration der Peakflächen. Die Messung des reduzierten Glutathions erfolgt ohne internen Standard (da ansonsten Mischsulfide gebildet werden). Durch Subtraktion ($GSH_{\text{gesamt}} - GSH_{\text{reduziert}}$) errechnet sich der Anteil an oxidiertem Glutathion. Bei der Berechnung von oxidiertem Glutathion muß berücksichtigt werden, dass oxidiertes Glutathion in zwei GSH gespalten wird (d.h. die ermittelte Differenz wird durch zwei dividiert).

Probenmaterial

EDTA-Vollblut, nach der Abnahme kühl lagern; bei 4° C für 24 Std. stabil.

2.5 Coenzym Q10 (Ubichinon)

Prinzip

HPLC mit internem Standard, Trennung in einem isokratischen Verfahren, Aufnahme der Chromatogramme mit einem UV-Detektor. Die Quantifizierung erfolgt über einen EDTA-Vollblut-Kalibrator; Berechnung der Ergebnisse (interne Standard-Methode) anhand der Integration der Peakflächen.

Probenmaterial

EDTA-Vollblut, nach der Abnahme kühl lagern; bei 4° C für 24 Std. stabil.

Enzyme als Fänger-Antioxidantien

2.6 Superoxid Dismutase (SOD)

Prinzip

Quantitative Bestimmung von Cu/Zn-SOD und Mn-SOD mit einem heterogenen Enzym-immunoassay unter Mitführung von jeweiligen Standards.

Probenmaterial

Heparin-Vollblut, nach der Abnahme kühl und lichtgeschützt lagern; bei 4° C für 24 Std. stabil.

2.7 Glutathion Peroxidase (GPx)

Prinzip

Photometrische Methode (UV-Methode): GPx katalysiert die Oxidation von Glutathion (GSH) durch Cumen-Hydroperoxid. In Anwesenheit von Glutathion Reduktase (GR) und NADPH wird oxidiertes Glutathion (GSSG) sofort in die reduzierte Form konvertiert, gleichzeitig wird NADPH zu NADP⁺ oxidiert. Für die quantitative Berechnung wird die Absorptionsabnahme bei 340 nm unter Zugrundelegung eines Kalibrators verwendet.

Probenmaterial

Heparin-Vollblut, nach der Abnahme kühl und lichtgeschützt lagern; bei 4° C für 24 Std. stabil.

2.8 Glutathion Reduktase (GR)

Prinzip

Photometrische Methode (UV-Methode): GR katalysiert die Reduktion von oxidiertem Glutathion (GSSG) in Anwesenheit von NADPH, das dadurch zu NADP⁺ oxidiert wird. Für die quantitative Berechnung wird die Absorptionsabnahme bei 340 nm unter Zugrundelegung eines Kalibrators verwendet.

Probenmaterial

Serum, Plasma (Heparin oder EDTA) oder Erythrozyten (aus Heparin-Vollblut).

2.9 Glutathion-S-Transferase π (GST)

Prinzip

Quantitative Bestimmung von GST (humane Isoform π) mittels Radioimmunoassay oder ELISA unter Mitführung von Standards.

Probenmaterial

Serum, Plasma (Heparin oder EDTA) oder Erythrozyten (aus Heparin-Vollblut).

Vitamine, Provitamine als Fänger-Antioxidantien

2.10 Vitamin A, Vitamin E

Prinzip

HPLC mit internem Standard, Trennung in einem isokratischen Verfahren, Aufnahme der Chromatogramme mit einem UV-Detektor bei zwei verschiedenen Wellenlängen (Vitamin A: 325 nm; Vitamin E: 300 nm). Die Quantifizierung erfolgt über einen Standard; Berechnung der Ergebnisse (über die interne Standard-Methode) anhand der Integration der Peakflächen.

Probenmaterial

Serum (Gerinnungszeit maximal 30 Min.) und Plasma (EDTA, Heparin) sind geeignet. Proben sofort nach der Abnahme kühl und lichtgeschützt aufbewahren; bei 4° C für 12 Std. (Vitamin A) bzw. für 24 Std. (Vitamin E) stabil, sonst bei -20° C lagern.

2.11 Vitamin C

Prinzip

HPLC, Trennung in einem isokratischen Verfahren, Aufnahme der Chromatogramme mit einem UV-Detektor. Die Quantifizierung erfolgt über einen Kalibrator; Berechnung der Ergebnisse (über die externe Standard-Methode) anhand der Integration der Peakfläche.

Probenmaterial

Heparin-Plasma (Lithium-Heparinat, z.B. Sarstedt Monovette LH), nach der Abnahme kühl und lichtgeschützt lagern; bei 4° C für 24 Std. stabil. Vitamin C ist sehr oxidationsempfindlich, daher im Labor sofort mit Fällungsreagenz stabilisieren. Der Überstand ist dann bei 20° C und Dunkelheit für 24 Std. stabil; ggf. bei -20° C lagern.

2.12 β Carotin/Carotinoide

Prinzip

HPLC mit internem Standard, Trennung in einem isokratischen Verfahren, Aufnahme der Chromatogramme mit einem UV/VIS-Detektor zur sicheren Erfassung von α -, *cis*- β - und *all-trans*- β -Carotin. Für die Quantifizierung dient der interne Standard auf der Basis eines nicht natürlich vorkommenden Carotinoid-Derivats; Berechnung der Ergebnisse (über die interne Standard-Methode) anhand der Integration der Peakfläche.

Probenmaterial

Serum (Gerinnungszeit maximal 30 Min.) und Plasma (EDTA, Heparin) sind geeignet. Proben sofort nach der Abnahme kühl und lichtgeschützt aufbewahren; bei 4° C für 24 Std. stabil, sonst bei -20° C lagern.

3. Untersuchungsverfahren für die Messung von oxidativem Stress

Oxidativer Status, Reaktionsprodukte

3.1 Lipidperoxidation, oxidierte LDL (gesamt)

Prinzip

Die direkte Korrelation zwischen freien Radikalen und zirkulierenden biologischen Peroxiden (Lipidperoxide, oxidierte LDL/PUFAs) erlaubt die Charakterisierung des oxidativen Status von biologischen Proben. Es wird die Peroxid-Konzentration in der Probe durch Reaktion mit Peroxidase und dem chromogenen Substrat TMB (Tetramethylbenzidin) ge-

messen. Die photometrische Quantifizierung erfolgt durch Mitführung eines Kalibrators.

Probenmaterial

Serum (Gerinnungszeit maximal 30 Min.) und Plasma (EDTA) sind geeignet. Proben sofort nach der Abnahme kühl und lichtgeschützt aufbewahren; bei 4° C für 24 Std. stabil, sonst bei -20° C lagern.

3.2 Lipidperoxidation, oxidiertes Apolipoprotein B

Prinzip

Quantitative Bestimmung von oxidiertem Apolipoprotein B mittels Enzymimmunoassay, basierend auf direkter Sandwich-Technik, bei der zwei monoklonale Antikörper (gegen verschiedene antigene Determinanten des oxidierten Apolipoprotein B Moleküls gerichtet) verwendet werden; ein monoklonaler Antikörper als Fänger-Antikörper an der festen Phase der Mikrotiterplatte, der zweite monoklonale Antikörper als Detektor-Antikörper mit Peroxidase konjugiert. Die gebundenen Konjugate werden mit chromogener Substratlösung (TMB) detektiert und photometrisch gemessen. Die Berechnung der jeweiligen Probenkonzentrationen erfolgt unter Mitführung von Standards.

Probenmaterial

EDTA-Plasma, Proben sofort nach der Abnahme kühl und lichtgeschützt aufbewahren; bei 4° C für mind. 24 Std. stabil, sonst bei -20° C lagern.

3.3 8-Hydroxy-2'-deoxyguanisin (8-OHdG)

Prinzip

Bestimmung des oxidativen DNS-Produktes 8-Hydroxydesoxyguanosin mit kompetitivem Enzymimmunoassay unter Verwendung eines monoklonalen Antikörpers gegen 8-OHdG. Der Analyt in der Probe und auf der Mikrotiterplatte fixiertes 8-OHdG konkurrieren um die Bindung an einen Maus Anti-8-OHdG Antikörper. Nach einem Waschschrift werden die Bindungspartner über den Detektor-Antikörper (Ziege Anti-Maus IgG mit Peroxidase konjugiert) und einer chromogenen Substratlösung (TMB) photometrisch gemessen. Je höher die 8-OHdG Konzentration in der Probe ist, desto weniger Konjugat/Substrat wird gebunden; die Farbentwicklung ist umgekehrt proportional zur nachgewiesenen Analytmenge. Die Berechnung der jeweiligen Probenkonzentration erfolgt unter gleichzeitiger Mitführung einer Standardkurve.

Probenmaterial

Morgenurin (unbehandelt), nach der Probengewinnung sofort kühl und lichtgeschützt aufbewahren; bei 4° C für mind. 24 Std. stabil, sonst bei -20° C lagern.

3.4 Oxidierte Proteine

Prinzip

Als Merkmal oxidativer Modifikation von Proteinen entstehen Carbonyl-Gruppen in Seitenketten. Diese Modifikation kann mit einem immunologischen Verfahren nachgewiesen werden. Zunächst erfolgt eine Derivatisierung der Carbonyl-Gruppen zu 2,4 Dinitrophenylhydrazonen (DNP-Hydrazon) durch Reaktion mit 2,4 Dinitrophenylhydrazin (DNPH). Die DNP derivatisierten Proteinproben werden dann in einer Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt und einem Western Blotting unterzogen (alternativ kann auch ein Dot-Blot Verfahren angewandt werden). Anschließend erfolgt eine Inkubation der Western Blots mit

spezifischen Antikörpern (Kaninchen), die gegen die DNP Gruppen der Proteine gerichtet sind. Die Antigen-Antikörperbindungen werden mit einem Peroxidase-Antikörperkonjugat (z.B. Ziege Anti-Kaninchen IgG) und einem geeigneten Substrat dargestellt chromogene Substratlösung mit Bildung eines unlöslichen, charakteristischen Farbkomplexes zur visuellen Auswertung oder Verwendung von Chemilumineszenzreagenzien mit Nachweis von generiertem Licht auf Filmmaterial). Aufgrund der Elektrophoresetechnik und der Mitführung von Protein Standards kann der Oxidationsstatus von individuellen Proteingruppen analysiert werden. Eine Quantifizierung ist möglich durch Vergleich der Signalintensitäten.

Probenmaterial

Serum (Gerinnungszeit maximal 30 Min.).

3.5 Stickoxide (gesamt)

Prinzip

Enzymatische Konversion von Nitrat zu Nitrit durch Nitrat-Reduktase und anschließender Reaktion mit Griess-Reagenz (Bildung eines Azofarbstoffes). Das entstandene Reaktionsprodukt wird photometrisch bei 540 nm gemessen. Die Konzentration in den Proben wird durch Mitführung von Nitrat-Standards berechnet.

Probenmaterial

Citrat-Plasma, nach der Abnahme sofort kühl und lichtgeschützt aufbewahren, sonst bei mind. -20° C lagern.

Oxidativer Status, Abbauprodukte und Autoantikörper

3.6 Malondialdehyd (MDA)

Prinzip

HPLC, Trennung in einem isokratischen Verfahren nach vorausgehender Derivatisierungsreaktion (Umsetzung in ein fluoreszierendes Produkt); Aufnahme der Chromatogramme mit einem Fluoreszenz-Detektor. Die Quantifizierung erfolgt über einen Plasma-Kalibrator; Berechnung der Ergebnisse (über die externe Standard-Methode) anhand der Peakhöhe; Einbeziehung einer Leerwert-Analyse erforderlich, Peakhöhe des Leerwertes anschließend von allen Ansätzen subtrahieren.

Probenmaterial

Serum (Gerinnungszeit maximal 30 Min.) und Plasma (Heparin) sind geeignet. Proben sofort nach der Abnahme kühl und lichtgeschützt aufbewahren; bei 4° C für 24 Std. stabil, alternativ bei -20° C lagern.

3.7 Autoantikörper gegen oxidierte LDL

Prinzip

Quantitative Bestimmung von Autoantikörpern gegen oxidierte LDL mittels Enzymimmunoassay unter Mitführung von Standards. Das Nachweisprinzip beruht auf der simultanen Inkubation der Probe mit der mit oxidiertem LDL beschichteten Mikrotiterplatte und der mit LDL beschichteten Pin-Deckelplatte. Dadurch können gegebenenfalls vorhandene Anti-

körper gegen LDL an die Pins gebunden und somit aus der Probe entfernt werden. Der Nachweis der an der Mikrotiterplatte gebundenen Anti-oxLDL Antikörper erfolgt mit einem Peroxidase markierten Anti-Human IgG/IgM Antikörper als Detektor-Antikörper. Die Konjugatkomplexe werden durch Zugabe einer chromogenen Substratlösung (TMB) detektiert und photometrisch gemessen. Die Berechnung der jeweiligen Probenkonzentrationen erfolgt unter Mitführung von Standards.

Probenmaterial

Serum.

Hinweis: Diese Information ersetzt nicht das Gespräch mit Ihrem Arzt.

© Prof. Dr. W. D. Kuhlmann

07.12.2014