

Aus dem Institut für Toxikologie und Pharmakologie für Naturwissenschaftler  
(Direktor: Prof. Dr. Edmund Maser)  
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel  
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**AKKUMULATION VON VITAMIN E IN C6-**  
**RATTENGLIOMZELLEN UND**  
**ZYTOPROTEKTIVE WIRKUNG GEGEN**  
**OXIDATIVEN STRESS**

**Inauguraldissertation**  
**zur Erlangung der Doktorwürde**  
**der Medizinischen Fakultät**  
**der Christian-Albrechts-Universität**  
**zu Kiel**

**vorgelegt von**  
**AGNES MÜLLER**  
**aus Zeven**

**Kiel 2009**

**1. Berichterstatter: Prof. Dr. Maser**  
**2. Berichterstatter: Prof. Dr. Herdegen**  
**Tag der mündlichen Prüfung: 30. Juni 2009**  
**Zum Druck genehmigt, Kiel, den 30. Juni 2009**

**gez.: Prof. Dr. Siebert**  
**(Vorsitzender der Prüfungskommission)**

# Inhaltsverzeichnis

<b>ABKÜRZUNGEN .....</b>	<b>III</b>
<b>1. EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>2. MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>7</b>
2.1 ZELLKULTUR .....	7
2.1.1 C6-Zellen .....	7
2.1.2 Materialien .....	7
2.1.3 Kulturmedien und Lösungen .....	8
2.1.4 Kultivierung .....	9
2.1.4.1 Erhaltungskulturen .....	9
2.1.4.2 25 cm <sup>2</sup> -Flaschen-Versuchskulturen .....	10
2.1.4.3 Mikrotiterplatten-Versuchskulturen .....	10
2.2 MESSUNG ZYTOTOXISCHER UND ZYTOPROTEKTIVER WIRKUNG .....	11
2.2.1 Testsubstanzen .....	11
2.2.2 Versuchsdurchführung .....	12
2.2.2.1 Zytotoxische Wirkung .....	12
2.2.2.2 Zytoprotektive Wirkung .....	13
2.2.3 Proteinbestimmung .....	14
2.2.4 Auswertung .....	16
2.3 VERSUCHE ZUR AKKUMULATION VON $\alpha$ -TOCOPHEROL .....	16
2.3.1 Zeitabhängigkeit der Akkumulation .....	16
2.3.2 Konzentrationsabhängigkeit der Akkumulation .....	17
2.4 BESTIMMUNG DES $\alpha$ -TOCOPHEROL-GEHALTES VON SEREN, MEDIEN UND ZELLEN .....	17
2.4.1 Extraktion .....	17
2.4.3 Auswertung .....	20
<b>3. ERGEBNISSE .....</b>	<b>21</b>
3.1 ZYTOTOXIZITÄT VON CUMOLHYDROPEROXID UND $\alpha$ -TOCOPHEROL .....	21
3.2 ZYTOPROTEKTIVE WIRKUNG VON $\alpha$ -TOCOPHEROL .....	23
3.2.1 Koinkubation mit $\alpha$ -Tocopherol .....	23
3.2.2 Vorinkubation mit $\alpha$ -Tocopherol .....	24
3.2.3 Supplementierung der Wachstumsmedien mit $\alpha$ -Tocopherol .....	26
3.3 KONZENTRATIONSABHÄNGIGKEIT DER ZYTOPROTEKTIVEN WIRKUNG VON $\alpha$ -TOCOPHEROL .....	28
3.4 $\alpha$ -TOCOPHEROL-GEHALT VON SEREN UND KULTURMEDIEN .....	30
3.5 $\alpha$ -TOCOPHEROL-GEHALTE VON C6-ZELLEN UNTER STANDARDBEDINGUNGEN .....	31

## II

3.6 AUFNAHME VON $\alpha$ -TOCOPHEROL AUS DEM KULTURMEDIUM UND AKKUMULATION IN C6-ZELLEN .....	32
3.6.1 <i>Zeitabhängigkeit</i> .....	32
3.6.2 <i>Konzentrationsabhängigkeit</i> .....	36
<b>4. DISKUSSION</b> .....	<b>38</b>
4.1. $\alpha$ -TOCOPHEROL-GEHALTE VON SEREN UND MEDIEN .....	38
4.2 $\alpha$ -TOCOPHEROL-GEHALTE DER C6-ZELLEN UNTER STANDARDBEDINGUNGEN .....	38
4.3 AKKUMULATION VON $\alpha$ -TOCOPHEROL IN C6-ZELLEN.....	40
4.4 ZYTOPROTEKTION .....	42
<b>5 ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>46</b>
<b>6 DANKSAGUNG</b> .....	<b>48</b>
<b>7 LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	<b>49</b>
<b>8. LEBENSLAUF</b> .....	<b>54</b>

## Abkürzungen

CHP	Cumolhydroperoxid
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
EC <sub>50</sub>	Konzentration einer Testsubstanz, die zu einer 50 %igen Reduktion des betrachteten Messparameters gegenüber der Kontrollgruppe führt
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FBS	Fötales Rinderserum (Fetal bovine serum)
HEPES	N-2-Hydroxy-ethyl-piperazin-N-2-ethansulfonsäure
HS	Pferdeserum (Horse serum)
PBS	Phosphate buffered saline
ROS	Reactive oxygen species (Reaktive Sauerstoffspezies)
SD	Standardabweichung des Mittelwertes
SEM	Standardfehler des Mittelwertes

## 1 Einleitung

Bei einer Vielzahl biologischer Reaktionen werden Sauerstoffradikale wie das Superoxidradikalanion ( $\bullet\text{O}_2^-$ ) und nichtradikalische reaktive Sauerstoffspezies wie das Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) gebildet, die unter dem Begriff ROS (= reactive oxygen species = reaktive Sauerstoffspezies) zusammengefasst werden. ROS können durch eine Reihe von Interaktionen schädigend auf Zellen bzw. Zellbestandteile wie DNA, Lipide, Proteine und andere Biomoleküle wirken. Zellen besitzen unter physiologischen Bedingungen eine Anzahl verschiedener enzymatischer und nichtenzymatischer antioxidativer Mechanismen zum Schutz vor diesen schädigenden Einflüssen. Reaktive Sauerstoffspezies können durch zelleigene Enzyme, beispielsweise Superoxiddismutase, Glutathionperoxidase und Katalase, und nichtenzymatische Schutzsysteme wie Glutathion, Ascorbinsäure (Vitamin C), Carotinoide und  $\alpha$ -Tocopherol (Vitamin E) direkt abgefangen bzw. inaktiviert werden. Eine weitere Schutzfunktion besteht in ihrer Fähigkeit, oxidative Prozesse wie z.B. die Lipidperoxidation zu unterbinden. Übersteigt die Bildung der ROS die Kapazität der antioxidativen Systeme, werden zelluläre Bestandteile oxidativ zerstört.

Dieser so genannte oxidative Stress hat für physiologische Prozesse der Alterung eine Bedeutung, ist aber unter anderem auch an der Pathogenese der Atherosklerose und der Tumorentstehung sowie bei neurodegenerativen Prozessen beteiligt (Halliwell and Whiteman, 2004). Die Belastungen für das Gesundheitssystem durch diese Erkrankungen lassen präventive Maßnahmen immer bedeutsamer werden. In der additiven Zufuhr von Pflanzeninhaltsstoffen mit antioxidativer Wirkung, wie z.B. Vitamin E und den Polyphenolen, wird ein schützender Effekt vor oxidativem Stress und den damit assoziierten Erkrankungen vermutet (Rice-Evans et al., 2000; Brigelius-Flohé et al., 2002). Verschiedene epidemiologische Studien beschäftigen sich vor allem mit dem Schutz vor kardiovaskulären Erkrankungen durch Supplementation mit Vitamin E, kommen jedoch nicht zu eindeutigen Ergebnissen (vgl. Munteanu et al., 2003).

Die Tocopherole, die gemeinsam mit den Tocotrienolen unter dem Begriff Vitamin E zusammengefasst werden, stellen eine Gruppe lipophiler Antioxidantien dar. Die verschiedenen z.B. in Pflanzenölen, in Weizenprodukten oder in Maisprodukten natürlich vorkommenden Tocopherole ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ) unterscheiden sich in Anzahl und Stellung der

Methylgruppen am Chromanolring (siehe Abb.1), wobei das  $\alpha$ -Tocopherol am stärksten wirksam ist.

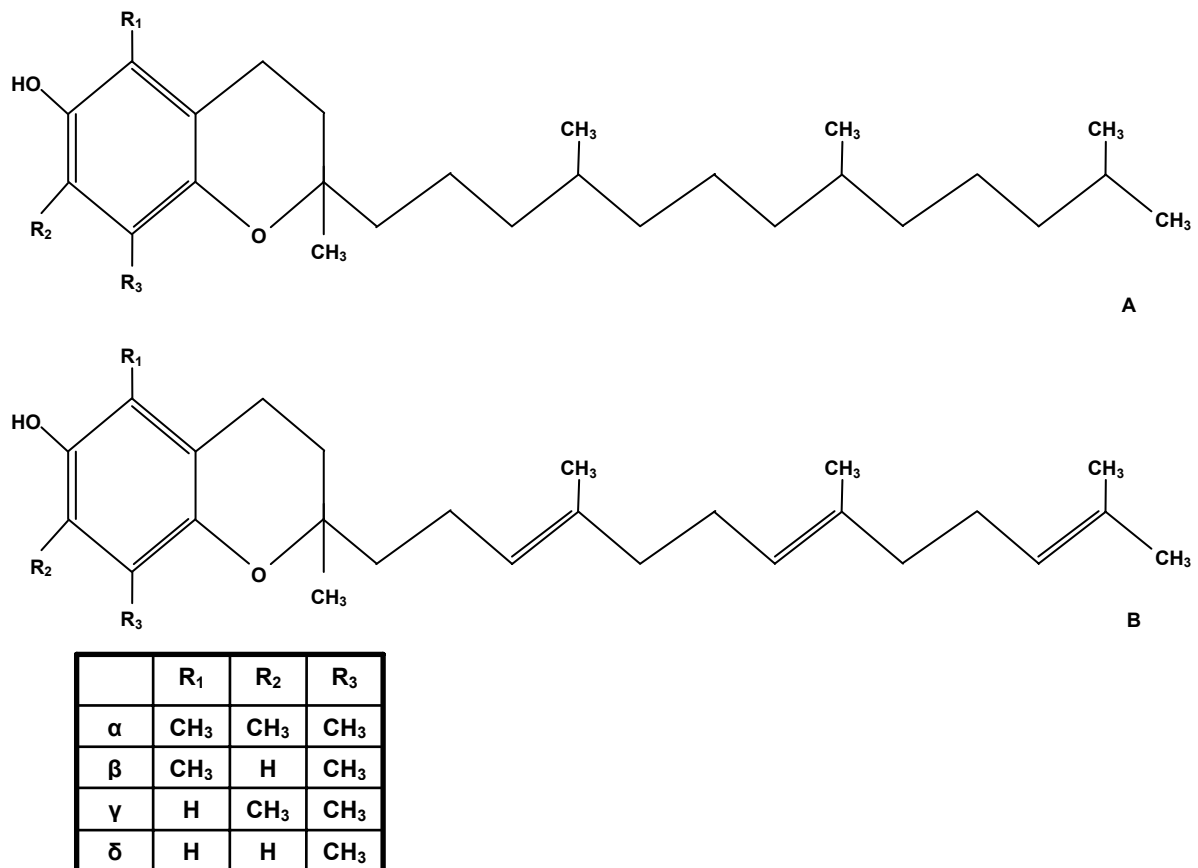
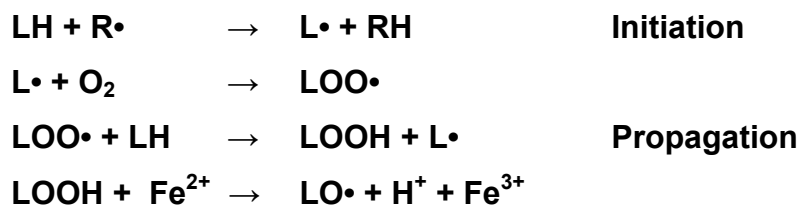


Abbildung 1: Strukturformeln natürlich vorkommender Tocopherole (A) und Tocotrienole (B).

$\alpha$ -Tocopherol schützt die Zellen vor allem durch nichtenzymatische Unterbrechung der Lipidperoxidationskette in Membranphospholipiden vor oxidativer Schädigung. Aus der oxidationslabilen allylischen C-H-Bindung der mehrfach ungesättigten Fettsäuren der Membranen kann in einer Initiationsreaktion mit Radikalen, wie z.B. dem Hydroxylradikal OH•, leicht ein Wasserstoffatom abstrahiert werden, so dass ein Lipidalkylradikal entsteht (siehe Abb. 2). Die Addition von Sauerstoff führt in der Folge zur Bildung eines Lipidperoxyradikals, welches erneut ein Wasserstoffatom von einer benachbarten ungesättigten Fettsäure abspaltet und somit zur Kettenfortpflanzung führt. LOOH (Lipidhydroperoxid) kann in Anwesenheit von Fe<sup>2+</sup> in das reaktive LO• (Lipidalkoxyradikal)

umgewandelt werden. Ein Abbruch der Lipidperoxidation geschieht nur, wenn zwei Radikale miteinander reagieren.  $\alpha$ -Tocopherol ist in der Lage, diese Kettenreaktion zu unterbrechen, indem die Chromanolgruppe des  $\alpha$ -Tocopherol mit Peroxyl- und Alkoxyradikalen reagiert. Das dabei entstandene Tocopheroxyradikal muss anschließend wieder mittels Reduktion in seine aktive Form überführt werden. Als Reduktionsmittel werden hierbei Ascorbinsäure, Glutathion oder auch Ubichinon diskutiert (Munteanu et al., 2003).  $\alpha$ -Tocopherol verhindert zusätzlich sowohl die Schädigung anderer oxidationsempfindlicher Zellbestandteile als auch der Lipoproteine durch ROS (Munteanu et al., 2003).

Neben den erwähnten antioxidativen Wirkungen scheint  $\alpha$ -Tocopherol in hohen Dosen selbst auch einen prooxidativen Effekt zu haben, wenn es nicht in ausreichender Menge reduziert werden kann (Rietjens et al., 2002).  $\alpha$ -Tocopherol beeinflusst darüber hinaus die intrazelluläre Signaltransduktion und die Regulation der Genexpression. So hemmt es beispielsweise die Proteinkinase C (Brigelius-Flohé et al., 2002) und ist beteiligt an der Regulation der Genexpression von Scavenger-Rezeptoren CD36 und SR-A, Collagenase und verschiedenen Integrinen (Munteanu et al., 2003; Brigelius-Flohé et al., 2002).



**Abbildung 2: Lipidperoxidation.**

LH: Ungesättigte Fettsäure;  $R\cdot$ : Radikal;  $L\cdot$ : Lipidalkylradikal;  $LOO\cdot$ : Lipidperoxyradikal;  $LOOH$ : Lipidhydroperoxid;  $LO\cdot$ : Lipidalkoxyradikal

Wenn  $\alpha$ -Tocopherol in der oben beschriebenen Weise antioxidativ wirkt, sollten Zellen durch  $\alpha$ -Tocopherol vor dem Angriff durch Peroxide geschützt werden, d.h. mit zunehmender Konzentration von  $\alpha$ -Tocopherol resistenter gegen die zytotoxische Wirkung von Peroxiden werden. Entsprechende Untersuchungen mit kultivierten Zellen in vitro ergaben jedoch unterschiedliche und zum Teil widersprüchliche Ergebnisse. Wenn die Zellen beispielsweise gleichzeitig mit Peroxiden und  $\alpha$ -Tocopherol behandelt wurden, zeigten sich keine oder nur



sehr geringe zytoprotektive Effekte (Suttorp et al., 1986; Block, 1991; Kuzuya et al., 1991; Cutaia und Parks, 1994). Wurden die Zellen mit  $\alpha$ -Tocopherol inkubiert, bevor sie Peroxiden ausgesetzt wurden, wurden deutliche (Block, 1991; Kuzuya et al., 1991), geringfügige (Schweda, 2004) bzw. ebenfalls keine (Cutaia und Parks, 1994; Leist et al., 1996; Ram und Hiebert, 2004; Schweda, 2004) zytoprotektiven Wirkungen von  $\alpha$ -Tocopherol beobachtet.

Die Dauer der Vorinkubation mit  $\alpha$ -Tocopherol und die Natur des Peroxids scheinen eine wichtige Rolle für die Ausprägung der zytoprotektiven Wirkung von  $\alpha$ -Tocopherol zu spielen. Die Abhängigkeit der Zytoprotektion von der Vorinkubationsdauer lässt sich erklären, wenn man davon ausgeht, dass nur das zelluläre, in Lipidmembranen eingelagerte  $\alpha$ -Tocopherol Lipidradikale abfangen und die Lipidperoxidation abrechen kann. In diesem Fall sollte das Ausmaß der Zytoprotektion abhängig von der zellulären  $\alpha$ -Tocopherol-Konzentration sein.

Zur Konzentrationsabhängigkeit der zytoprotektiven Wirkung von  $\alpha$ -Tocopherol in vitro ist bisher wenig bekannt. In der Regel wurde nur eine einzige relativ hohe Konzentration zwischen 10 und 50  $\mu$ M, z. T. auch deutlich höhere (unlösliche) Konzentrationen, eingesetzt (Suttorp et al., 1986; Ram und Hiebert, 2004). Schweda (2004) beobachtete nur eine geringe Abhängigkeit der schützenden Wirkung von der angebotenen  $\alpha$ -Tocopherol-Konzentration (10- 100  $\mu$ M). Inwieweit die zytoprotektive Wirkung von  $\alpha$ -Tocopherol abhängig von dessen intrazellulärer Konzentration ist, wurde bisher nicht untersucht. Ebenfalls ist wenig bekannt über das Verhältnis zwischen extrazellulär angebotener und intrazellulär vorhandener  $\alpha$ -Tocopherol-Konzentration.

Ziel dieser Arbeit war es deshalb, die Bedeutung der Vorinkubation für die zytoprotektive Wirkung von  $\alpha$ -Tocopherol gegen oxidative Schädigung durch Peroxide und deren Abhängigkeit von der extrazellulären und intrazellulären Konzentration von  $\alpha$ -Tocopherol genauer zu untersuchen. Insbesondere sollten folgende Fragen geklärt werden:

- Ist es zur Erfassung dieser zytoprotektiven Wirkung von  $\alpha$ -Tocopherol in vitro notwendig, die untersuchten Zellen vor der Auslösung von oxidativem Stress mit  $\alpha$ -Tocopherol zu behandeln?
- Welche Beziehung besteht zwischen der extrazellulär angebotenen Konzentration und der zytoprotektiven Wirkung von  $\alpha$ -Tocopherol?

- Wie viel  $\alpha$ -Tocopherol enthalten die zur Kultivierung der Zellen verwendeten Kulturmedien, und wie hoch ist der zelluläre Gehalt an  $\alpha$ -Tocopherol unter den gegebenen Kulturbedingungen?
- Ist die zelluläre Konzentration von  $\alpha$ -Tocopherol abhängig von der extrazellulär angebotenen Konzentration und, wenn ja, in welcher Weise? D.h. wie ist der Zeitverlauf der zellulären Anreicherung von  $\alpha$ -Tocopherol und welche Beziehung besteht zwischen der extrazellulär angebotenen und der zellulären Konzentration von  $\alpha$ -Tocopherol bei Gleichgewichtsverteilung?
- Welche Beziehung besteht zwischen der bei Auslösung von oxidativem Stress vorhandenen zellulären Konzentration und der zytoprotektiven Wirkung von  $\alpha$ -Tocopherol?

Diese Versuche wurden mit C6-Rattengliomzellen durchgeführt. Schweda (2004) konnte zeigen, dass das organische Peroxid Cumolhydroperoxid (CHP), aber nicht Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) in C6-Zellen Lipidperoxidation auslösen kann. Aus diesem Grunde wurde CHP verwendet, um oxidativen Stress in C6-Zellen auszulösen. CHP wird in ähnlicher Weise wie  $\text{H}_2\text{O}_2$  in Anwesenheit von Eisen(II)-Ionen in der Fenton-Reaktion in ein Radikal, das Alkoxyradikal umgewandelt (siehe Abb. 3), das ähnlich wie das aus  $\text{H}_2\text{O}_2$  entstehende Hydroxylradikal mit zellulären Makromolekülen reagieren kann (Cohen, 1985). Vermutlich wirkt CHP aufgrund seiner Lipophilie vorwiegend an biologischen Membranen (Vroegop et al., 1995). Konzentrationen von CHP, die in C6-Zellen Lipidperoxidation auslösen, sind auch zytotoxisch (Schweda, 2004). Der  $\text{Fe}^{3+}$ -Chelator Deferoxamin und der wasserlösliche Radikalfänger Dimethylthioharnstoff schützen C6-Zellen sowohl vor der zytotoxischen als auch vor der lipidperoxidierenden Wirkung von CHP (Schweda, 2004). Deshalb wurde zur Erfassung der oxidativen Schädigung von C6-Zellen durch CHP die zytotoxische Wirkung gemessen. Schweda (2004) konnte zeigen, dass C6-Zellen nach kurzer Vorinkubation (zwei Stunden) mit  $\alpha$ -Tocopherol geringfügig resistenter gegen die zytotoxische Wirkung von CHP waren als unbehandelte Zellen.

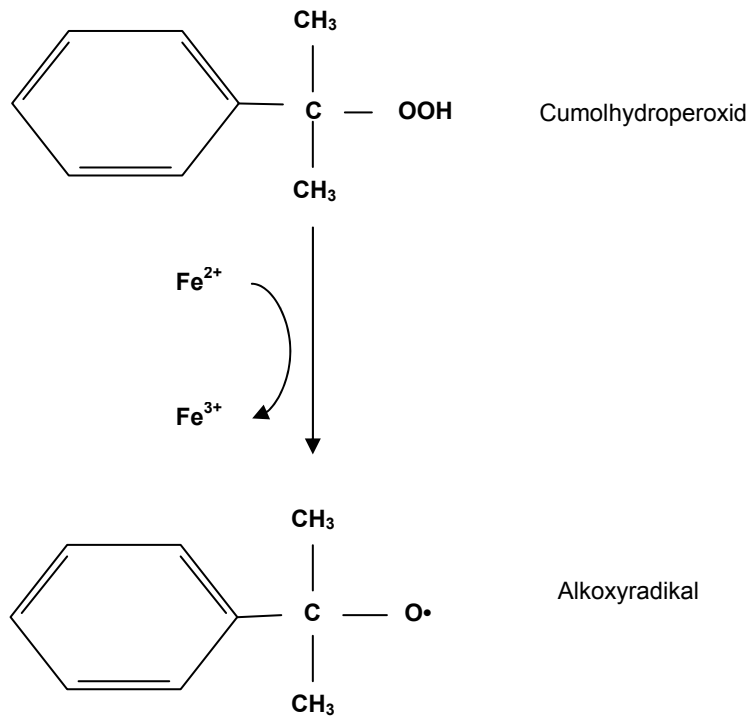


Abbildung 3: Umwandlung von Cumolhydroperoxid in der Fenton-Reaktion in ein Alkoxyradikal.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Zellkultur

#### 2.1.1 C6-Zellen

Bei den in dieser Arbeit verwendeten Zellen handelt es sich um C6-Rattengliomzellen. Diese Zellen stammen aus einem primären Rattenhirntumor und konnten von Bender et al. (1968) etabliert werden. Sie wurden in der 37. Passage von der American Type Culture Collection (ATCC: CCL-107) bezogen, dreimal passagiert und in flüssigem Stickstoff gelagert.

#### 2.1.2 Materialien

- Ham's F 10 Nutrient Mixture [Gibco]
- DMEM (Dulbecco's modified Eagle's Medium)  
mit 4,5 g Glucose/l, mit Pyruvat, mit Phenolrot [c.c.pro: PM-25-S]
- DMEM mit 4,5 g Glucose/l, ohne Pyruvat, mit Phenolrot [c.c.pro: PM-13-S]
- HS (Pferdeserum) [Gibco]
- FBS (Fötales Rinderserum) [Gibco]
- Glutamin (200 mM) [c.c.pro]
- HEPES-Puffersubstanz [Merck]
- Gentamycin (10 mg/ml) [Gibco]
- Fungizone (Amphotericin B 250 µg/ml) [Gibco]
- Trypsin-EDTA-Lösung (10 x) [Gibco]
- 25 cm<sup>2</sup>-Gewebekulturflaschen [Sarstedt]
- 96-Well-Mikrotiterplatten [Falcon]

### 2.1.3 Kulturmedien und Lösungen

Der pH-Wert aller Medien und Lösungen betrug 7,4. Vor dem Gebrauch wurden sie im Wasserbad auf 37° C vorgewärmt.

#### Erhaltungsmedium:

Zur Herstellung des Ham's F 10 Basismediums wurde Ham's F 10 Nutrient Mixture in ultra pure H<sub>2</sub>O gelöst. Anschließend wurde mehr Glutamin (2 mM anstelle von 1 mM) und mehr NaHCO<sub>3</sub> (2 g/l statt 1,2 g/l) hinzugefügt als in der Originalformulierung.

Das Erhaltungsmedium besaß folgende Zusammensetzung:

- Ham's F 10                    81,0 %    (v/v)
- HS                                15,0 %    (v/v)
- FBS                                2,5 %    (v/v)
- Gentamycin                    1,0 %    (v/v)
- Fungizone                      0,5 %    (v/v)

#### PBS-Puffer ( Phosphate buffered saline nach Dulbecco):

PBS-Puffer ohne Magnesium und Calcium besaß folgende Zusammensetzung:

- NaCl [Merck]                    8000 mg/l
- KCl [Merck]                      200 mg/l
- Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> [Merck]                1150 mg/l
- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> [Merck]                200 mg/l

Die Substanzen wurden in ultra pure H<sub>2</sub>O angesetzt. Der Puffer wurde anschließend steril filtriert.

Der PBS-Puffer mit Calcium und Magnesium enthielt zusätzlich zu den oben genannten folgende Substanzen:

- MgCl<sub>2</sub> x 6 H<sub>2</sub>O [Merck]    100 mg/l

- $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$  [Merck] 132 mg/l

#### Versuchsmedien:

Zur Herstellung des DMEM-Basismediums wurde DMEM mit bzw. ohne Pyruvat in ultra pure  $\text{H}_2\text{O}$  gelöst und mit 2 g/l  $\text{NaHCO}_3$  und 4,768 g/l HEPES-Puffersubstanz versetzt und enthielt somit 20 mM HEPES und weniger  $\text{NaHCO}_3$  (2 g/l anstelle von 3,7 g/l) als in der Originalformulierung, um für die Inkubation unter 5 %  $\text{CO}_2$  geeignet zu sein.

Das serumhaltige Versuchsmedium war folgendermaßen zusammengesetzt:

- |                                |              |
|--------------------------------|--------------|
| • DMEM-Basismedium mit Pyruvat | 93,5 % (v/v) |
| • FBS                          | 5,0 % (v/v)  |
| • Gentamycin                   | 1,0 % (v/v)  |
| • Fungizone                    | 0,5 % (v/v)  |

Das serumfreie Versuchsmedium besaß folgende Zusammensetzung:

- |                                 |              |
|---------------------------------|--------------|
| • DMEM-Basismedium ohne Pyruvat | 98,5 % (v/v) |
| • Gentamycin                    | 1,0 % (v/v)  |
| • Fungizone                     | 0,5 % (v/v)  |

## **2.1.4 Kultivierung**

### **2.1.4.1 Erhaltungskulturen**

Für die Versuche wurden die Zellen aufgetaut und in 25  $\text{cm}^2$ -Flaschen als Erhaltungskulturen bei 37° C und 5 %  $\text{CO}_2$  im Begasungsbrutschrank [Heraeus] kultiviert. Diese Erhaltungskulturen erhielten am dritten und am sechsten Kulturtag 7 ml frisches Erhaltungsmilieu und wurden einmal in der Woche passagiert. Die Zellen wurden aus den Kulturflaschen „geerntet“, d.h. zunächst wurde das Erhaltungsmilieu aus den 25  $\text{cm}^2$ -Flaschen abgesaugt und die Zellen mit 5 ml sterilem, im Wasserbad auf 37° C erwärmtem PBS gespült. Das PBS wurde anschließend abgesaugt und durch 5 ml Trypsin-EDTA-Lösung

(1:10 mit PBS verdünnt) ersetzt, welches nach 30 Sekunden erneut abgesaugt wurde. Im Begasungsbrutschrank wurden die Kulturflaschen für mehrere Minuten inkubiert, bis sich der Zellrasen ablöste. Sodann wurden die Zellen mit 5 ml serumhaltigem Versuchsmedium durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren aufgenommen und die so entstandene Zellsuspension in ein Zentrifugenröhrchen auf Eis überführt. Aus dieser Zellsuspension wurden 100 µl entnommen, mit 100 µl Trypanblaulösung ([Sigma], mit PBS verdünnt), welches zur Markierung der toten Zellen dient, verdünnt und mithilfe der Thoma Zählkammer wurde die Zellzahl bestimmt. Neue Erhaltungskulturen erhielten 300 µl Zellsuspension und 7 ml Erhaltungsmedium. Nach dem Auftauen wurden die Zellen über 15 bis 20 Passagen (P 44-60) für die Versuche genutzt.

#### **2.1.4.2 25 cm<sup>2</sup>-Flaschen-Versuchskulturen**

Die Versuche zur Akkumulation von  $\alpha$ -Tocopherol in C6-Zellen wurden in 25 cm<sup>2</sup>-Flaschen durchgeführt. Dazu erhielt jede Kulturflasche bei der Aussaat wie die Erhaltungskulturen 300 µl Zellsuspension in 7 ml Erhaltungsmedium und wurde im Begasungsbrutschrank kultiviert. Am dritten Kulturtag erfolgte ein Mediumwechsel mit 7 ml Erhaltungsmedium. Am sechsten Kulturtag erfolgte ein Mediumwechsel mit serumhaltigem bzw. serumfreiem Versuchsmedium, dem eine bestimmte Menge  $\alpha$ -Tocopherol hinzugefügt worden war. Anschließend wurden die 25 cm<sup>2</sup>-Flaschen-Versuchskulturen im Begasungsbrutschrank inkubiert, bis die Zellen zu den entsprechenden Zeitpunkten geerntet wurden. In einigen Versuchen konnte der Versuchsbeginn dadurch früher erfolgen, dass die 25 cm<sup>2</sup>-Flaschen eine größere Menge, nämlich 600 µl, Zellsuspension in 7 ml Erhaltungsmedium erhielten.

#### **2.1.4.3 Mikrotiterplatten-Versuchskulturen**

Für die Versuche zur zytotoxischen und zytoprotektiven Wirkung in 96-Well-Mikrotiterplatten wurde zur Aussaat von 20 000 Zellen/Well in 200 µl Medium die Zellsuspension mit der entsprechenden Menge an serumhaltigem Medium verdünnt. In den

Mikrotiterplatten wurden nur die inneren Wells (Z) mit Zellen befüllt, während die äußeren Wells (M) ausschließlich Versuchsmedium erhielten (siehe Abb. 4).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	A
B	M	M	Z	Z	Z	Z	Z	Z	Z	Z	M	M	B
C	M	M	Z	Z	Z	Z	Z	Z	Z	Z	M	M	C
D	M	M	Z	Z	Z	Z	Z	Z	Z	Z	M	M	D
E	M	M	Z	Z	Z	Z	Z	Z	Z	Z	M	M	E
F	M	M	Z	Z	Z	Z	Z	Z	Z	Z	M	M	F
G	M	M	Z	Z	Z	Z	Z	Z	Z	Z	M	M	G
H	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	H
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	

Abbildung 4: Einsaatschema in die 96-Well-Mikrotiterplatten.

M= serumhaltiges Versuchsmedium ohne Zellen, Z= serumhaltiges Versuchsmedium mit Zellen.

## 2.2 Messung zytotoxischer und zytoprotektiver Wirkung

### 2.2.1 Testsubstanzen

- Cumolhydroperoxid (CHP) [Aldrich] Luperox CU 90 88 %
- DL- $\alpha$ -Tocopherol [Calbiochem]

$\alpha$ -Tocopherol wurde lichtgeschützt im Kühlschrank aufbewahrt. CHP wurde ebenfalls im Kühlschrank gelagert und konnte direkt im Medium gelöst werden.  $\alpha$ -Tocopherol wurde in Dimethylsulfoxid (DMSO) [Aldrich] gelöst. Um einen konstanten Lösungsmittelanteil von 0,2 % im Medium zu erreichen, wurde jeweils das 500fache der gewünschten Endkonzentration in DMSO angesetzt.



## 2.2.2 Versuchsdurchführung

Die Versuche zur Messung zytotoxischer und zytoprotektiver Wirkung in den 96-Well-Mikrotiterplatten wurden im serum- und pyruvatfreien Medium durchgeführt. Vorangegangene Arbeiten hatten gezeigt, dass der Entzug von Serum wachstumshemmend wirkt (Zielinska et al., 2003). Pyruvat hat selbst eine antioxidative Wirkung (Schweda 2004, Andrae et al., 1985). Der prinzipielle Versuchsaufbau ist in Abbildung 5 schematisch dargestellt.

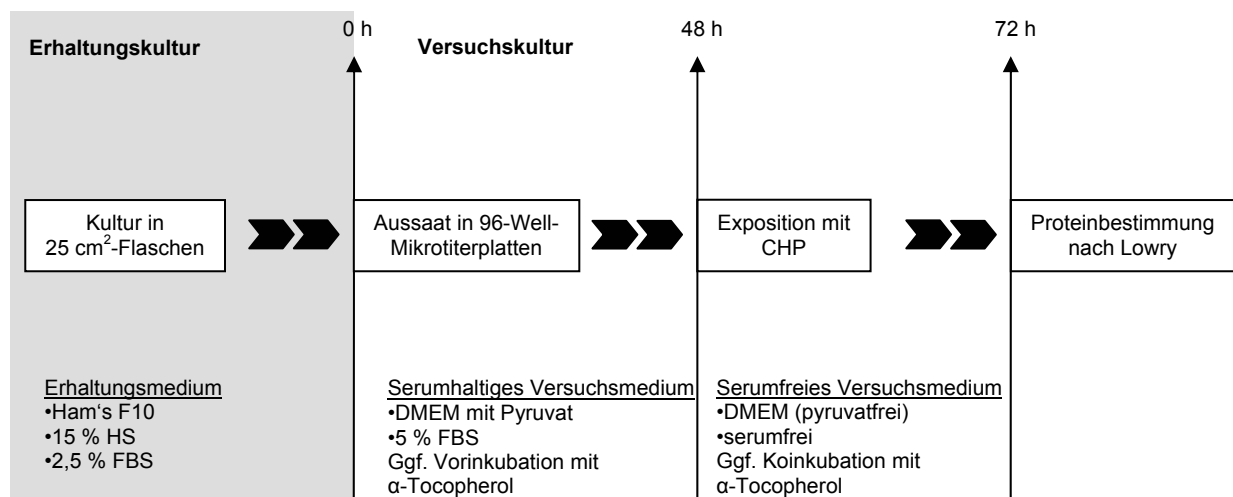


Abbildung 5: Schema des Versuchsaufbaus.

### 2.2.2.1 Zytotoxische Wirkung

Zur Untersuchung der zytotoxischen Wirkung von CHP und  $\alpha$ -Tocopherol erfolgte die Exposition mit den Testsubstanzen 48 Stunden nach der Aussaat. Dazu wurde zunächst das serumhaltige Medium aus den Wells abgesaugt. Sowohl die zellhaltigen als auch die zellfreien Wells wurden zweimal mit serumfreiem Medium gespült, um sicherzustellen, dass kein FBS mehr vorhanden war und um somit ein weiteres Wachstum der Kulturen zu unterbinden. Anschließend wurde 200  $\mu$ l/Well serumfreies Medium mit sechs verschiedenen Konzentrationen (T1- T6) der zu untersuchenden Substanz auf die Zellen gegeben (siehe Abb.

6). Die zwölf Kontrollwells einer Platte erhielten serumfreies Medium (K) ohne die Testsubstanz, aber im Falle von  $\alpha$ -Tocopherol serumfreies Medium mit 0,2 % DMSO. Danach wurden die Mikrotiterplatten wiederum in den Begasungsbrutschrank (5 % CO<sub>2</sub>, 37° C) gegeben und dort für 24 Stunden inkubiert. Die Zytotoxizität wurde als Verlust an Zellprotein in den Kulturen nach 24 Stunden erfasst.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	A
B	M	M	K	T1	T2	T3	K	T4	T5	T6	M	M	B
C	M	M	K	T1	T2	T3	K	T4	T5	T6	M	M	C
D	M	M	K	T1	T2	T3	K	T4	T5	T6	M	M	D
E	M	M	K	T1	T2	T3	K	T4	T5	T6	M	M	E
F	M	M	K	T1	T2	T3	K	T4	T5	T6	M	M	F
G	M	M	K	T1	T2	T3	K	T4	T5	T6	M	M	G
H	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	H
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	

**Abbildung 6: Expositionsschema in 96-Well-Mikrotiterplatten.**

M= zellfreie Wells, die nur Medium enthalten, K= Kontrollen (Zellhaltige Wells mit Medium ohne Testsubstanz), T1-T6: Zellhaltige Wells mit Medium mit verschiedenen Testsubstanzkonzentrationen, wobei T1 die niedrigste und T6 die höchste Konzentration enthält.

### 2.2.2.2 Zytoprotektive Wirkung

Zur Untersuchung der möglichen schützenden Wirkung von  $\alpha$ -Tocopherol vor der zytotoxischen Wirkung von CHP wurden vier Mikrotiterplatten pro Versuch verwendet. Die zytoprotektive Wirkung wurde als Hemmung der zytotoxischen Wirkung von CHP erfasst. Jede Platte wurde, wie unter 2.2.2.1 beschrieben, mit sechs verschiedenen Konzentrationen von CHP behandelt. Eine Platte diente der Untersuchung der zytotoxischen Potenz von CHP ohne Zusatz von  $\alpha$ -Tocopherol. Hier erhielten die Kontrollwells serumfreies Medium ohne CHP. Mit den anderen Mikrotiterplatten-Kulturen wurde der Einfluss von  $\alpha$ -Tocopherol auf

die zytotoxische Potenz von CHP untersucht, indem die Zellkulturen über einen vorgegebenen Zeitraum mit einer bestimmten Konzentration von  $\alpha$ -Tocopherol im serumhaltigen Versuchsmedium vorinkubiert wurden und anschließend in An- oder Abwesenheit von  $\alpha$ -Tocopherol mit CHP inkubiert wurden. Wenn die zytotoxische Wirkung von CHP in Anwesenheit von  $\alpha$ -Tocopherol untersucht wurde, erhielten die Zellen der Kontrollwells serumfreies Versuchsmedium ohne CHP, jedoch mit der entsprechenden Konzentration von  $\alpha$ -Tocopherol. Wenn die zytotoxische Wirkung von CHP in Abwesenheit von  $\alpha$ -Tocopherol untersucht wurde, enthielt das Medium der Kontrollwells weder CHP noch  $\alpha$ -Tocopherol.

### 2.2.3 Proteinbestimmung

Zur Bestimmung der Zellproteinmengen pro Well wurde die für Mikrotiterplatten modifizierte Methode von Lowry et al. (1951) angewendet, bei der Folin-Ciocalteaus-Phenolreagenz, eine Lösung aus Natriummolybdat, -wolframat, Phosphor- und Salzsäure, verwendet wird. Zunächst erfolgt die Biuretreaktion, bei der in Anwesenheit von Kupfersulfat und Peptiden bzw. Proteinen sogenannte Biuretkomplexe zwischen Kupfer-Ionen und Peptidbindungen entstehen. Diese Biuret-Komplexe unterstützen die Reduktion von Molybdat und Wolframat durch Tyrosin und Tryptophan, aber auch durch andere Proteine wie Cystin, Cystein und Histidin, zu verschiedenen Formen mit charakteristischer blauer Farbe. Die Extinktion konnte anschließend photometrisch im Mikrotiterplattenphotometer bei 630 nm gemessen werden.

#### Materialien und Lösungen:

- PBS-Puffer mit Calcium und Magnesium (siehe 2.1.3)
- Biuretlösung:
  - 48 Teile 4 %  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  [Merck]
  - 1 Teil 2 % K-Na-Tartrat [Merck]
  - 1 Teil 1 %  $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$  [Merck]
- Folinreagenz [Merck]: 1:2 verdünnt mit ultra pure  $\text{H}_2\text{O}$
- Rinderserumalbumin (BSA) [Sigma], in 0,5 N NaOH gelöst

Am Ende der 24 Stunden dauernden Exposition mit CHP wurden die Mikrotiterplatten aus dem Begasungsbrutschrank geholt und alle Wells dreimal mit 200 µl PBS mit Calcium und Magnesium (siehe 2.1.3) gründlich gespült, um alle eventuell noch vorhandenen Reste an FBS zu entfernen. Anschließend wurden die zellhaltigen Wells mit je 60 µl NaOH (0,5 N) befüllt und zur Zellsolubilisierung für 45 Minuten auf dem Shaker-Inkubator [Heidolph] bei 37° C geschüttelt. In die äußeren Wells wurden dann 60 µl NaOH als Blindwerte (Bl) bzw. 60 µl der Proteinstandards aus Rinderserumalbumin (St1: 0,4 mg BSA/ml bis St6: 0,025 mg BSA/ml) pipettiert (siehe Abb. 7). In jedes Well wurden nun 150 µl Biuretlösung gegeben und die Mikrotiterplatten für 10 Minuten auf dem Shaker-Inkubator geschüttelt. Zum Schluss wurden jedem Well 60 µl Folinlösung hinzugefügt und die Platten für 20 Minuten auf dem Shaker-Inkubator geschüttelt. Die photometrische Messung der Extinktion erfolgte mit dem Mikrotiterplattenphotometer [BIO-TEK EL<sub>x</sub>800<sub>uv</sub>] bei 630 nm. Eine Eichgerade aus den blindwertbereinigten Extinktionen der Proteinstandards wurde erstellt, so dass die gemessenen Extinktionen der Wells den entsprechenden Proteinmengen zugeordnet werden konnten.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	Bl	St3	M	M	M	M	M	M	M	M	St3	Bl	A
B	Bl	St3	K	T1	T2	T3	K	T4	T5	T6	St3	Bl	B
C	Bl	St4	K	T1	T2	T3	K	T4	T5	T6	St4	Bl	C
D	Bl	St4	K	T1	T2	T3	K	T4	T5	T6	St4	Bl	D
E	St1	St5	K	T1	T2	T3	K	T4	T5	T6	St5	St1	E
F	St1	St5	K	T1	T2	T3	K	T4	T5	T6	St5	St1	F
G	St2	St6	K	T1	T2	T3	K	T4	T5	T6	St6	St2	G
H	St2	St6	M	M	M	M	M	M	M	M	St6	St2	H
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	

**Abbildung 7: Schema zur Proteinbestimmung in 96-Well-Mikrotiterplatten.**

Bl= Blindwerte mit NaOH, St1- St6= Standardwerte mit Rinderserumprotein BSA (0,4 -0,025mg BSA/ml), T1-T6= Testsubstanzen in ansteigenden Konzentrationen, K= Kontrollen, M= Medium

## 2.2.4 Auswertung

Die Zytotoxizität von CHP wurde als Verminderung des Zellproteingehalts der Kulturen erfasst. Als Kontrollwert einer Mikrotiterplatte diente jeweils der Mittelwert des Proteingehalts aus den zwölf unbehandelten Wells. Zur Darstellung der Konzentrations-Wirkungs-Kurven wurde der Mittelwert der jeweiligen Kontrolle gleich 100 % gesetzt und die Mittelwerte aus den sechs Wells pro Konzentration der Testsubstanz in Relation dazu angegeben. Die Konzentration von CHP, die eine Verminderung um 50 % bewirkt, wird als  $EC_{50}$ -Wert bezeichnet und wurde aus dem Kurvenverlauf der auf halblogarithmischem Millimeterpapier aufgezeichneten Konzentrations-Wirkungs-Kurven ermittelt. Die  $EC_{50}$ -Werte wurden als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung angegeben, wenn die Zahl der durchgeführten Versuche  $n \geq 3$  war.

Die Darstellung der Ergebnisse erfolgte mithilfe des Computerprogramms GraphPad Prism 4.

## 2.3 Versuche zur Akkumulation von $\alpha$ -Tocopherol

### 2.3.1 Zeitabhängigkeit der Akkumulation

Zur Untersuchung der Zeitabhängigkeit der  $\alpha$ -Tocopherol-Akkumulation in C6-Zellen wurden 25 cm<sup>2</sup>-Flaschen-Versuchskulturen verwendet. Die Versuchskulturen erhielten zum Versuchsbeginn, d.h. zum Zeitpunkt  $t = 0$ , serumhaltiges oder serumfreies Versuchsmedium mit 10 bzw. 50  $\mu$ M  $\alpha$ -Tocopherol und wurden dann im Begasungsbrutschrank inkubiert. Zu festgelegten Zeitpunkten wurde aus dem Versuchsmedium eine Probe entnommen und die Zellen wurden geerntet. Für jede Konzentration von  $\alpha$ -Tocopherol wurde zu jedem Zeitpunkt eine 25 cm<sup>2</sup>-Flaschenkultur verwendet; lediglich für den Zeitpunkt  $t = 0$ , d.h. zum Zeitpunkt der Zugabe von  $\alpha$ -Tocopherol zum Medium, wurden die Zellen aus mehreren Flaschen geerntet, um eine für die Messung ausreichende Menge an zellulärem  $\alpha$ -Tocopherol extrahieren zu können.

### **2.3.2 Konzentrationsabhängigkeit der Akkumulation**

Zur Untersuchung der Konzentrationsabhängigkeit der  $\alpha$ -Tocopherol-Akkumulation in C6-Zellen wurden 25 cm<sup>2</sup>-Flaschen-Kulturen verwendet. Jeweils eine Flasche wurde mit einer bestimmten Konzentration im Medium über 48 Stunden inkubiert, für 0 und 1  $\mu$ M  $\alpha$ -Tocopherol wurden jeweils mehrere Flaschen verwendet. Sieben  $\alpha$ -Tocopherol-Konzentrationen im serumhaltigen bzw. serumfreien Versuchsmedium wurden untersucht. Bei den Versuchen im serumfreien Medium wurden die Kulturen vor der Exposition mit  $\alpha$ -Tocopherol zweimal mit serumfreiem Medium gespült, um Reste des FBS zu entfernen. Nach der 48stündigen Inkubation im Begasungsbrutschrank wurden die Zellen aus den Kulturflaschen geerntet.

## **2.4 Bestimmung des $\alpha$ -Tocopherol-Gehaltes von Seren, Medien und Zellen**

### **2.4.1 Extraktion**

#### **Extraktion von $\alpha$ -Tocopherol aus den C6-Rattengliomzellen**

Zunächst wurde das Medium aus den 25 cm<sup>2</sup>-Flaschen abgesaugt und der Monolayer mit 5 ml PBS ohne Calcium und Magnesium gespült. Trypsin-EDTA-Lösung (1:10 mit PBS verdünnt) wurde für 30 Sekunden auf die Zellen gegeben und wieder abgesaugt. Anschließend wurden die 25 cm<sup>2</sup>-Flaschen-Versuchskulturen 10 Minuten lang in den Brutbegasungsschrank gestellt, um eine Ablösung des Zellrasens zu erreichen. Zur Herstellung einer Zellsuspension wurden die Zellen dann mehrmals mit 5 ml serumhaltigem Medium auf- und abpipettiert und in ein 50 ml-Zentrifugenröhrchen im Eisbad überführt. Um die Zellen zu waschen, d.h. von Resten des Mediums zu befreien, wurden die Zellsuspensionen mit 2000 rpm bei 4° C für 10 Minuten zentrifugiert [Heraeus Minifuge], der Überstand abgesaugt und der Zellpellet in 20 ml eiskaltem PBS mit Calcium und Magnesium resuspendiert. Dieses Vorgehen wurde noch zweimal wiederholt, allerdings wurden die Zellen nach der letzten Zentrifugation in nur 1 ml PBS resuspendiert und das Zellpellet in ein Zentrifugenglas mit Glasstopfen im Eisbad überführt. Anschließend wurden die Zellen mit Ultraschall bei 50 Watt für 30 Sekunden behandelt. 50  $\mu$ l des Zellhomogenats wurden zum Zwecke der späteren Proteinbestimmung

entnommen, in ein Eppendorfhütchen überführt und im Tiefkühlschrank gelagert. Danach wurde zum übrigen Zellhomogenat 1 ml Ethanol hinzugefügt und dieses für 30 Sekunden mit dem Vortexer geschüttelt. Nachfolgend wurde dem Zellhomogenat 2 ml Iso-Hexan zugegeben, dieses für eine Minute mit dem Vortexer geschüttelt und zur Trennung der Phasen 5 Minuten bei 15° C mit 3500 rpm zentrifugiert. Die obere Iso-Hexanfraktion wurde in ein Zentrifugenglas mit konischem Boden pipettiert. Diese Extraktion wurde noch zweimal wiederholt. Anschließend wurde das Iso-Hexan mit Hilfe des Speedvacs (SPD121P; [Thermo Life Sciences]) getrocknet. Der Extrakt wurde entweder mit Stickstoff begast und im Tiefkühlschrank gelagert, um die HPLC-Messung zu einem späteren Zeitpunkt durchzuführen oder der Extrakt wurde zur sofortigen Messung mit der vorgesehenen Menge an Methanol rekonstituiert und mithilfe des Vortexers gemischt.

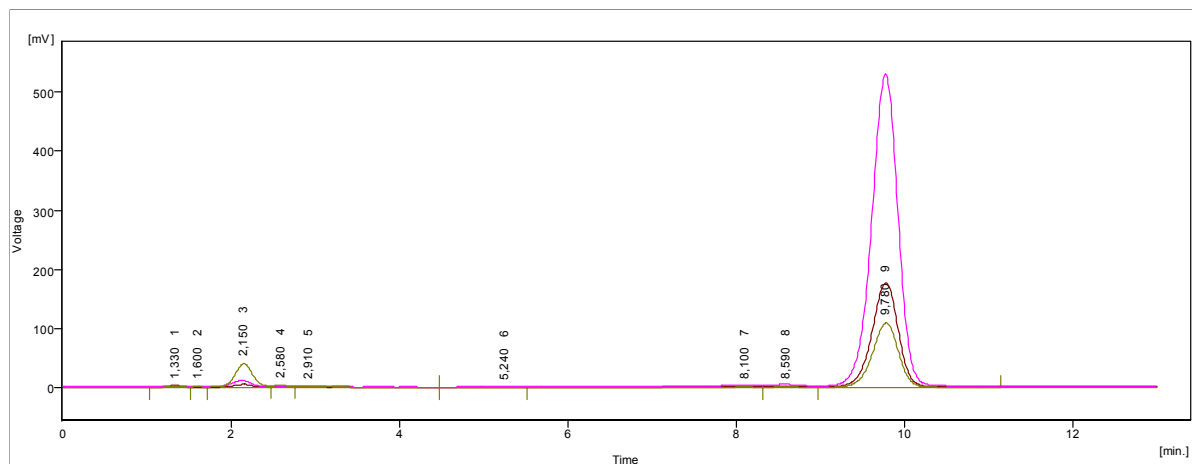
Um den Proteingehalt des Zellhomogenats zu bestimmen, wurde eine Proteinbestimmung in 96-Well-Mikrotiterplatten durchgeführt. Die bei der Extraktion entnommenen und tiefgefrorenen 50 µl des Zellhomogenats einer Probe wurde mit einer adäquaten Menge an NaOH (0,5 N) verdünnt, um innerhalb des Konzentrationsbereichs der Proteinstandards zu bleiben. Es wurden jeweils drei Wells mit dem verdünnten Zellhomogenat einer Probe befüllt. Anschließend erfolgte, wie unter 2.2.3 beschrieben, die Proteinbestimmung nach Lowry. Aus den Messwerten der drei Wells einer Probe wurde der Mittelwert gebildet. Nachfolgend konnte aus diesen Mittelwerten in µg/Well unter Berücksichtigung der Verdünnung mit NaOH der Proteingehalt der 950 µl des Zellhomogenats, aus welchem  $\alpha$ -Tocopherol extrahiert wurde, berechnet werden. Die extrahierte  $\alpha$ -Tocopherol-Menge wurde dann auf den Proteingehalt des Zellhomogenats bezogen.

### **Extraktion von $\alpha$ -Tocopherol aus den Medien und Seren**

Zur Extraktion von  $\alpha$ -Tocopherol aus den verschiedenen Medien bzw. aus dem foetalen Rinderserum sowie dem Pferdeserum wurde 1 ml der zu untersuchenden Substanz mit Ethanol mithilfe des Vortexers gemischt und anschließend wie bei der Extraktion aus den C6-Zellen eine dreimalige Iso-Hexanextraktion durchgeführt.

## 2.4.2 HPLC

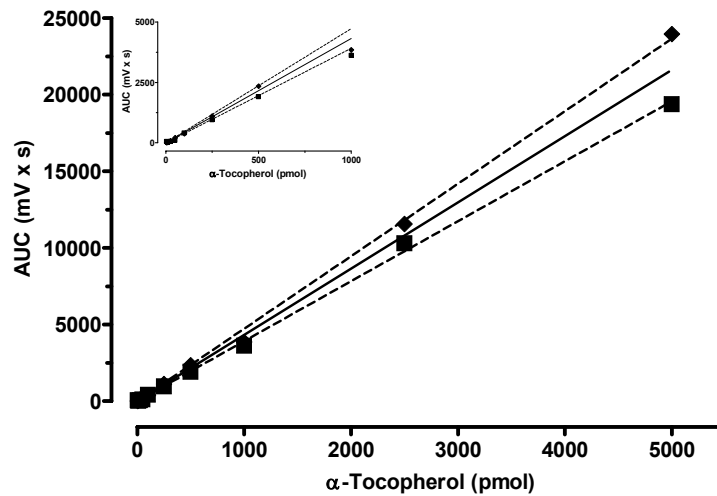
Die Analyse der Extrakte erfolgte mit Hilfe der Reversed-Phase-HPLC. Dazu wurden sie wie unter 2.4.1 beschrieben behandelt, mit 200  $\mu\text{l}$  Methanol resuspendiert, mit dem Vortexer gemischt und gegebenenfalls weiter mit Methanol verdünnt. 50  $\mu\text{l}$  der Extrakte wurden mit einer Pumpe ([Waters] 515 HPLC pump) und einem Probengeber ([Waters] 717 plus Autosampler) injiziert und auf eine C18-Säule ( [Merck], Licospher 100; 4x25 mm; 5 $\mu\text{m}$ ) gegeben mit Methanol als mobiler Phase und einer Flussrate von 1 ml/min.  $\alpha$ -Tocopherol wurde mithilfe eines Fluoreszenzdetektors ([Shimadzu] RF-10 A XL Fluorescence detector; Exzitation 290 nm, Emission 330 nm) bestimmt. Der  $\alpha$ -Tocopherol-Peak erschien mit einer Retentionszeit von 9,56 min (siehe Abb. 8). Die Auswertung erfolgte mithilfe des Computerprogramms Chromatography Station for Windows CSW 32 [Data Apex]. Eine Standardkurve aus den Peakflächen (AUC = Area under the curve) in  $\text{mV} \times \text{s}$  für 5 bis 5000 pmol  $\alpha$ -Tocopherol wurde aus den Mittelwerten zweier unabhängiger Messungen erstellt, so dass die Peakflächen der Extrakte den entsprechenden  $\alpha$ -Tocopherol-Mengen zugeordnet werden konnten (Abb. 9).



**Abbildung 8: Originalchromatogramme für  $\alpha$ -Tocopherol.**

Dargestellt sind die Chromatogramme einer Messung für  $\alpha$ -Tocopherol-Mengen von 500 pmol, 1000 pmol und 2500 pmol.  $\alpha$ -Tocopherol wurde in Methanol gelöst. Peak 9 repräsentiert  $\alpha$ -Tocopherol.





**Abbildung 9: Eichgeraden für  $\alpha$ -Tocopherol.**

Es wurden die Peakflächen (AUC) in mV x s für  $\alpha$ -Tocopherol-Mengen von 5 bis 5000 pmol bei einer Retentionszeit von 9,559 Minuten mithilfe der HPLC ermittelt. Durchgezogene Linie: Regressionsgerade aus den Mittelwerten der durchgeführten zwei Einzelmessungen (gestrichelte Linien). Gleichung der Regressionsgeraden:  $Y = 4,3194 \times X$ .

### 2.4.3 Auswertung

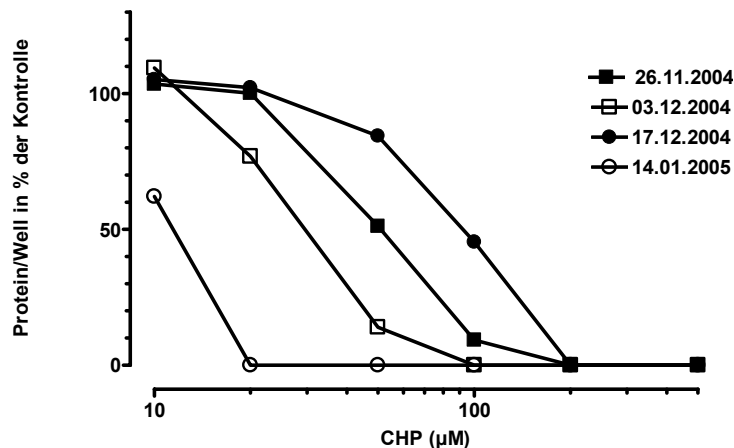
In der Regel wurden zwei bis drei Versuche mit Einfachbestimmung durchgeführt. Die Ergebnisse wurden als Mittelwerte und Standardabweichung (wenn  $n \geq 3$ ) bzw. Spannweite (wenn  $n = 2$ ) dargestellt. Die Darstellung der Ergebnisse erfolgte mithilfe des Computerprogrammes GraphPad Prism 4.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Zytotoxizität von Cumolhydroperoxid und $\alpha$ -Tocopherol

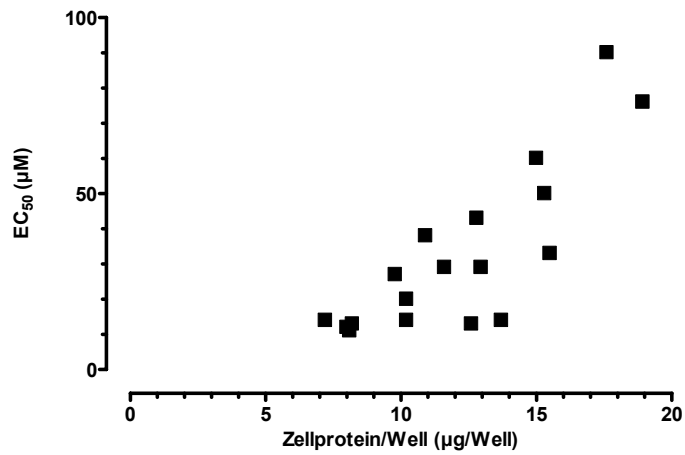
Zur Bestimmung der zytotoxischen Potenz von Cumolhydroperoxid (CHP) wurden in Mikrotiterplatten kultivierte wachstumsgehemmte C6-Zellen in serumfreiem Versuchsmedium über 24 Stunden mit verschiedenen Konzentrationen von CHP inkubiert und darauf folgend die zytotoxische Wirkung als Verlust von Zellprotein im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen gemessen (siehe 2.2.2.1). Zur Charakterisierung der zytotoxischen Potenz wurden aus den Konzentrations-Wirkungs-Kurven (siehe Abb. 10) die halbmaximal effektiven Konzentrationen ( $EC_{50}$ -Werte) ermittelt. Der  $EC_{50}$ -Wert entspricht derjenigen Konzentration von CHP, die eine Reduktion des Zellproteingehaltes auf 50 % der Kontrolle auslöst.

Derartige Versuche wurden über einen Zeitraum von neun Monaten insgesamt 18mal mit unterschiedlichen Passagen von C6-Zellen wiederholt. Abbildung 10 zeigt exemplarisch, dass die Ergebnisse stark variierten. Die  $EC_{50}$ -Werte für CHP variierten zwischen 11 und 90  $\mu$ M.



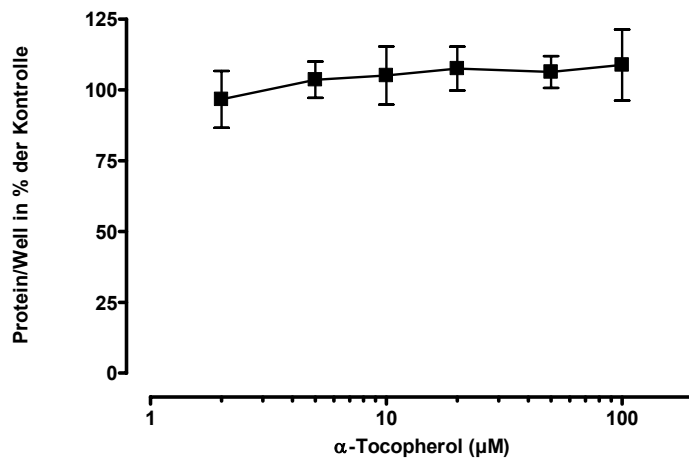
**Abbildung 10: Variabilität der zytotoxischen Wirkung von CHP.**

Beispielhaft sind vier Konzentrations-Wirkungs-Kurven aus Einzelversuchen gezeigt, die die Variabilität der zytotoxischen Wirkung von CHP dokumentieren. Dargestellt sind für jede Konzentration die Mittelwerte des Proteingehaltes aus sechs Wells in % der Kontrolle.



**Abbildung 11: Abhängigkeit der zytotoxischen Potenz von CHP von der Zelldichte.**

Dargestellt sind die EC<sub>50</sub>-Werte aus 18 durchgeführten Versuchen bezogen auf den jeweiligen Zellproteingehalt.



**Abbildung 12: Zytotoxizität von α-Tocopherol für C6-Zellen.**

Die Zellen wurden über 24 Stunden in serumfreiem Medium mit verschiedenen Konzentrationen von (■) α-Tocopherol inkubiert. Dargestellt sind für jede Konzentration die Mittelwerte ± SD des Proteingehalts aus sechs Wells aus einem durchgeführten Versuch.

Eine Ursache für die Unterschiede in der zytotoxischen Potenz ist offensichtlich in der unterschiedlichen Zelldichte der C6-Kulturen zu Beginn der Exposition mit CHP zu finden. Die Zelldichte (Zellzahl/Well) ist proportional der Zellproteinmenge pro Well. Diese variierte zwischen 8 und 18,9  $\mu\text{g}/\text{Well}$ . Abbildung 11 zeigt eine deutliche Abhängigkeit der  $\text{EC}_{50}$ -Werte für die zytotoxische Wirkung von CHP von der Zellproteinmenge.

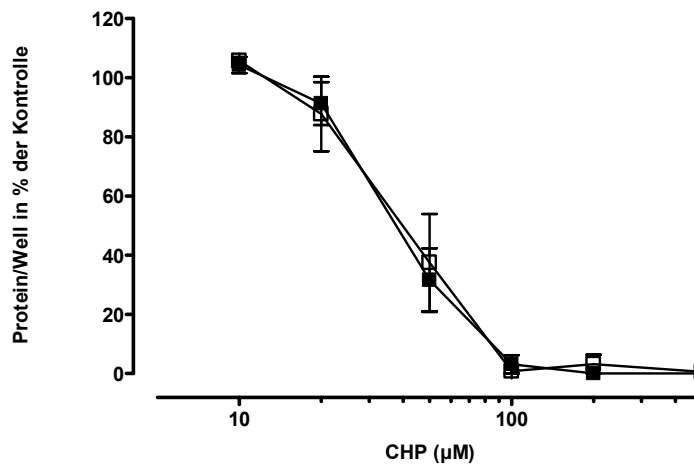
Vor der Untersuchung der zytoprotektiven Wirkung von  $\alpha$ -Tocopherol wurde ein Versuch zur Zytotoxizität von  $\alpha$ -Tocopherol durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass  $\alpha$ -Tocopherol über einen Zeitraum von 24 Stunden bis zur Grenze der Löslichkeit bei 50 bis 100  $\mu\text{M}$  selbst nicht zytotoxisch wirkt (siehe Abb. 12).

### **3.2 Zytoprotektive Wirkung von $\alpha$ -Tocopherol**

Zur Untersuchung der zytoprotektiven Wirkung von  $\alpha$ -Tocopherol wurde der Einfluss von  $\alpha$ -Tocopherol auf die zytotoxische Potenz von CHP gemessen. Es wurde die höchste lösliche Konzentration von 50  $\mu\text{M}$   $\alpha$ -Tocopherol eingesetzt. Ein zytoprotektiver Effekt von  $\alpha$ -Tocopherol sollte sich als Verschiebung der Konzentrations-Wirkungs-Kurve für die zytotoxische Wirkung von CHP zu höheren Konzentrationen zeigen, d.h. als Verringerung der zytotoxischen Potenz von CHP. Wegen der starken Variabilität der zytotoxischen Potenz von CHP von Versuch zu Versuch (siehe 3.1) wurden in diesen vergleichenden Untersuchungen immer parallel unbehandelte und mit  $\alpha$ -Tocopherol behandelte Mikrotiterplattenkulturen untersucht und nur diese miteinander verglichen (siehe 2.2.2.2).

#### **3.2.1 Koinkubation mit $\alpha$ -Tocopherol**

Wie Abbildung 13 zeigt, bewirkte die gleichzeitige Gabe von  $\alpha$ -Tocopherol während der Exposition mit CHP keinen Schutz gegenüber der oxidativen Schädigung des CHP. Die Zellen, die nur während der Exposition mit CHP  $\alpha$ -Tocopherol erhielten, waren gegenüber der oxidativen Schädigung von CHP nicht geschützt ( $\text{EC}_{50}$ -Wert =  $42,67 \pm 16,17 \mu\text{M}$ ) im Vergleich zu den unbehandelten Zellen ( $\text{EC}_{50}$ -Wert =  $39 \pm 10,54 \mu\text{M}$ ) ( $n = 3$ ).



**Abbildung 13: Einfluss der Koinkubation mit  $\alpha$ -Tocopherol auf die zytotoxische Wirkung von CHP.**

Die Zellen wurden über 24 Stunden in serumfreiem Medium mit verschiedenen Konzentrationen von CHP (□) mit bzw. (■) ohne 50  $\mu$ M  $\alpha$ -Tocopherol inkubiert. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM aus drei unabhängigen Versuchen.

### 3.2.2 Vorinkubation mit $\alpha$ -Tocopherol

Mikrotiterplattenkulturen wurden während der Wachstumsphase in den ersten 48 Stunden nach Aussaat mit 50  $\mu$ M  $\alpha$ -Tocopherol in serumhaltigem Versuchsmedium inkubiert (Vorinkubation). Die Konzentrationsabhängigkeit der zytotoxischen Wirkung von CHP wurde darauf folgend in Abwesenheit von  $\alpha$ -Tocopherol in serumfreiem Versuchsmedium gemessen. Abbildung 14 zeigt, dass die Konzentrations-Wirkungs-Kurven für CHP bei den vorinkubierten Zellkulturen nach rechts in Richtung höherer Konzentrationen verschoben wurden. Der mittlere  $EC_{50}$ -Wert bei 48stündiger Vorinkubation mit 50  $\mu$ M  $\alpha$ -Tocopherol betrug  $103,7 \pm 33,47 \mu$ M ( $n = 3$ ) im Vergleich zu den unbehandelten Zellen mit einem mittleren  $EC_{50}$ -Wert von  $39 \pm 10,54 \mu$ M (siehe Tab. 1). Dies bedeutet eine Steigerung des  $EC_{50}$ -Wertes im Mittel um den Faktor 2,6. Somit wurde die zytotoxische Wirkung von CHP durch Vorinkubation mit  $\alpha$ -Tocopherol trotz Abwesenheit von  $\alpha$ -Tocopherol während der CHP-Inkubation vermindert.

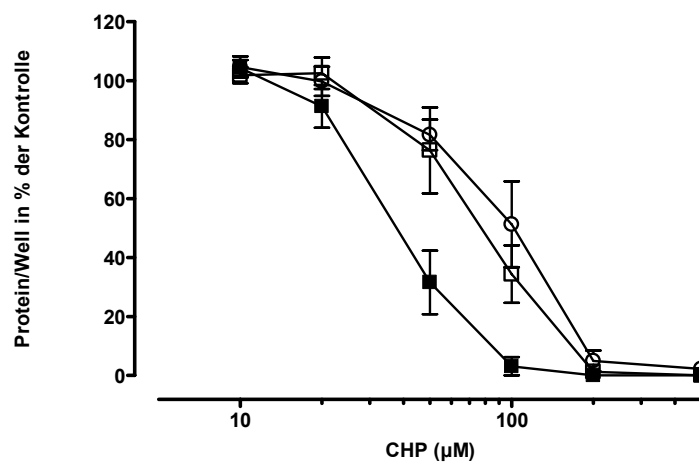
Die zusätzliche Gabe von 50  $\mu$ M  $\alpha$ -Tocopherol gleichzeitig zur Exposition mit CHP bewirkte bei den vorinkubierten Zellen keine zusätzliche Erhöhung des  $EC_{50}$ -Wertes ( $76,33 \pm 25,42 \mu$ M) ( $n = 3$ ) (siehe Abb. 14).

Tabelle 1: Zytoprotektive Wirkung der Vorinkubation über 48 Stunden mit 50  $\mu\text{M}$   $\alpha$ -Tocopherol ( $\alpha$ -Toc).

Versuch	Ohne $\alpha$ -Toc $\text{EC}_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )	Mit $\alpha$ -Toc $\text{EC}_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )	Faktor*
12.11.2004	38	115	3,0
26.11.2004	50	130	2,6
03.12.2004	29	66	2,3
Gesamt**	$39 \pm 10,5$	$103,7 \pm 33,5$	$2,6 \pm 0,4$

\* Faktor der Erhöhung des  $\text{EC}_{50}$ -Wertes im Vergleich zur Kontrolle

\*\* Mittelwert  $\pm$  SD (n = 3)

Abbildung 14: Einfluss der Vorinkubation mit  $\alpha$ -Tocopherol auf die zytotoxische Wirkung von CHP.

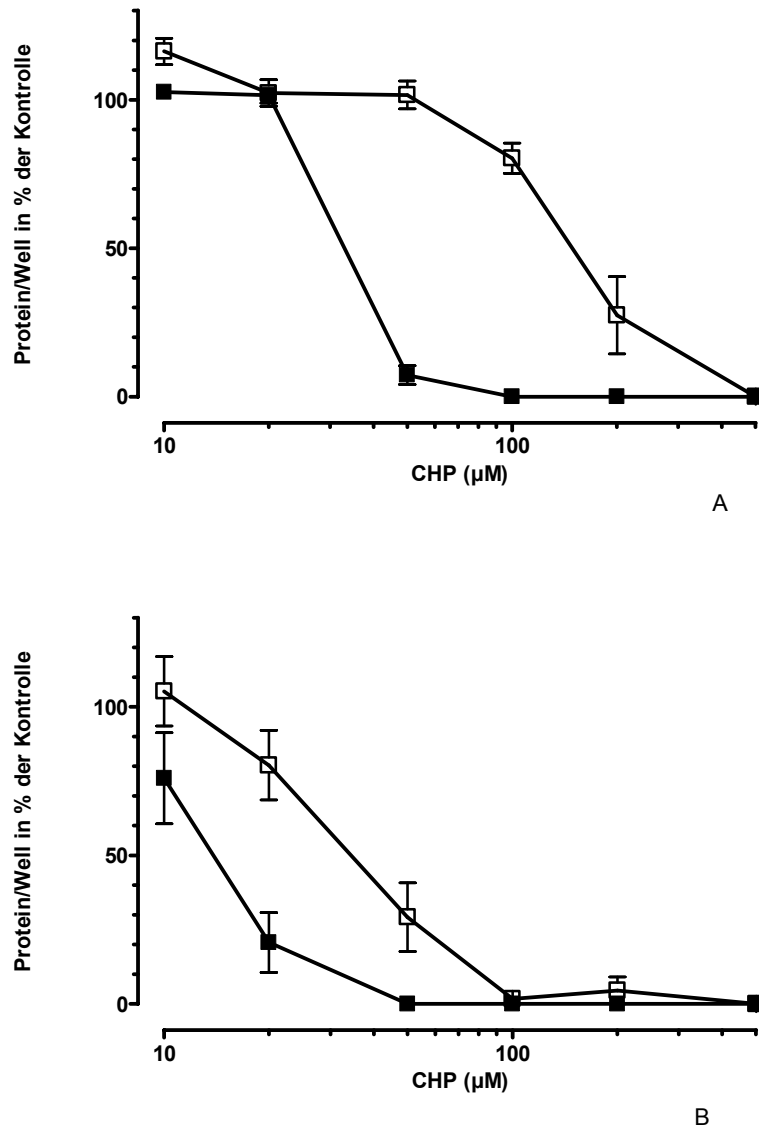
Die Zellen wurden über 48 Stunden in serumhaltigem Medium mit 50  $\mu\text{M}$   $\alpha$ -Tocopherol kultiviert und anschließend in serumfreiem Medium mit verschiedenen Konzentrationen von CHP mit ( $\square$ ) bzw. ohne ( $\circ$ ) 50  $\mu\text{M}$   $\alpha$ -Tocopherol inkubiert. Die Kontrolle ( $\blacksquare$ ) wurde nur mit CHP behandelt. Es sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM aus drei unabhängigen Versuchen dargestellt.

### 3.2.3 Supplementierung der Wachstumsmedien mit $\alpha$ -Tocopherol

C6-Zellen wurden über mehrere Wochen in Erhaltungsmedium mit zusätzlich 50  $\mu\text{M}$   $\alpha$ -Tocopherol kultiviert und wöchentlich passagiert. Wöchentlich wurden von diesen und von  $\alpha$ -Tocopherol-freien Erhaltungskulturen Mikrotiterplattenkulturen angelegt und jeweils die zytotoxische Potenz von CHP gemessen. Das serumhaltige Versuchsmedium in den ersten zwei Tagen der Mikrotiterplattenkultur enthielt jeweils die gleiche  $\alpha$ -Tocopherol-Konzentration wie das entsprechende Erhaltungsmedium.

Nach insgesamt neun Tagen Kultur in 50  $\mu\text{M}$   $\alpha$ -Tocopherol zeigten die vorinkubierten C6-Kulturen eine deutliche Verschiebung der Konzentrations-Wirkungs-Kurve nach rechts in Richtung höherer Konzentrationen im Vergleich zu den nicht vorbehandelten Kulturen, wie aus Abbildung 15 A ersichtlich. Der  $\text{EC}_{50}$ -Wert für CHP betrug bei den vorinkubierten Kulturen 150  $\mu\text{M}$  und war somit um den Faktor 4,5 höher als der der unbehandelten Kulturen mit 33  $\mu\text{M}$ .

Abbildung 15 B zeigt, dass nach insgesamt 16 Tagen Kultur in 50  $\mu\text{M}$   $\alpha$ -Tocopherol dieser Effekt deutlich geringer ausgeprägt war. Der  $\text{EC}_{50}$ -Wert der vorinkubierten Kulturen war mit 33  $\mu\text{M}$  nur noch um das 2,5fache höher als der der nicht mit  $\alpha$ -Tocopherol vorinkubierten Kulturen. Hier war zu beobachten, dass mit zunehmender Kulturdauer der C6-Zellen in dem mit  $\alpha$ -Tocopherol supplementierten Wachstumsmedium die Zellproteinmenge in den Mikrotiterplattenkulturen abnahm. Nach neuntägiger Kultur in 50  $\mu\text{M}$   $\alpha$ -Tocopherol wiesen die Kontrollwells im Mittel einen Zellproteingehalt von 13,388  $\mu\text{g}/\text{Well}$  (unbehandelt 15,514  $\mu\text{g}/\text{Well}$ ) auf, während nach 30tägiger Kultur der Zellproteingehalt im Mittel nur noch 4,631  $\mu\text{g}/\text{Well}$  (unbehandelt 15,053  $\mu\text{g}/\text{Well}$ ) betrug. Länger dauernde Kultivierung in Anwesenheit von 50  $\mu\text{M}$   $\alpha$ -Tocopherol war offensichtlich nicht verträglich.



**Abbildung 15: Zytoprotektive Wirkung der Vorinkubation mit  $\alpha$ -Tocopherol gegenüber CHP.**

Die Zellen wurden 7 Tage (A) bzw. 14 Tage (B) in Erhaltungsmedium mit 50  $\mu$ M  $\alpha$ -Tocopherol ( $\square$ ) bzw. ohne zusätzliches  $\alpha$ -Tocopherol ( $\blacksquare$ ) und nach Anlage der Mikrotiterplattenkulturen weitere 2 Tage in serumhaltigem Versuchsmedium mit bzw. ohne  $\alpha$ -Tocopherol kultiviert und anschließend in serumfreiem Versuchsmedium mit CHP für 24 Stunden inkubiert. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM nach neuntägiger (A) bzw. 16tägiger (B) Erhaltungskultur.

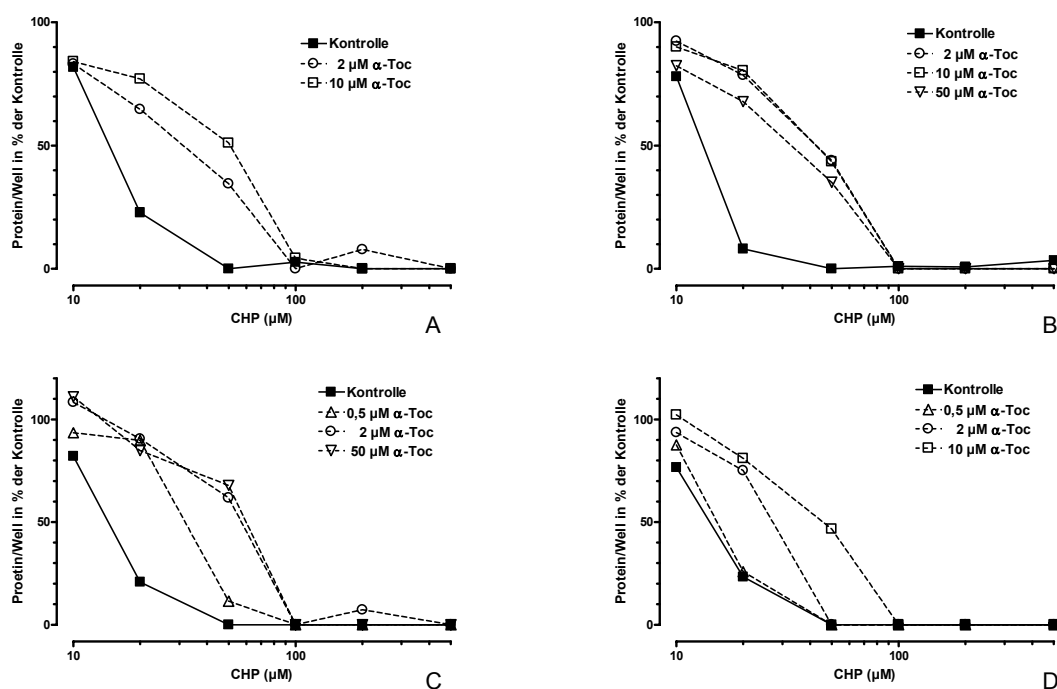


### 3.3 Konzentrationsabhängigkeit der zytoprotektiven Wirkung von $\alpha$ -Tocopherol

Die vorhergehenden Versuche haben gezeigt, dass die Supplementierung des Erhaltungsmediums mit 50  $\mu\text{M}$   $\alpha$ -Tocopherol keinen deutlich stärkeren zytoprotektiven Effekt hat als die Vorinkubation der C6-Zellen über 48 Stunden mit der gleichen  $\alpha$ -Tocopherol-Konzentration. Darüber hinaus scheint die länger dauernde Kultivierung der C6-Zellen in Anwesenheit dieser hohen  $\alpha$ -Tocopherol-Konzentration einen zytotoxischen bzw. proliferationshemmenden Effekt zu haben. Deshalb wurden zur Untersuchung der Konzentrationsabhängigkeit der zytoprotektiven Wirkung von  $\alpha$ -Tocopherol die Mikrotiterplattenkulturen wie unter 3.2.2 beschrieben in den ersten 48 Stunden nach Aussaat mit unterschiedlichen  $\alpha$ -Tocopherol-Konzentrationen in serumhaltigem Versuchsmedium inkubiert und danach, in Abwesenheit von  $\alpha$ -Tocopherol, die Konzentrationsabhängigkeit der zytotoxischen Wirkung von CHP im serumfreien Versuchsmedium für wachstumsgehemmte C6-Zellen bestimmt.

Abbildung 16 und Tabelle 2 dokumentieren die Ergebnisse aller in dieser Weise durchgeführten Versuche. In jedem Fall erwiesen sich bereits 2  $\mu\text{M}$   $\alpha$ -Tocopherol als zytoprotektiv. Nur in zwei der vier Versuche (s. Abb. 16 A, D) bewirkte eine Erhöhung der  $\alpha$ -Tocopherol-Konzentration auf 10  $\mu\text{M}$  bzw. 50  $\mu\text{M}$  auch die Verstärkung der zytoprotektiven Wirkung. Die in einem Versuch beobachtete Zytoprotektion durch 0,5  $\mu\text{M}$   $\alpha$ -Tocopherol ließ sich nicht reproduzieren (s. Abb. 16 C, D).

Die zytoprotektive Wirkung von  $\alpha$ -Tocopherol kann durch den Faktor, um den der  $\text{EC}_{50}$ -Wert für die zytotoxische Wirkung von CHP durch Vorinkubation der C6-Zellen mit  $\alpha$ -Tocopherol verschoben wird, charakterisiert werden. Abbildung 17 und die Tabellen 1 und 2 zeigen, dass 2  $\mu\text{M}$   $\alpha$ -Tocopherol zu einer Erhöhung des  $\text{EC}_{50}$ -Wertes für CHP auf das Zwei- bis Vierfache verglichen mit der Kontrolle führte. Eine Steigerung der  $\alpha$ -Tocopherol-Konzentration auf 10 bzw. 50  $\mu\text{M}$  bewirkte keine wesentliche Steigerung der zytoprotektiven Aktivität.



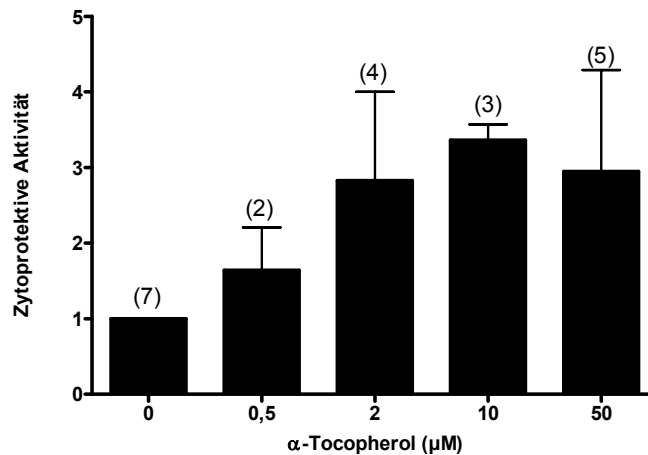
**Abbildung 16: Einfluss der Vorinkubation mit verschiedenen  $\alpha$ -Tocopherol-Konzentrationen ( $\alpha$ -Toc) auf die zytotoxische Wirkung von CHP.**

Dargestellt sind aus vier Einzelversuchen (A-D) für jede Konzentration von CHP die Mittelwerte des Proteingehalts aus sechs Wells in % der Kontrolle.

**Tabelle 2:  $EC_{50}$ -Werte der zytotoxischen Wirkung von CHP nach Vorinkubation mit unterschiedlichen Konzentrationen von  $\alpha$ -Tocopherol ( $\alpha$ -Toc).**

Versuch	Kontrolle		0,5 µM $\alpha$ -Toc		2 µM $\alpha$ -Toc		10 µM $\alpha$ -Toc		50 µM $\alpha$ -Toc	
	$EC_{50}$ (µM)		$EC_{50}$ (µM)	Faktor*	$EC_{50}$ (µM)	Faktor*	$EC_{50}$ (µM)	Faktor*	$EC_{50}$ (µM)	Faktor*
16.06.2005	14				30	2,1	50	3,6		
23.06.2005	13				42	3,2	42	3,2	33	2,5
27.06.2005	14		31	2,2	56	4			59	4,2
01.07.2005	14		15	1,1	28	2,1	47	3,4		

\* Faktor der Erhöhung des  $EC_{50}$ -Wertes im Vergleich zur Kontrolle



**Abbildung 17: Konzentrationsabhängigkeit der zytoprotektiven Aktivität von  $\alpha$ -Tocopherol.**

Die zytoprotektive Aktivität entspricht dem Faktor der Erhöhung des EC50-Wertes im Vergleich zur Kontrolle. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Spannweite, in Klammern die Anzahl (n) unabhängiger Versuche. Daten aus den Tabellen 1 und 2.

### 3.4 $\alpha$ -Tocopherol-Gehalt von Seren und Kulturmedien

Zur Ermittlung der  $\alpha$ -Tocopherol-Konzentrationen in den verwendeten Kulturmedien wurden mittels HPLC (siehe 2.4.1) die Konzentrationen von  $\alpha$ -Tocopherol in den Serumchargen gemessen, mit denen die Kulturmedien supplementiert wurden.

Foetales Rinderserum (FBS), welches sowohl dem Erhaltungskulturmedium als auch dem Versuchsmedium zugegeben wurde, um ein Wachstum der Kulturen zu gewährleisten, enthielt Konzentrationen von  $1,084 \pm 0,303$  nmol  $\alpha$ -Tocopherol/ml ( $n = 3$ ). Im Pferdeserum (HS) waren  $\alpha$ -Tocopherol-Konzentrationen von  $0,737 \pm 0,081$  nmol/ml vorhanden ( $n = 3$ ). Dies bedeutet bei einer Konzentration von 5 % FBS im Versuchskulturmedium eine  $\alpha$ -Tocopherol-Konzentration von 0,054 nmol/ml. Das Erhaltungsmedium enthielt 2,5 % FBS sowie 15 % HS und hatte somit eine  $\alpha$ -Tocopherol-Konzentration von 0,138 nmol/ml.

Die Konzentrationen von  $\alpha$ -Tocopherol in den Seren und Kulturmedien sind in Tabelle 3 zusammenfassend dargestellt.

Tabelle 3:  $\alpha$ -Tocopherol-Gehalte der verwendeten Seren und Medien.

Seren und Medien	$\alpha$ -Tocopherol-Gehalt (nmol/ml)
Foetales Rinderserum (FBS)	1,084 $\pm$ 0,303* (n = 3)
Pferdeserum (HS)	0,737 $\pm$ 0,081* (n = 3)
ErhaltungsmEDIUM (2,5 % FBS + 15 % HS)	0,138**
serumhaltiges Versuchsmedium (5 % FBS)	0,054 **

\* Mittelwerte  $\pm$  SD

\*\* Berechnete Werte

### 3.5 $\alpha$ -Tocopherol-Gehalte von C6-Zellen unter Standardbedingungen

Wie aus Tabelle 4 ersichtlich wird, enthielten die C6-Zellen, die im Erhaltungskulturmedium mit 2,5 % FBS und 15 % HS kultiviert wurden, 0,169  $\pm$  0,062 nmol  $\alpha$ -Tocopherol/mg Zellprotein (n = 4). Nach 48 Stunden im serumhaltigen Versuchsmedium mit 5 % FBS wiesen die Zellen einen  $\alpha$ -Tocopherol-Gehalt von 0,106 nmol/mg Protein (n = 2) auf. Die Kulturen, die über 48 Stunden im serumfreien Versuchsmedium kultiviert wurden, hatten einen  $\alpha$ -Tocopherol-Gehalt von 0,138  $\pm$  0,011 nmol/mg Protein (n = 3).

Tabelle 4:  $\alpha$ -Tocopherol-Gehalt in C6-Zellen, die im Erhaltungskulturmedium bzw. 48 Stunden im serumhaltigen oder serumfreien Versuchsmedium kultiviert wurden.

C6-Zellen kultiviert in	$\alpha$ -Tocopherol (nmol/mg Protein)*	Dauer der Kultur (Stunden)
ErhaltungsmEDIUM (15 % HS, 2,5 % FBS)	0,169 $\pm$ 0,062 (n = 4)	ständig
serumhaltigem Versuchsmedium (5 % FBS)	0,106 (n = 2)	48
serumfreiem Versuchsmedium	0,138 $\pm$ 0,011 (n = 3)	48

\* Mittelwert  $\pm$  SD wenn n  $\geq$  3

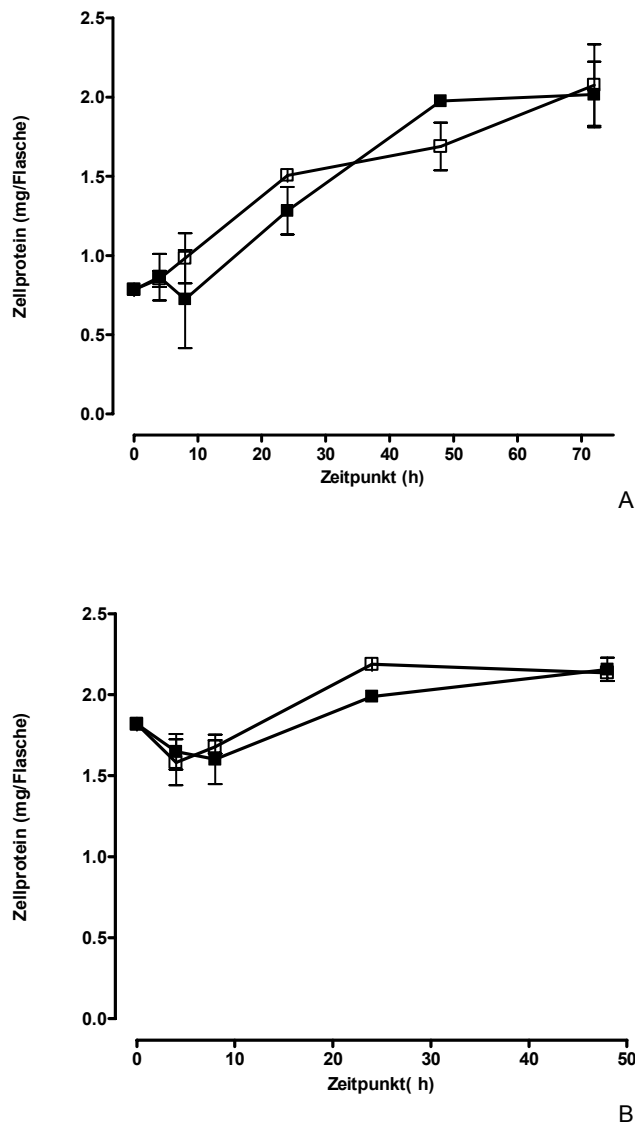
### **3.6 Aufnahme von $\alpha$ -Tocopherol aus dem Kulturmedium und Akkumulation in C6-Zellen**

Die oben beschriebenen Untersuchungen haben gezeigt, dass sowohl der Zeitpunkt der Exposition gegenüber  $\alpha$ -Tocopherol (Vorinkubation oder Koinkubation) als auch die Konzentration von  $\alpha$ -Tocopherol im Kulturmedium von Bedeutung für den Schutz von C6-Zellen vor der zytotoxischen Wirkung von CHP sind. Um die Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit der zytoprotektiven Wirkung von  $\alpha$ -Tocopherol weiter zu klären, wurde die Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit der Aufnahme von  $\alpha$ -Tocopherol aus dem Kulturmedium und der Akkumulation in den C6-Zellen untersucht. Diese Untersuchungen wurden sowohl mit dem für die Vorinkubation verwendeten serumhaltigen Versuchsmedium als auch mit dem für die Koinkubation verwendeten serumfreien Versuchsmedium durchgeführt.

#### **3.6.1 Zeitabhängigkeit**

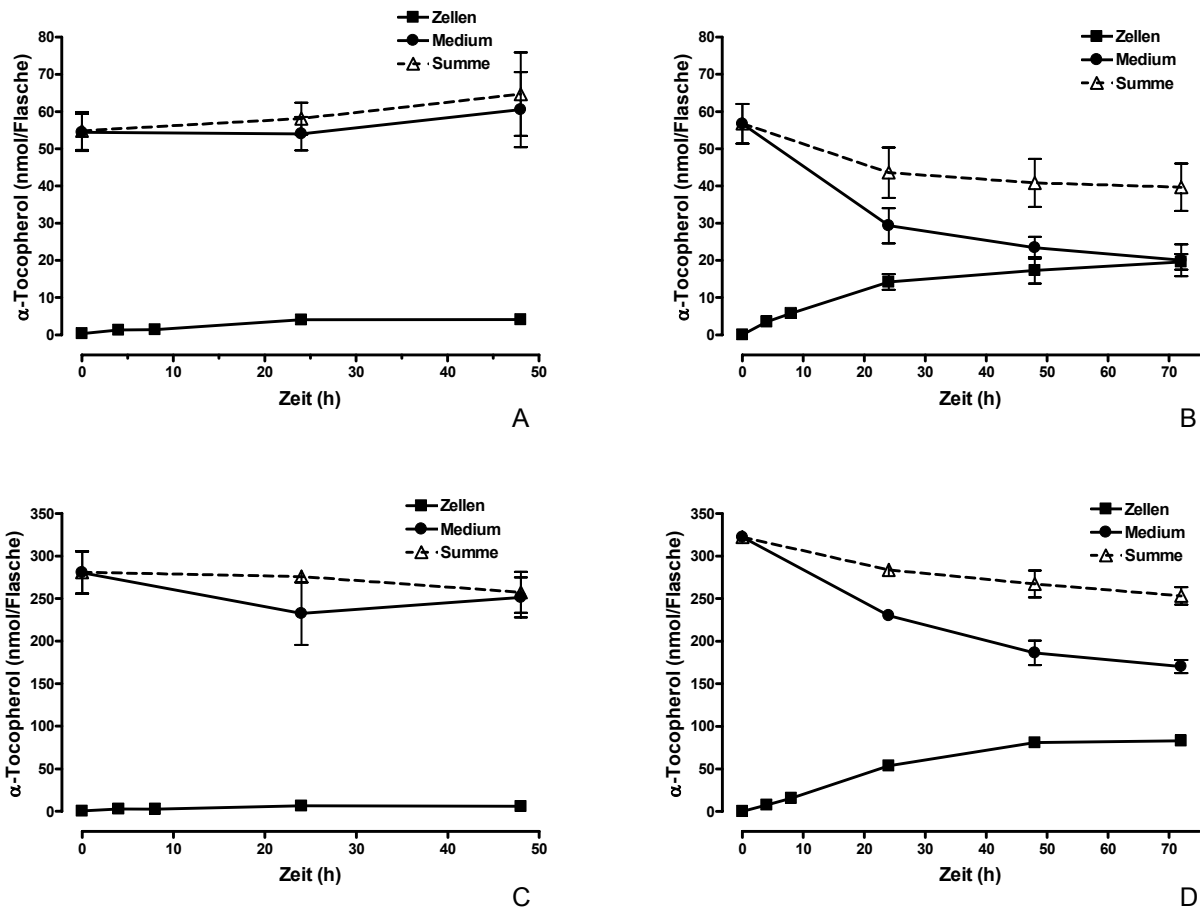
C6-Zellen wurden in serumfreiem und in serumhaltigem Medium mit 10 bzw. 50  $\mu$ M  $\alpha$ -Tocopherol inkubiert. Zu festgelegten Zeitpunkten nach Beginn der Inkubation wurden die  $\alpha$ -Tocopherol-Gehalte von Zellen und Medien mittels HPLC gemessen (siehe 2.3.1). Zellproliferation fand während dieser Inkubation nur in serumhaltigem Medium statt, in serumfreiem Medium blieb die Zellzahl nahezu konstant (siehe Abb. 18).

Abbildung 19 zeigt, dass die proliferierenden C6-Zellen in serumhaltigem Medium wesentlich mehr  $\alpha$ -Tocopherol aus dem Medium aufnahmen als die wachstumsgehemmten C6-Zellen in serumfreiem Medium. In Abwesenheit von Serum war 24 Stunden nach Inkubationsbeginn ein Verteilungsgleichgewicht zwischen Zellen und Medium erreicht, in serumhaltigem Medium erst nach 48 Stunden. Dies liegt offensichtlich daran, dass in serumhaltigem, aber nicht in serumfreiem Medium die Zellzahl weiter zunimmt. Bezieht man die in den Zellen gemessene  $\alpha$ -Tocopherol-Menge auf die Zellproteinmenge, zeigt sich, dass in beiden Fällen die zelluläre Akkumulation nach 24 Stunden nahezu abgeschlossen ist (siehe Abb. 20).



**Abbildung 18: Zellproteingehalt in proliferierenden und wachstumsgehemmten 25 cm<sup>2</sup>-Flaschen-Versuchskulturen.**

Die Kulturen wurden in serumhaltigem (A) bzw. serumfreiem (B) Medium mit (□) 10 bzw. (■) 50 μM α-Tocopherol inkubiert. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Spannweite aus zwei unabhängigen Versuchen. Zu Beginn des Versuches zeigt sich aufgrund der späteren Exposition und damit einer höheren Zelldichte bei den wachstumsgehemmten Kulturen ein höherer Zellproteingehalt als in den proliferierenden Kulturen.



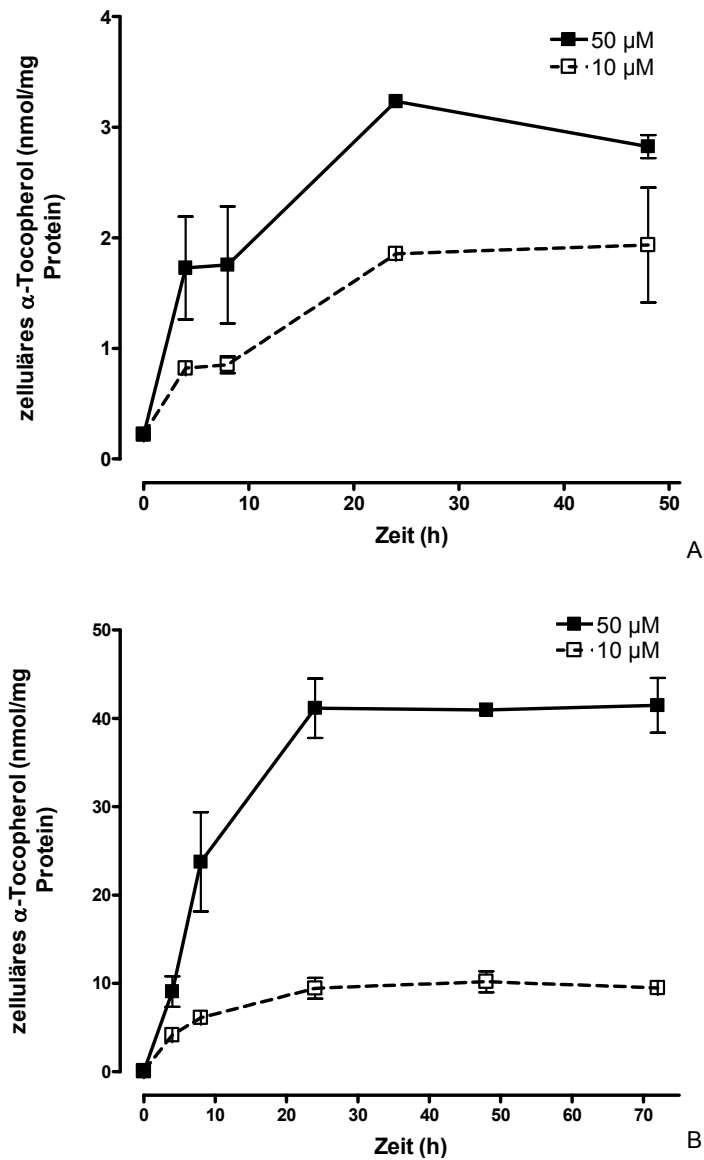
**Abbildung 19: Verteilung von  $\alpha$ -Tocopherol zwischen Medium und Zellen.**

Dargestellt sind die  $\alpha$ -Tocopherol-Gehalte von Kulturmedium (●) und Zellen (■) und deren Summe (△) in nmol/Flasche. Die Zellen wurden mit 10  $\mu$ M  $\alpha$ -Tocopherol (70 nmol/Flasche) (A, B) bzw. 50  $\mu$ M  $\alpha$ -Tocopherol (350 nmol/Flasche) (C, D) in serumfreien (A, C) bzw. serumhaltigen (B, D) Versuchsmedium inkubiert. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Spannweite aus jeweils zwei durchgeführten Versuchen.

Die Zellkulturen erhielten jeweils 7 ml Medium mit nominell 10 bzw. 50  $\mu$ M  $\alpha$ -Tocopherol, d.h. nominell 70 bzw. 350  $\mu$ mol  $\alpha$ -Tocopherol/Flasche. Davon wurden im Medium zwischen 71 und 92 % wieder gefunden (Abb. 19, Messwerte zum Zeitpunkt t = 0). In serumfreiem Medium wurden davon maximal 5,252 nmol = 7,5 % (10  $\mu$ M  $\alpha$ -Tocopherol) bzw. 6,256 nmol = 1,9 % (50  $\mu$ M  $\alpha$ -Tocopherol) in die Zellen aufgenommen, in serumhaltigem Medium maximal 21,697 nmol = 31,0 % (10  $\mu$ M  $\alpha$ -Tocopherol) bzw. 85,351 nmol = 24,4 % (50  $\mu$ M  $\alpha$ -Tocopherol).

Während in serumfreiem Medium der Gesamtgehalt an  $\alpha$ -Tocopherol nahezu konstant blieb, sank er in serumhaltigem Medium parallel zur Aufnahme in die Zellen nach 72 Stunden auf

70 % (10  $\mu\text{M}$ ) bzw. 79 % (50  $\mu\text{M}$ ) des Wertes zum Zeitpunkt  $t = 0$ . Mögliche Ursachen dafür könnten eine geringere Wiederfindungsrate für zelluläres  $\alpha$ -Tocopherol, die Metabolisierung oder die Oxidation von  $\alpha$ -Tocopherol in den Zellen sein.



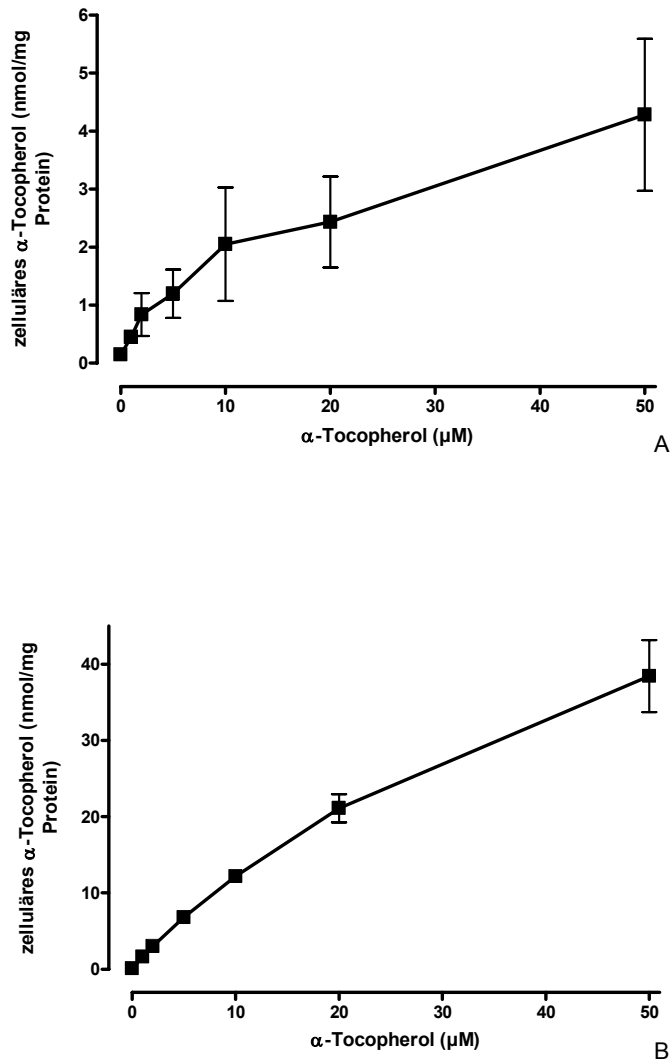
**Abbildung 20: Zeitlicher Verlauf der  $\alpha$ -Tocopherol-Akkumulation in C6-Zellen.**

Die Zellen wurden in serumfreiem (A) oder serumhaltigem (B) Versuchsmedium kultiviert, das 10  $\mu\text{M}$  ( $\square$ ) bzw. 50  $\mu\text{M}$  ( $\blacksquare$ )  $\alpha$ -Tocopherol enthielt. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Spannweite aus jeweils zwei durchgeführten Versuchen.



### 3.6.2 Konzentrationsabhängigkeit

Zur Untersuchung der Konzentrationsabhängigkeit der Akkumulation von  $\alpha$ -Tocopherol in C6-Zellen wurden diese für 48 Stunden in serumfreiem bzw. serumhaltigem Versuchsmedium gegenüber unterschiedlichen Konzentrationen von  $\alpha$ -Tocopherol exponiert und danach der zelluläre Gehalt an  $\alpha$ -Tocopherol gemessen.



**Abbildung 21: Einfluss der  $\alpha$ -Tocopherol-Konzentration im Medium auf die Akkumulation in C6-Zellen.** Die Zellen wurden über 48 Stunden mit verschiedenen Konzentrationen von  $\alpha$ -Tocopherol im serumfreien (A) bzw. serumhaltigen (B) Medium inkubiert. Dargestellt sind die nach dieser Zeit in den C6-Zellen bestimmten  $\alpha$ -Tocopherol-Gehalte in Abb. A als Mittelwerte  $\pm$  Spannweite ( $n = 2$ ) und in Abb. B als Mittelwerte  $\pm$  SEM ( $n = 3$ ).

Abbildung 21 zeigt eine deutliche Abhängigkeit der akkumulierten  $\alpha$ -Tocopherol-Konzentration von der eingesetzten Konzentration im Medium. Zudem wird deutlich, dass in serumfreiem Medium wesentlich geringere Mengen akkumuliert werden als in serumhaltigem Medium. In serumfreiem Medium erhöhte die höchste Konzentration von 50  $\mu\text{M}$   $\alpha$ -Tocopherol den intrazellulären  $\alpha$ -Tocopherol-Gehalt um das 31fache von  $0,138 \pm 0,011$  nmol  $\alpha$ -Tocopherol/mg Protein auf  $4,281 \pm 2,274$  nmol  $\alpha$ -Tocopherol/mg Protein. 1  $\mu\text{M}$   $\alpha$ -Tocopherol im Medium führte zu einer zellulären Konzentration von  $0,451 \pm 0,124$  nmol  $\alpha$ -Tocopherol/mg Protein.

In serumhaltigem Medium bewirkte die höchste eingesetzte Konzentration von 50  $\mu\text{M}$   $\alpha$ -Tocopherol eine Erhöhung um mehr als das 300fache auf 38,44 nmol  $\alpha$ -Tocopherol/mg Protein ( $n = 2$ ) im Vergleich zu den unbehandelten Kulturen mit 0,106 nmol  $\alpha$ -Tocopherol/mg Protein. 1  $\mu\text{M}$   $\alpha$ -Tocopherol im serumhaltigen Medium hatte eine Erhöhung des intrazellulären  $\alpha$ -Tocopherol-Gehaltes auf 1,633 nmol  $\alpha$ -Tocopherol/mg Protein zur Folge.

## 4 Diskussion

### 4.1. $\alpha$ -Tocopherol-Gehalte von Seren und Medien

In den in dieser Arbeit verwendeten Seren und Kulturmedien waren ohne Supplementation von  $\alpha$ -Tocopherol bereits geringe Konzentrationen von  $\alpha$ -Tocopherol vorhanden. Foetales Rinderserum (FBS) und Pferdeserum (HS) enthielten  $1,084 \pm 0,303$  bzw.  $0,737 \pm 0,081$  nmol  $\alpha$ -Tocopherol/ml. Somit wiesen das serumhaltige Versuchsmedium (5 % FBS) bzw. das Erhaltungsmedium (15 % HS, 2,5 % FBS)  $0,054$  bzw.  $0,138$  nmol  $\alpha$ -Tocopherol/ml auf (vgl. 3.4). In der Literatur zeigt sich bezüglich der  $\alpha$ -Tocopherol-Gehalte der in vitro verwendeten Seren eine große Variabilität. So haben beispielsweise Kelley et al. (1995) im foetalen Rinderserum  $\alpha$ -Tocopherol-Gehalte von  $0,448$  nmol/ml gemessen, d.h. im Kulturmedium mit 10 % FBS befanden sich  $45$  nmol/ml  $\alpha$ -Tocopherol. Bei Leist et al. (1996) variierte der  $\alpha$ -Tocopherol-Gehalt in 10 verschiedenen FBS-Proben zwischen  $< 0,01$  nmol/ml bis  $12$  nmol/ml  $\alpha$ -Tocopherol. Dies bedeutet Schwankungen der Konzentration im Medium mit 5 % FBS von  $< 0,0005$  bis  $0,6$  nmol/ml. Patel et al. (1991) fanden im FBS  $150$  ng/ml Serum =  $0,348$  nmol  $\alpha$ -Tocopherol/ml, wodurch das Medium mit 4 % FBS  $0,014$  nmol  $\alpha$ -Tocopherol/ml enthielt. Verglichen mit dem menschlichen Blutplasma, welches nach Angaben aus der Literatur ca.  $25$  nmol/ml  $\alpha$ -Tocopherol enthält (Brigelius-Flohé et al., 2002; Karg et al., 2003), ist der  $\alpha$ -Tocopherol-Gehalt in den verwendeten tierischen Seren und den damit versetzten Kulturmedien um ein Vielfaches geringer. Daraus schließen einige Autoren, dass Zellen in vitro im Vergleich zu Zellen in vivo besonders gefährdet bezüglich oxidativer Schädigung sein müssen (Leist et al., 1996; Kelley et al., 1995; Halliwell et al., 2003).

### 4.2 $\alpha$ -Tocopherol-Gehalte der C6-Zellen unter Standardbedingungen

Weiterhin wurde in dieser Arbeit untersucht, wie hoch der zelluläre  $\alpha$ -Tocopherol-Gehalt unter den gegebenen Kulturbedingungen ist. Die C6-Zellen wiesen ohne Supplementation von  $\alpha$ -Tocopherol  $0,106$  bis  $0,169$  nmol  $\alpha$ -Tocopherol/mg Protein auf (vgl. 3.5).

In der Literatur zeigen sich ähnliche  $\alpha$ -Tocopherol-Gehalte in verschiedenen Zellkulturen, wie Tabelle 5 verdeutlicht. Dabei schwankte der  $\alpha$ -Tocopherol-Gehalt in den einzelnen Untersuchungen zwischen  $0,072$  bis  $0,5164$  nmol  $\alpha$ -Tocopherol/mg Zellprotein bzw.

zwischen 0,03 bis 0,144 nmol  $\alpha$ -Tocopherol/ $10^6$  Zellen, die Größenordnung der gemessenen Werte blieb jedoch gleich.

**Tabelle 5:  $\alpha$ -Tocopherol-Gehalte von kultivierten Zellen.**

Zellkultur	$\alpha$ -Tocopherol		Literatur
	nmol/ $10^6$ Zellen	nmol/mg Protein	
Menschliche Endothelzellen	0,144		Huang et al., 1998
Menschliche Nabelschnurendothelzellen		0,2 $\pm$ 0,1	Kaneko et al., 1991
SRA 01-04 Menschliche Linsenepithelzellen		< 0,020	Chitchumrookai et al., 2004
HAEC-Zellen	0,03		Martin et al., 1996
L1210 Mauslymphozyten-leukämiezellen	0,0534	0,5164	Kelley et al., 1995
L929 Mausfibrosarkomzellen	0,018	0,072	Leist et al., 1996
V79 Chinesische Hamsterlungenzellen	0,016		O'Leary et al., 2001
C6-Rattengliomzellen	0,027-0,042*	0,106-0,169	Diese Arbeit

\* $10^6$  C6-Rattengliomzellen ca. 200  $\mu$ g Zellprotein entsprechend

Es finden sich auch ähnliche Werte bei Untersuchungen in vivo. So konnten z. B. Makar et al. (1994)  $\alpha$ -Tocopherol-Gehalte in Hühnerastrozyten von  $0,213 \pm 0,023$  nmol/mg Protein, in Neuronen  $0,087 \pm 0,009$  nmol  $\alpha$ -Tocopherol/mg Protein sowie im Vorderhirn von Hühnerembryonen  $0,092 \pm 0,007$  nmol  $\alpha$ -Tocopherol/mg Protein messen.

Yokota et al. (2000) haben verschiedene menschliche Gewebe untersucht und dabei im menschlichen Lebergewebe  $\alpha$ -Tocopherol-Gehalte von 0,03 bis 0,162 nmol/mg Protein sowie für zerebelläres Gewebe 0,023 bis 0,042 nmol/mg Protein, im Kortex 0,028 bis 0,074 nmol/mg Protein und in dorsalen Spinalwurzelganglien 0,079 - 0,237 nmol/mg Protein gemessen.

Menschliche Mundschleimhautzellen enthielten 0,232 nmol  $\alpha$ -Tocopherol/mg Protein (Winklhofer-Roob, 2003) und wiesen somit trotz höherer Konzentration im Plasma (siehe 4.1) als die C6-Kulturen nicht wesentlich mehr intrazelluläres  $\alpha$ -Tocopherol auf.

Daraus wird ersichtlich, dass kultivierte Zellen *in vitro* trotz des niedrigeren  $\alpha$ -Tocopherol-Gehaltes der Kulturmedien verglichen mit Zellen *in vivo* keinen Mangel an  $\alpha$ -Tocopherol haben, wie in einigen Arbeiten postuliert wird, wodurch sie anfälliger für oxidativen Stress sein sollen als Zellen *in vivo* (Leist et al., 1996; Kelley et al., 1995; Halliwell et al., 2003).

### **4.3 Akkumulation von $\alpha$ -Tocopherol in C6-Zellen**

Nach Zusatz von  $\alpha$ -Tocopherol zum Kulturmedium erhöhte sich der  $\alpha$ -Tocopherol-Gehalt der C6-Zellen in konzentrations- und zeitabhängiger Weise.

Nach 24 Stunden erreichte der intrazelluläre  $\alpha$ -Tocopherol-Gehalt sein Maximum. Kelley et al. (1995) haben ebenfalls eine Zeitabhängigkeit in der  $\alpha$ -Tocopherol-Aufnahme festgestellt. Hier wurde die Inkubation von L1210 Mauslymphozytenleukämiezellen mit 20- 200  $\mu$ M  $\alpha$ -Tocopherol-Acetat untersucht, wobei der zelluläre  $\alpha$ -Tocopherol-Gehalt nach 24 Stunden ein Plateau erreichte. Patel et al. (1991) untersuchten in Lungenendothelzellen die Inkorporation von  $\alpha$ -Tocopherol in Mitochondrienmembranen, in mikrosomalen Membranen und in Plasmamembranen, welche ebenfalls nach ungefähr 24 Stunden ein Maximum erreichte.

Die maximale zelluläre Konzentration von  $\alpha$ -Tocopherol war abhängig von der  $\alpha$ -Tocopherol-Konzentration des Mediums zu Beginn der Exposition und vom Serumgehalt des Mediums. In Anwesenheit von 5 % FBS nahmen C6-Zellen, bei gleicher  $\alpha$ -Tocopherol-Konzentration, etwa 10mal mehr  $\alpha$ -Tocopherol aus dem Medium auf als in Abwesenheit von Serum. In der Literatur ist diese Beobachtung bisher nicht näher untersucht bzw. beschrieben worden. Hier wurden die Zellkulturen meist nur mit serumhaltigem Medium inkubiert (O'Leary et al., 2001; Kelley et al., 1995; Leist et al., 1996; Martin et al., 1996; Huang et al., 1988)

In serumhaltigem Medium war in dieser Arbeit mit der höchsten löslichen Konzentration von 50  $\mu$ M  $\alpha$ -Tocopherol eine Steigerung des zellulären  $\alpha$ -Tocopherol-Gehaltes auf das bis zu 300fache der Kontrolle möglich. In der Literatur findet sich ebenfalls eine Abhängigkeit der Akkumulation von der angebotenen Konzentration von  $\alpha$ -Tocopherol, wobei jedoch das Ausmaß der Erhöhung des intrazellulären  $\alpha$ -Tocopherol-Gehaltes variierte:

Kelley et al. (1995) inkubierten L1210 Mauslymphozytenleukämiezellen mit 20 -200  $\mu$ M  $\alpha$ -Tocopherol-Acetat, wodurch der zelluläre  $\alpha$ -Tocopherol-Gehalt nur um das 4fache gesteigert werden konnte.

Bei O'Leary et al. (2001) erhöhte die Vorinkubation von V79 (Chinesische Hamsterlungenzellen) mit 10  $\mu\text{M}$   $\alpha$ -Tocopherol über 24 Stunden den zellulären  $\alpha$ -Tocopherol-Gehalt um das 10fache.

Huang et al. (1988) erreichten eine Erhöhung des  $\alpha$ -Tocopherol-Gehaltes um das 15- bis 30fache in primär kultivierten Endothelzellen aus menschlichen Nabelschnurvenen (2.-3. Subkultur) durch Inkubation mit 1- 2 mM  $\alpha$ -Tocopherol während des Wachstums bis zur Konfluenz.

Kaneko et al. (1991) konnten eine konzentrationsabhängige zelluläre Akkumulation von  $\alpha$ -Tocopherol (bis zu 50  $\mu\text{M}$  im Kulturmedium) auf mehr als das 80fache im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen beobachten.

Bei Martin et al. (1996) bewirkte die Vorinkubation von HAEC-Zellen (Menschliche Aortenendothelzellen) mit 15, 30 oder 60  $\mu\text{M}$   $\alpha$ -Tocopherol im Kulturmedium 22 Stunden eine konzentrationsabhängige Steigerung des intrazellulären  $\alpha$ -Tocopherol-Gehaltes auf das bis zu 100fache.

Die Inkubation von Mausfibrosarkomzellen L929 über drei bis vier Tage während der exponentiellen Wachstumsphase mit 30  $\mu\text{M}$   $\alpha$ -Tocopherol erhöhte den zellulären  $\alpha$ -Tocopherol-Gehalt um mehr als das 100fache (Leist et al., 1996).

In vitro ist es somit leicht möglich, den intrazellulären  $\alpha$ -Tocopherol-Gehalt um mehr als das 100fache zu erhöhen.

In vivo hingegen ist die  $\alpha$ -Tocopherol-Aufnahme begrenzt. Die  $\alpha$ -Tocopherol-Konzentration des menschlichen Blutplasmas von ca. 25  $\mu\text{M}$  kann lediglich um das Zwei- bis Dreifache erhöht werden, unabhängig von der angebotenen Menge an  $\alpha$ -Tocopherol oder der Dauer der Zugabe. Es bestehen zudem beim Menschen große interindividuelle Unterschiede in der  $\alpha$ -Tocopherol-Aufnahme (vgl. Munteanu et al., 2004).

In Fütterungsversuchen konnten die starken Erhöhungen in vitro ebenfalls nicht gemessen werden. So beobachteten beispielsweise Gavazza et al. (2001) nur Steigerungen des  $\alpha$ -Tocopherol-Gehaltes in der Rattenleber um den Faktor 17, in Rattenhoden lediglich um den Faktor 1,7.

Als mögliche Ursache dieser Unterschiede in vivo und in vitro kommt eine gewebespezifische Aufnahmekapazität von  $\alpha$ -Tocopherol in Frage. Das stark lipophile  $\alpha$ -Tocopherol ist bei der Aufnahme in die Zellen abhängig von Membranproteinen, wie z.B. das  $\alpha$ -Tocopherol-Transferprotein ( $\alpha$ -TTP), welches vor allem in der Leber, aber auch im Gehirn, der Retina,

Lymphozyten, Fibroblasten und der Plazenta vorkommt. Jedoch müssen auch unspezifische Transporter vorhanden sein, da  $\alpha$ -TTP nicht ubiquitär im Körper vorhanden ist (Munteanu et al., 2004).

Zudem können eine variable  $\alpha$ -TTP-Aktivität, die metabolische Rate, der Lipidgehalt, andere Stoffen in der Nahrung, die  $\alpha$ -Tocopherole recyceln sowie weitere Umweltfaktoren die Aufnahme in vivo im Vergleich zu in vitro Untersuchungen beeinflussen (vgl. Brigelius-Flohé et al., 2002).

#### 4.4 Zytoprotektion

In dieser Arbeit zeigte sich, dass  $\alpha$ -Tocopherol bei gleichzeitiger Gabe mit CHP keinen schützenden Effekt gegenüber der zytotoxischen Wirkung des Peroxids auf C6-Zellen hatte (vgl. 3.2.1). Andere Untersuchungen stimmen mit diesen Ergebnissen überein. Bei Schweda (2004) wurde bei Koinkubation mit  $\alpha$ -Tocopherol nur eine geringfügige schützende Wirkung beobachtet. Suttorp et al. (1986) konnten feststellen, dass die Koinkubation mit  $\alpha$ -Tocopherol und  $H_2O_2$ -generierender Glucose-Glucoseoxidase die Zytotoxizität nur geringfügig vermindert, was mit den Beobachtungen dieser Arbeit in Einklang steht.

Bolt et al. (2001) beobachteten bei der Koinkubation von  $\alpha$ -Tocopherol mit Amiodaron zwar einen schützenden Effekt auf Hamsteralveolarmakrophagen, jedoch nicht bei Clarazellen und Alveolarmakrophagen Typ 2. Hier zeigte sich also ein zellabhängiger Schutz vor der schädigenden Wirkung des Amiodarons.

Um C6-Zellen vor der schädigenden Wirkung von Peroxiden zu schützen, mussten sie mit  $\alpha$ -Tocopherol vorinkubiert werden. Dies deutet darauf hin, dass sich bereits zu Expositionsbeginn mit CHP  $\alpha$ -Tocopherol in den Zellen befinden muss, um schützend wirken zu können.  $\alpha$ -Tocopherol wird nur langsam in die Zellen aufgenommen. Erst nach 24 Stunden erreicht die  $\alpha$ -Tocopherol-Akkumulation ihr Maximum, während CHP rasch aus dem Medium in die Zellen verschwindet (Kussmaul et al., 1999) und die zytotoxische Wirkung bereits innerhalb der ersten Stunden der Exposition einsetzt (Zielinska et al., 2002).

Durch Vorinkubation mit  $\alpha$ -Tocopherol über 48 Stunden war eine Erhöhung des  $EC_{50}$ -Wertes auf das Drei- bis Vierfache im Vergleich zu den Kontrollen möglich, d.h. die Zellen waren drei- bis viermal besser gegen oxidativen Stress geschützt (vgl. 3.2.2). In anderen Untersuchungen finden sich, wenn die Zellen vor der Exposition mit Peroxiden mit  $\alpha$ -

Tocopherol inkubiert wurden, unterschiedliche und z. T. widersprüchliche Ergebnisse bezüglich der schützenden Wirkung von  $\alpha$ -Tocopherol. Beispielsweise konnte Schweda (2004) nur geringe zytoprotektive Wirkungen von  $\alpha$ -Tocopherol beobachten. Hier wurden die Zellen allerdings nur zwei Stunden vorinkubiert, wodurch wahrscheinlich noch keine ausreichende Menge an  $\alpha$ -Tocopherol in die Zellen aufgenommen werden konnte, um vor CHP zu schützen. Kaneko et al. (1991) und Mobio et al. (2000) konnten feststellen, dass die Vorinkubation mit  $\alpha$ -Tocopherol einen schützenden Einfluss auf Zellen hatte, die oxidativer Schädigung ausgesetzt waren. Auch sehr kurze Vorinkubationen sind als wirksam beschrieben worden. So hat z.B. Block (1991) bereits nach einstündiger Vorinkubation von Schweinendothelzellen mit 50  $\mu\text{M}$   $\alpha$ -Tocopherol einen Schutz vor Membranschädigung durch  $\text{H}_2\text{O}_2$  beobachtet. Im Gegensatz dazu konnten Leist et al. (1996) keinen Schutz vor der durch  $\text{H}_2\text{O}_2$  induzierten oxidativen Schädigung in Mausfibrosarkomzellen durch Vorinkubation mit  $\alpha$ -Tocopherol feststellen. Ein Grund könnte dafür sein, dass die schützende Wirkung der Vorinkubation abhängig von der Zellspezies ist, wie von Bolt et al. (2001) beschrieben. Eine weitere mögliche Ursache könnte sein, dass  $\text{H}_2\text{O}_2$  anders als CHP nicht vorrangig Lipidperoxidation auslöst, sondern es unter anderem DNA-Schäden in der Zelle und ATP-Mangel durch die Hemmung von Glykolyse und Atmungskette verursacht (Vroegop et al., 1995; Halliwell, 1996).

Es sollte in der vorliegenden Arbeit zudem untersucht werden, ob und inwieweit die zytoprotektive Wirkung von  $\alpha$ -Tocopherol abhängig von der extrazellulären bzw. intrazellulären  $\alpha$ -Tocopherol-Konzentration ist. Dabei zeigte sich, dass die schützende Wirkung von  $\alpha$ -Tocopherol bereits bei geringen Konzentrationen von 2  $\mu\text{M}$  im Medium zu beobachten war. Durch höhere Konzentrationen von 10 oder 50  $\mu\text{M}$   $\alpha$ -Tocopherol konnte dieser schützende Effekt nicht wesentlich gesteigert werden (vgl. 3.3). Somit war die schützende Wirkung nicht proportional der im Medium vorhandenen Konzentration an  $\alpha$ -Tocopherol, sondern zeigte einen „Sättigungseffekt“. Die zytoprotektive Wirkung ließ sich also durch Steigerung der  $\alpha$ -Tocopherol-Konzentrationen im Medium trotz weiter steigender intrazellulärer  $\alpha$ -Tocopherol-Gehalte nicht erhöhen.

Zellulär ist  $\alpha$ -Tocopherol hauptsächlich in den Mitochondrienmembranen, Mikrosomen und der Plasmamembran lokalisiert (Patel et al., 1991). Man kann deshalb annehmen, dass die Erhöhung des zellulären  $\alpha$ -Tocopherol-Gehaltes mit einer Erhöhung der  $\alpha$ -Tocopherol-Konzentration in den Lipidmembranen einhergeht. Wenn die zytoprotektive Wirkung von  $\alpha$ -



Tocopherol darauf beruht, dass in Lipidmembranen eingelagertes  $\alpha$ -Tocopherol Lipidradikale abfängt und damit die Lipidperoxidation abbricht, sollte die zytoprotektive Wirkung umso höher sein, je höher die  $\alpha$ -Tocopherol-Konzentration in der Lipidmembran ist. Dies war offensichtlich nicht der Fall. Dafür gibt es verschiedene Erklärungsmöglichkeiten:

Bei höheren CHP-Konzentration könnte ein weiterer zytotoxischer Wirkungsmechanismus von CHP zum Tragen kommen. CHP soll zwar, vor allem wegen seiner Lipophilie, vorwiegend auf Lipidmembranen wirken (Vroegop et al., 1995) und kann dort Lipidperoxidation auslösen. Doch eine andere Wirkung, oxidativ oder nicht, beispielsweise im Zytoplasma, an den Zellorganellen oder der DNA würde von  $\alpha$ -Tocopherol nicht gehemmt werden können.

Die Lipidperoxidation wird durch Reaktion des  $\alpha$ -Tocopherols mit Peroxyl- und Alkoxyradikalen in der Lipidmembran abgebrochen. Dabei entsteht ein Tocopheroxylradikal. Durch Reaktion des Tocopheroxylradikals mit anderen in der Zelle vorhandenen Antioxidantien, wie Ascorbinsäure, GSH oder Ubichinon wird  $\alpha$ -Tocopherol regeneriert (Munteanu et al., 2003). Wird das Tocopheroxylradikal durch diese Co-Antioxidantien nicht abgefangen, kann es wahrscheinlich selbst Lipidperoxidation auslösen (Rietjens et al., 2001; Munteanu et al., 2003). Somit kann  $\alpha$ -Tocopherol selbst oxidativ wirken (Bast et al., 2001). Eine mögliche Erklärung für die sättigende zytoprotektive Wirkung von  $\alpha$ -Tocopherol wäre also, wenn durch höhere Konzentrationen von  $\alpha$ -Tocopherol und  $\alpha$ -Tocopherol-Radikalen in Lipidmembranen die Kapazität der Zellen, das  $\alpha$ -Tocopherol-Radikal zu „entgiften“, erschöpft ist und  $\alpha$ -Tocopherol deshalb die durch CHP ausgelöste Lipidperoxidation nicht mehr nachhaltig abbrechen kann.

In zahlreichen Untersuchungen ist gezeigt worden, dass  $\alpha$ -Tocopherol außer seiner direkten antioxidativen Wirkung auch nicht-antioxidative genomische Wirkung haben kann. Von entscheidender Bedeutung für diese genomischen Wirkungen scheint die Hemmung des Proteins C (PKC) und die Bindung an das intrazelluläre  $\alpha$ -Tocopherol-assoziierte Protein (TAP) zu sein. Ferreira et al. (2005) beobachteten nach vorübergehender Behandlung mit geringen Konzentrationen von  $\alpha$ -Tocopherol (1  $\mu$ M) eine nachhaltige lang anhaltende Zytoprotektion von kultivierten Hippocampusneuronen der Ratte vor oxidativem Stress. Aus der Nachhaltigkeit der zytoprotektiven Wirkung von  $\alpha$ -Tocopherol und der Tatsache, dass diese Wirkung durch Hemmung der Proteinsynthese während der  $\alpha$ -Tocopherol-Behandlung verhindert werden konnte, schlossen die Autoren auf einen genomischen Effekt von  $\alpha$ -

Tocopherol. Dies wäre eine weitere Erklärung für die in dieser Arbeit beobachtete nachhaltige sättigbare Wirkung von  $\alpha$ -Tocopherol. Solche genomischen antioxidativen Effekte, möglicherweise vermittelt über sogenannte antioxidative-responsive elements (ARE), die an der Kontrolle der Expression von detoxifizierenden Phase-II-Enzymen und antioxidativen Proteinen beteiligt sind, sind bisher für einige Antioxidantien, z.B. Butylhydrochinon beschrieben worden (Ferreira et al., 2005), aber nicht für  $\alpha$ -Tocopherol.

## 5 Zusammenfassung

ROS (reactive oxygen species) bzw. oxidativer Stress werden mit einer Vielzahl von Erkrankungen, wie beispielsweise der Atherosklerose oder neurodegenerativen Erkrankungen, aber auch mit dem physiologischen Alterungsprozess in Verbindung gebracht. Durch die additive Zugabe von Vitamin E bzw.  $\alpha$ -Tocopherol, eines der bekanntesten Vertreter der Antioxidantien, wird ein schützender Effekt vor den oben genannten Erkrankungen vermutet, doch bisher gibt es sowohl in epidemiologischen Studien als auch in zahlreichen Zellkulturversuchen z. T. widersprüchliche Ergebnisse.

In dieser Arbeit sollte daher geklärt werden, ob und inwieweit sich durch eine Vorbehandlung von kultivierten C6-Rattengliomzellen mit dem als Radikalfänger bekannten  $\alpha$ -Tocopherol eine schützende Wirkung gegenüber einer oxidativen Schädigung durch Cumolhydroperoxid (CHP) erreichen lässt und ob diese schützende Wirkung von der extra- und intrazellulären Konzentration von  $\alpha$ -Tocopherol abhängig ist.

Die zytotoxische Wirkung von CHP wurde als Verlust von Zellprotein gemessen. Die zytoprotektive Wirkung von  $\alpha$ -Tocopherol wurde als Aufhebung der zytotoxischen Wirkung bzw. Verminderung der zytotoxischen Potenz von CHP erfasst. Der  $\alpha$ -Tocopherol-Gehalt in Seren, Medien und Zellen wurde mit Hilfe der HPLC bestimmt.

$\alpha$ -Tocopherol zeigte bei gleichzeitiger Gabe während der Exposition mit CHP keinen Schutz vor der oxidativen Schädigung von CHP. Der  $EC_{50}$ -Wert war gegenüber den Kontrollen mit  $42,67 \pm 16,17 \mu\text{M}$  ( $n = 3$ ) zu  $39 \pm 10,54 \mu\text{M}$  ( $n = 3$ ) nicht erhöht. Eine 48stündige Vorinkubation der C6-Zellen mit  $50 \mu\text{M}$   $\alpha$ -Tocopherol hingegen hatte eine deutliche Erhöhung des  $EC_{50}$ -Wertes auf  $103,7 \pm 33,47 \mu\text{M}$  ( $n = 3$ ) zur Folge. Dies bedeutet eine durchschnittliche Steigerung des  $EC_{50}$ -Wertes um den Faktor 2,6 und somit einen Schutz der Zellen vor der schädigenden Wirkung des CHP. Durch zusätzliche Gabe von  $\alpha$ -Tocopherol während der Exposition mit CHP war keine weitere Erhöhung des  $EC_{50}$ -Wertes zu beobachten.

In den verwendeten Seren, Medien und den Zellkulturen war  $\alpha$ -Tocopherol bereits ohne zusätzliche Gabe vorhanden. Foetales Rinderserum (FBS) enthielt Konzentrationen von  $1,084 \pm 0,303 \text{ nmol/ml}$  ( $n = 3$ ) und Pferdeserum (HS)  $0,737 \pm 0,081 \text{ nmol } \alpha\text{-Tocopherol/ml}$  ( $n = 3$ ). Somit war im serumhaltigen Versuchskulturmedium mit 5 % FBS eine  $\alpha$ -Tocopherol-Konzentration von  $0,054 \text{ nmol/ml}$  sowie im Erhaltungsmedium mit 2,5 % FBS und 15 % HS

0,138 nmol  $\alpha$ -Tocopherol/ml vorhanden. Die Zellkulturen enthielten  $0,169 \pm 0,062$  nmol  $\alpha$ -Tocopherol/mg Zellprotein ( $n = 4$ ), wenn sie im Erhaltungskulturmedium (2,5 % FBS und 15 % HS) kultiviert wurden. In Anwesenheit von 5 % FBS im Versuchsmedium enthielten die Zellkulturen nach 48 Stunden 0,106 nmol  $\alpha$ -Tocopherol/mg Protein ( $n = 2$ ), während sie in Abwesenheit von FBS einen  $\alpha$ -Tocopherol-Gehalt von  $0,138 \pm 0,011$  nmol/mg Protein ( $n = 3$ ) aufwiesen.

Die Anreicherung von  $\alpha$ -Tocopherol in den C6-Zellen zeigte eine Zeitabhängigkeit. Nach 24 Stunden war die Akkumulation in die C6-Zellen nahezu abgeschlossen und der zelluläre  $\alpha$ -Tocopherol-Gehalt erreichte sein Maximum. Überdies war eine deutliche Abhängigkeit der akkumulierten Menge an  $\alpha$ -Tocopherol von der eingesetzten Konzentration im Medium zu beobachten. Eine 48stündige Vorinkubation mit der höchsten löslichen Konzentration von 50  $\mu$ M  $\alpha$ -Tocopherol bewirkte eine Erhöhung des intrazellulären  $\alpha$ -Tocopherol-Gehaltes auf das 31fache (Serumfreies Versuchsmedium) bzw. auf mehr als das 300fache (Serumhaltiges Versuchsmedium).

Die schützende Wirkung von  $\alpha$ -Tocopherol war bereits bei geringen Konzentrationen von 2  $\mu$ M im Medium zu beobachten. Das Ausmaß der zytoprotektiven Wirkung zeigte sich anhand einer Steigerung der  $EC_{50}$ -Werte auf das Zwei- bis Vierfache im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen. Dieser schützende Effekt konnte durch Erhöhung der  $\alpha$ -Tocopherol-Konzentrationen auf 10 bzw. 50  $\mu$ M nicht wesentlich gesteigert werden (vgl. 3.3). Somit war die zytoprotektive Wirkung nicht proportional der im Medium vorhandenen Konzentration an  $\alpha$ -Tocopherol, sondern zeigte im Gegensatz zum konzentrationsabhängigen intrazellulären  $\alpha$ -Tocopherol-Gehalt einen „Sättigungseffekt“. Als mögliche Ursachen dieser Sättigung sind andere schädigende Mechanismen des CHP außer der Lipidperoxidation, das Fehlen von Tocopherolradikale reduzierende Co-Antioxidantien wie GSH und Ubichinon oder andere sättigbare genomische Wirkungen des  $\alpha$ -Tocopherol zu nennen.

Auf der Grundlage dieser Ergebnisse sind weitere Untersuchungen sinnvoll.

## **6 Danksagung**

Ich möchte mich bei Herrn Prof. Dr. Maser für die Bereitstellung des Themas und eines Arbeitsplatzes im Institut bedanken. Ein ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. Gülden für Unterstützung und gute Ratschläge beim Erstellen der Arbeit. Weiter möchte ich Herrn Dr. Seibert für aufmunternde Worte und neue Ideen danken. Frau Sabine Mörchel danke ich für die Hilfe und Unterweisung in die vielfältigen Labortätigkeiten. Dr. Hans-Jörg Martin möchte ich für die lehrreiche Unterweisung im Umgang mit der HPLC danken. Auch allen anderen Mitarbeitern des Instituts danke ich für die nette Aufnahme im Institut. Dank gilt auch meiner Familie für aufbauende Worte und konstruktive Kritik.

## 7 Literaturverzeichnis

BAST, A.; HAENEN, G. R. M. M. (2002): The toxicity of antioxidants and their metabolites. *Environmental Toxicology and Pharmacology* **11**, 251-258

BLOCK, E. R. (1991): Hydrogen peroxide alters the physical state and function of the plasma membrane of pulmonary artery endothelial cells. *Journal of Cellular Physiology* **146**, 362-369

BOLT, M. W.; RACZ, W. J.; BRIEN, J. F.; MASSEY, T. E. (2001): Effects of vitamin E on cytotoxicity of amiodarone and N-desethylamiodarone in isolated hamster lung cells. *Toxicology* **166**, 109-118

BRIGELIUS-FLOHE, R.; KELLY, F. J.; SALONEN, J. T.; NEUZIL, J.; ZINGG, J. M.; AZZI, A. (2002): The European perspective on vitamin E: current knowledge and future research. *American Journal of Clinical Nutrition* **76**, 703-716

CHITCHUMROONCHOKCHAI, C.; BOMSER, J. A.; GLAMM, J. E.; FAILLA, M. L. (2004): Xanthophylls and  $\alpha$ -tocopherol decrease UVB- induced lipid peroxidation and stress signaling in human lens epithelial cells. *Journal of Nutrition* Dec **134(12)**, 3225-3232

CUTAIA, M.; PARKS, N. (1994): Oxidative stress decreases Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiport activity in bovine pulmonary artery endothelial cells. *American Journal of Physiology- Lung Cellular and Molecular Physiology* **267**, L649- L659

COHEN, G. (1985): The Fenton Reaction. In Robert A. Greenwald (Ed.), *CRC Handbook of Methods for Oxygen Radical Research*, CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, pp 55-64

DE JESUS FERREIRA, M. C.; CROUZIN, N.; BARNABEL, G.; COHEN-SOLAL, C.; RECASENS, M.; VIGNES, M.; GUIRAMAND, J. (2005): A transient treatment of hippocampal neurons with  $\alpha$ -tocopherol induces long-lasting protection against oxidative damage via a genomic action. *Free Radical Biology and Medicine* **39**, 1009-1020

HALLIWELL, B.; WHITEMAN, M. (2004): Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *British Journal of Pharmacology* **142**, 231-255

HALLIWELL, B. (1996): Antioxidants in human health and disease. *Annual Review of Nutrition* **16**, 33-50

HALLIWELL, B. (2003): Oxidative stress in cell culture: an under-appreciated problem? *FEBS Letters* **540**, 3-6

HUANG, N.; LINEBERGER, B.; STEINER, M. (1998): Alpha-tocopherol, a potent modulator of endothelial cell function. *Thrombosis Research* **50**, 547-557

KANEKO, T.; NAKANO, S.; MATSUO, M. (1991): Protective effect of vitamin E on linoleic acid hydroperoxide-induced injury to human endothelial cells. *Lipids* **26**, 345-348

KARG, E.; KLIVENYI, P.; BENCSIK, K.; TURI, S.; VECSEI, L. (2003): Alpha-Tocopherol and NADPH in the erythrocytes and plasma of multiple sclerosis patients. *European Neurology* **50**, 215-219

KELLEY, E. E.; BUETTNER, G. R.; BURNS, C. P. (1995): Relative  $\alpha$ -Tocopherol deficiency in cultured cells: Free radical-mediated lipid peroxidation, lipid oxidizability, and cellular polyunsaturated fatty acid content. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **319** (1), 102-109

KUSSMAUL, L.; HAMPRECHT, B.; DRINGEN, R. (1999): The detoxification of cumene hydroperoxide by the glutathione system of cultured astroglial cells hinges on hexose availability for the regeneration of NADPH. *Journal of Neurochemistry* **73**, 1246-1253

LEIST, M.; RAAB, B.; MAURER, S.; RÖSICK, U.; BRIGELIUS-FLOHE (1996): Conventional cell culture media do not adequately supply cells with antioxidants and thus

facilitate peroxide-induced genotoxicity. *Free Radical Biology and Medicine* **21**, ( 3), 297-306

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A.; RANDALL, R. J. (1951): Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* **193**, 265-275

MAKAR, T. P.; NEDERGAARD, M.; PREUSS, A.; GELBARD, A. S.; PERUMAL, A. S.; COOPER, A. J. L. (1994): Vitamin E, ascorbate, glutathione, glutathione disulfide and enzymes of glutathione metabolism in cultures of chick astrocytes and neurons: Evidence that astrocytes play an important role in antioxidative processes in the brain. *Journal of Neurochemistry* **62**, 45-53

MARTIN, A.; WU, D.; BAUR, W.; MEYDANI, S., N.; BLUMBERG, J., B.; MEYDANI, M. (1996) : Effect of vitamin E on human aortic endothelial cell responses to oxidative injury. *Free Radical Biology and Medicine* **21**, 505-511

MILCHAK, L.M.; BRICKER, J.D. (2002): The effects of glutathione and vitamin E on iron toxicity in isolated rat hepatocytes. *Toxicology Letters* **126**, 169-177

MOBIO, T. A.; BAUDRIMONT, I.; SANNI, A.; SHIER, T. W.; SABOUREAU, D.; DANO, S. D.; UENO, Y.; STEYN, P. S.; CREPPY, E. E. (2000): Prevention by vitamin E of DNA fragmentation and apoptosis induced by fuminosin B<sub>1</sub> in C6 glioma cells. *Archives of Toxicology* **74**, 112-119

MUNTEANU, A.; ZINGG, J. M.; AZZI, A. (2004): Anti-atherosclerotic effects of vitamin E-myth or reality? *Journal of Cellular and Molecular Medicine* **8**, 59-76

O'LEARY, K. A.; O'BRIEN, N. M.; WOODS, J. A.(2001):  $\gamma$ -Tocopherol is less effective at preventing oxidant-induced sister chromatide exchange in chinese hamster V79 cells. *Free Radical Research* **35**, 917-924



PATEL, J. M.; SEKHARAM, M.; BLOCK, E. R. (1991): Vitamin E distribution and modulation of the physical state and function of pulmonary endothelial cell membranes. *Experimental Lung Research* **17**, 707-723

RAM, J. I.; HIEBERT, L. M. (2004): Vitamin E protects porcine but not bovine cultured aortic endothelial cells from oxygen-derived free radical injury due to hydrogen peroxide. *Cell Biology and Toxicology* **20**, 55-67

RICART, K. C.; FISZMAN, M. L. (2001): Hydrogen peroxide-induced neurotoxicity in cultured cortical cells grown in serum-free and serum-containing media. *Neurochemical Research* **26** (7), 801-808

RICE-EVANS, C.; SPENCER, J. P. E.; SCHROETER, H.; RECHNER, A. R. (2000): Bioavailability of flavonoids and potential bioactive forms in vivo. *Drug metabolism and Drug interactions* **17** (1-4), 291-310

RIETJENS, I. M. C. M.; BOERSMA, M. G.; DE HAAN, L.; SPENKELINK, B.; AWAD, H. M.; CNUBBEN, N. H. P.; VAN ZANDEN, J. J.; VAN DER WOUDE, H.; ALINK, G. M.; KOEMAN, J. H. (2002): The pro-oxidant chemistry of the natural antioxidants vitamin C, vitamin E, carotenoids and flavonoids. *Environmental Toxicology and Pharmacology* **11**, 321-333

SCHWEDA, K. (2004): Oxidative Schädigung von C6 Rattengliomzellen durch Wasserstoffperoxid und Cumulhydroperoxid und der Einfluss von Antioxidantien unterschiedlicher Wirkungsweise. Medizinische Dissertation, CAU Kiel

SINGH, Y.; HALL, G. L.; MILLER, M. G. (1992): Species differences in membrane susceptibility to lipid peroxidation. *Journal of Biochemical Toxicology* **7**, 97-105

SUTTROP, N.; TOEPFER, W.; ROKA, L. (1986): Antioxidant defense mechanisms of endothelial cells: glutathione redox cycle versus catalase. *American Journal of Physiology* **251**, C671-C680

VROEGOP, S. M.; DECKER, D. E.; BUXSER, S. E. (1995): Localization of damage induced by reactive oxygen species in cultured cells. *Free Radical Biology and Medicine* **18**, 141-151

WINKLHOFER-ROOB, B. M.; ROCK, E.; RIBALTA, J.; SHMERLING, D. H.; ROOB, J. M. (2003): Effects of vitamin E and carotenoid status on oxidative stress in health and disease. Evidence obtained from human intervention studies. *Molecular aspects of medicine* **24** (6), 391- 402

YOKOTA, T.; UCHIHARA, T.; KUMAGAI, J.; SHIOJIRI, T.; PANG, J. J.; ARITA, M.; ARAI, H.; HAYASHI, M.; KIYOSAWA, M.; OKEDA, R.; MIZUSAWA, H. (2000): Postmortem study of ataxia with retinitis pigmentosa by mutation of the  $\alpha$ -tocopherol transfer protein gene. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry* **68**, 521-525

ZIELINSKA, M.; GÜLDEN, M.; SEIBERT, H. (2003): Effects of quercetin and quercetin-3-O-glycosides on oxidative damage in rat C6 glioma cells. *Environmental Toxicology and Pharmacology* **13**, 47-53

## 8. Lebenslauf

02.12.1978	Geboren in Zeven
1985 – 1989	Besuch der Grundschule Selsingen
1989 – 1991	Besuch der Orientierungsstufe Selsingen
1991 – 1998	Besuch des Gymnasiums Bremervörde
1998 – 2001	Krankenpflegeausbildung am Martin-Luther-Krankenhaus in Zeven mit Examen
2001 – 2003	Vorklinisches Medizinstudium in Kiel
2003	Physikum in Kiel
2003 - 2007	Klinisches Medizinstudium in Kiel
2007	Praktisches Jahr : <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Tertial: Gynäkologie UKSH Campus Kiel</li> <li>2. Tertial: Chirurgie UKSH Campus Kiel</li> <li>3. Tertial: Friedrich-Ebert-Krankenhaus, Neumünster: Innere Medizin</li> </ol>
Seit Januar 2008	Medizinische Klinik, Klinikum Emden, Hans Susemihl-Krankenhaus