

ABSTRACT/ZUSAMMENFASSUNG

In dieser Arbeit wurde der Einfluß des zellulären Redoxstatus, modifiziert durch die Zugabe von D-Glucose, auf die H_2O_2 -induzierte Zellschädigung von L929-Fibroblasten untersucht. War bei Inkubation in substratfreiem Krebs-Henseleit-Puffer die Verfügbarkeit von Reduktionsäquivalenten begrenzt, trugen ein schneller, stark ausgeprägter calciumabhängiger Mechanismus mit deutlichem Membranblebbing und ein langsamerer eisenabhängiger Mechanismus zur Zellschädigung bei. Wurde die Verfügbarkeit von Reduktionsäquivalenten durch die Zugabe von D-Glucose zum Inkubationspuffer erhöht, wurde die gesamte Schädigung verlangsamt, wobei der calciumabhängige Anteil der Schädigung gehemmt und der eisenabhängige verstärkt wurde, wodurch unter anderem die morphologische Erscheinungsform des Zellunterganges verändert wurde.

Zur Aufklärung dieser durch einen verbesserten zellulären Redoxzustand verstärkten Eisenabhängigkeit wurde der Einfluß des Redoxzustandes auf eine rein eiseninduzierte Schädigung in L929-Zellen untersucht. Dazu wurde der chelatisierbare Eisenpool von L929-Zellen experimentell durch Zugabe des membrangängigen Komplexes aus Eisen(III)chlorid und 8-Hydroxychinolin (1:2; „Fe(III)/8HQ“) erhöht. Diese Erhöhung verursachte in Abwesenheit von Glucose einen signifikanten Vitalitätsverlust. Durch Zugabe von Glucose konnte dieser Vitalitätsverlust deutlich verstärkt und beschleunigt werden; ein solcher Effekt wurde weder von L-Glucose noch von Desoxyglucose ausgeübt. Die Sauerstoffabhängigkeit der Schädigung sowohl in An- als auch in Abwesenheit von Glucose und Messungen mit dem oxidationssensitiven Farbstoff Dichlorodihydrofluorescein zeigten, daß die Schädigung auf der Bildung oxidierender Sauerstoffspezies beruhte, die in Anwesenheit von Glucose verstärkt wurde. Zur Überprüfung einer Beteiligung von durch die Metabolisierung von Glucose verstärkt gebildeten Reduktionsäquivalenten wurde NAD(P)H fluoreszenzmikroskopisch und enzymatisch bestimmt; diese Messungen ergaben einen 1,5- bzw. 2-fachen Anstieg des zellulären NAD(P)H-Gehaltes nach Glucosezugabe. Die Vermutung, daß die intrazelluläre Eisenreduktion durch diese erhöhte zelluläre Reduktionskapazität verstärkt wurde, wurde mit Hilfe des Fluoreszenzindikators PhenGreen SK verifiziert. Da die Fluoreszenz dieses Farbstoffes durch die Bindung von zweiwertigem Eisen stark gequenchet und durch dreiwertiges Eisen praktisch nicht beeinflusst wird, konnte anhand des Fluoreszenzabfalles PhenGreen-beladener Zellen die Bildung von zweiwertigem Eisen sichtbar gemacht und durch Bestimmung der Geschwindigkeit des Fluoreszenzabfalles auch – erstmals in vitalen Zellen und auf Einzelzellebene – die Reduktionsgeschwindigkeit des Eisens gemessen werden. Durch diese Meßmethode konnte gezeigt werden, daß die Geschwindigkeit der intrazellulären Reduktion des zugegebenen Eisens durch die Zugabe von D-Glucose mehr als verdoppelt wurde, während weder L-Glucose noch Desoxyglucose einen signifikanten Einfluß auf die Eisenreduktion hatten. Eine ähnliche Beschleunigung wurde auch durch Zugabe der Reduktionsmittel Ascorbat und Glutathion (als membranpermeabler Ethylester) erzielt. Auch die Erhöhung der Reduktionskapazität der Zellen durch Glutathion-Ethylester und den SH-Gruppen-Donor N-Acetylcystein verstärkte die eiseninduzierte Zellschädigung. Diese Ergebnisse zeigten, daß die Toxizitätsverstärkung durch Glucose auf einer beschleunigten Reduktion von Eisen, vermittelt durch den zentralen Elektronenverteiler NAD(P)H, basierte, die zu einer erhöhten Verfügbarkeit des fentonreaktiven zweiwertigen Eisens führte, das durch die Teilnahme an ROS-bildenden Reaktionen oxidativen Streß induzierte. Durch die Beschleunigung der anschließenden Re-Reduktion des Eisens wurde dieser Redoxzyklus – und damit der oxidative Streß – verstärkt. Ähnliche Effekte konnten auch in Rattenhepatozyten und ansatzweise in Rattenleberendothelzellen beobachtet werden.

Dieser Mechanismus des beschleunigten „Redoxcyclings“ und der damit erhöhten Verfügbarkeit von zweiwertigem, fentonreaktivem Eisen kann auch die Verstärkung des eisenabhängigen Anteils der H_2O_2 -induzierten Schädigung erklären, die damit – zusammen mit der durch Glucose vermittelten Hemmung des calciumabhängigen Schädigungsweges – in Anwesenheit von Glucose den überwiegenden Anteil der H_2O_2 -induzierten Schädigung von L929-Zellen ausmachte. Ein verbesserter zellulärer Redoxzustand kann also – je nach Art des Schädigungsmechanismus – antioxidative und damit protektive oder aber prooxidative und schädigende Auswirkungen haben.