

**Effekte von Glukokortikoiden, gonadalen Steroiden
und Interleukinen auf antioxidativ wirksame
Substanzen und Enzymsysteme in neuronalen und
glialen Zellsystemen**

Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

dem
Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von
Andreas Johannes Schmidt
aus Hamburg

Marburg/Lahn 2009

Vom Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg als Dissertation am 22.12.2000
angenommen.

Erstgutachter Prof. Dr. G. Heldmaier
Zweitgutachter Prof. Dr. J.-C. Krieg
Tag der mündlichen Prüfung am 15.12.2009

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1.	Reaktive Sauerstoffspezies im Gehirn und ihr Einfluss bei neuropsychiatrischen Erkrankungen	1
1.2.	Stoffwechsel und Funktion von Glutathion im Gehirn	7
1.3.	Pathophysiologie von Glutathion	12
1.4.	Pathophysiologie der Katalase bei neurodegenerativen Erkrankungen	18
1.5.	Protektive Effekte von Steroidhormonen	19
1.6.	Einflüsse von Steroiden auf das antioxidative System in peripheren und neuronalen Systemen	24
1.7.	Einflüsse von Interleukinen auf den Stoffwechsel von Glutathion	26
1.8.	Physiologie und Pathophysiologie von Interleukin-6 im zentralen Nervensystem	26
1.9.	Zielsetzung	27
2.	Materialien	28
2.1.	Geräte	28
2.2.	Chemikalien	29
3.	Methoden	31
3.1.	Zellkulturen	31
3.1.1.	HT22 und C ₆ Zellen	31
3.1.2.	Primärkulturen	31
3.2.	Messung des Glutathion-Gehaltes	32
3.3.	Messung der Katalase-Aktivität	34
3.4.	Messung des Proteingehalts	35
3.5.	Quantifizierung des Zellüberlebens	35
3.6.	Statistische Analyse der Daten	36
4.	Ergebnisse	37
4.1.	Effekte von Glukokortikoiden auf den GSH-Spiegel in HT22 Zellen	37
4.2.	Effekte von Dexamethason (10 ⁻⁶ M) auf den GSH-Spiegel in HT22 Zellen	38
4.3.	Effekte von Dexamethason (10 ⁻⁷ M) auf den GSH-Spiegel	39

	in HT22 Zellen	
4.4.	Effekte des Glukokortikoid-Agonisten RU362 auf den GSH-Spiegel in HT22 Zellen	40
4.5.	Effekte von gonadalen Steroiden auf den GSH-Spiegel in HT22 Zellen	41
4.6.	Dosis-Wirkungskurve von 17 β -Östradiol: Effekte auf den GSH-Spiegel in HT22 Zellen	42
4.7.	Kurzzeiteffekte von Glukokortikoiden und gonadalen Steroiden auf hippokampale und neokortikale Primärkulturen	43
4.8.	Langzeiteffekte von Glukokortikoiden und gonadalen Steroiden auf den GSH-Spiegel in hippokampalen Primärkulturen	45
4.9.	Langzeiteffekte von Glukokortikoiden und gonadalen Steroiden in neokortikalen Primärkulturen	46
4.10.	Effekte von Glukokortikoiden auf den GSH-Spiegel in C ₆ Zellen	47
4.11.	Effekte von gonadalen Steroiden auf den GSH-Spiegel in C ₆ Zellen	48
4.12.	Effekte von Interleukin-6 auf den GSH-Spiegel in HT22 Zellen	50
4.13.	Effekte des IL-6 Antikörpers auf den IL-6 induzierten GSH-Anstieg in HT22 Zellen	52
4.14.	Effekte von Interleukin-6 auf hippokampale Primärkulturen	53
4.15.	Effekte von Glukokortikoiden auf die Katalase-Aktivität in HT22 Zellen	54
4.15.1.	Effekte von Glukokortikoiden (10 ⁻⁵ M) auf die Katalase-Aktivität	54
4.15.2.	Effekte von Glukokortikoiden (10 ⁻⁷ M) auf die Katalase-Aktivität	55
4.15.3.	Effekte des Glukokortikoid-Agonisten RU 362 auf die Katalase-Aktivität	56
4.16.	Effekte von gonadalen Steroiden auf die Katalase-Aktivität in HT22 Zellen	58
4.16.1.	Effekte von gonadalen Steroiden (10 ⁻⁵ M) auf die Katalase-Aktivität	58
4.16.2.	Dosis-Wirkungskurve mit Testosteron: Wirkung auf die Katalase-Aktivität in HT22 Zellen	59
4.16.3.	Neuroprotektive Effekte von Testosteron in HT22 Zellen	60
4.16.4.	Effekte von gonadalen Steroiden (10 ⁻⁷ M) auf die Katalase-Aktivität	60
4.16.5.	Effekte von weiteren Östrogenen auf die Katalase-Aktivität	61
4.17.	Effekte von Glukokortikoiden auf die Katalase-Aktivität in C ₆ Zellen	63
4.18.	Effekte von gonadalen Steroiden auf die Katalase-Aktivität	64

in C₆ Zellen

5.	Diskussion	66
5.1.	Einflüsse von Glukokortikoiden auf den GSH-Spiegel in HT22 Zellen	67
5.2.	Wirkungen von gonadalen Steroiden auf den GSH-Spiegel in HT22 Zellen	75
5.3.	Einflüsse von Glukokortikoiden auf den GSH-Spiegel in neuronalen Primärkulturen	82
5.4.	Einflüsse von gonadalen Steroiden auf den GSH-Spiegel in neuronalen Primärkulturen	82
5.5.	Einflüsse von Glukokortikoiden auf den GSH-Spiegel in Gliazellen	83
5.6.	Einflüsse von gonadalen Steroiden auf den GSH-Spiegel in Gliazellen	85
5.7.	Effekte von IL-6 auf den GSH-Spiegel in hippokampalen Zellsystemen	86
5.8.	Effekte von Glukokortikoiden auf die Katalase-Aktivität in HT22 Zellen	88
5.9.	Effekte von gonadalen Steroiden auf die Katalase-Aktivität in HT22 Zellen	89
5.10.	Effekte von Glukokortikoiden auf die Katalase-Aktivität in C ₆ Zellen	90
5.11.	Effekte von gonadalen Steroiden auf die Katalase-Aktivität in C ₆ Zellen	90
5.12.	Zusammenfassung und Schlussfolgerungen	91
6.	Zusammenfassung	95
7.	Literatur	98
8.	Anhang	132
8.1.	Abkürzungsverzeichnis	132
8.2.	Danksagung	132
8.3.	Lebenslauf	134

1. Einleitung

Zu den häufigsten neurodegenerativen Krankheitsbildern gehören die Alzheimer'sche, die Parkinson'sche und die Huntington'sche Erkrankung sowie die zerebrale Ischämie und die amyotrophe laterale Sklerose. Da der Anteil der älteren Menschen an der Bevölkerung stark ansteigt und damit gerade die Anfälligkeit für neurodegenerative Erkrankungen deutlich zunimmt, wird die Häufigkeit derartiger im wesentlichen bei älteren Leuten auftretenden Erkrankungen in nächster Zeit erheblich zunehmen. So geht man im Falle der Demenz gegenwärtig von einer Gesamtzahl von 830.000 bis 1,1 Millionen Erkrankten unter den über 65-jährigen aus. Bei zwei Dritteln der Fälle ist die Alzheimer'sche Erkrankung die Ursache. Man kann weiterhin davon ausgehen, dass 70% der Erkrankten bereits das 80. Lebensjahr vollendet haben. Die Häufigkeit von Demenzen unter 65 Jahren ist gering (Bickel, 1999). Neuere Publikationen (Pietrzik und Behl, 2005) gehen sogar davon aus, dass für 90% der Demenzen die Alzheimer'sche Erkrankung verantwortlich ist. Im Falle der Parkinson'schen Krankheit geht man von einer jährlichen Prävalenz von 20.000-100.000 aus, die jenseits des 60. Lebensjahrs rasch zunimmt (Berlit, 1996).

1.1. Reaktive Sauerstoffspezies im Gehirn und ihr Einfluss bei neuropsychiatrischen Erkrankungen

Im Verlauf dieser Erkrankungen werden im verstärkten Umfang reaktive Sauerstoffspezies (ROS) gebildet. Aufgrund der hohen Stoffwechselrate, der außergewöhnlichen Lipidzusammensetzung und des minimalen Zellumsatzes ist das zentrale Nervensystem besonders anfällig für solche ROS. Außerdem beanspruchen die Zellen des menschlichen Gehirns ungefähr 20% des im Körper verbrauchten Sauerstoffs, obwohl das Gehirn nur 2% des Körpergewichts ausmacht (Clarke und Sokoloff, 1999). Daher entstehen

im Gehirn in wesentlich größerem Umfang als in anderen Organen des Körpers ROS, die ständig während des oxidativen Metabolismus auftreten. Sie werden zum Beispiel im Rahmen der Elektronentransportkette in den Mitochondrien und bei Reaktionen von mitochondrienmembranassoziierten Enzymen wie der Monoaminoxidase gebildet. Weitere Quellen sind die Stickstoffoxid-Synthase, der Arachidonsäure-Stoffwechsel, die Xanthinoxidase und P450-Enzyme (Schulz et al., 2000). Des Weiteren können sie entstehen, wenn der Organismus toxischen Agentien wie Xenobiotika oder ionisierender Strahlung ausgesetzt wird (Freeman und Crapo, 1982). Zur Gruppe der ROS gehören freie Radikale und Verbindungen wie Wasserstoffperoxid. Unter freien Radikalen versteht man Atome oder Moleküle, die über ein oder mehrere ungepaarte Elektronen verfügen. Hierzu zählen zum Beispiel das Hydroxylradikal, das Superoxidradikal und der Singulett-Sauerstoff (Bergendi et al., 1999). ROS werden verstärkt während des normalen Alterns (Benzi und Moretti, 1995; Mo et al., 1995; Beckman und Ames, 1998) und während neurologischer sowie psychiatrischer Erkrankungen wie der Parkinson'schen Krankheit (Jenner, 1998; Jellinger, 1999), der Alzheimer'schen Krankheit (Markesberry und Carney, 1999; Retz et al., 1998), der amyotrophen lateralen Sklerose (Cookson und Shaw, 1999), der multiplen Sklerose (Gilgun-Sherki et al., 2004), der Huntington'schen Krankheit (Browne et al., 1999), der zerebralen Ischämie (Love, 1999), der Schizophrenie (Smythies, 1997) und dem Down-Syndrom (Busciglio und Yankner, 1995) sowie bei Hirnverletzungen (Lewen et al., 2000) freigesetzt.

Auch im Rahmen vieler psychiatrischer Erkrankungen [Angststörungen, Aufmerksamkeitsdefizit-/Hyperaktivitätsstörungen (ADHS), tief greifende Entwicklungsstörungen (z.B. frühkindlicher Autismus), bipolare Störungen, Demenz, depressive Störungen, schizophrene Störungen, Zwangsstörungen] sind im zentralen Nervensystem und in peripheren Organsystemen biochemische Veränderungen beschrieben, die auf eine vermehrte Bildung von ROS hinweisen. Solche indirekten Hinweise sind erhöhte Spiegel von Produkten der Lipidperoxidation (LPO) [4-Hydroxynonenal (4-HNE),

Isoprostane, Malondialdehyd (MDA)], von Produkten der DNA- (8-Oxodeoxyguanosin, 8-Oxo-7,8-dihydroguanin) und der Protein-Schädigung (Proteinkarbone) sowie veränderte Aktivitäten von antioxidativen Enzymen [z.B. Superoxid Dismutase (SOD) oder Katalase] und veränderte Spiegel von antioxidativen Substanzen wie z. B. reduziertes Glutathion (GSH).

Im Zusammenhang mit Angsterkrankungen wurden Veränderungen bei Patienten mit Panikstörung und sozialer Phobie gefunden. Kuloglu et al. (2002c) beschrieben signifikant erhöhte Spiegel von MDA im Plasma von Patienten mit einer Panikstörung. In Hämolysaten von Erythrozyten konnten die Autoren signifikant erhöhte Aktivitäten wesentlicher antioxidativer Enzyme wie SOD und Glutathion-Peroxidase (GPx) nachweisen. Im Serum von Betroffenen konnten Herken et al. (2006) eine herabgesetzte SOD Aktivität zeigen, die aber kein signifikantes Niveau erreichte. Bei Patienten mit sozialer Phobie wurde ein signifikant erhöhter MDA-Spiegel im Erythrozyten-Hämolysat im Vergleich zu Kontrollen gefunden (Atmaca et al., 2004). Die Aktivitäten der totalen SOD, der GPx und der Katalase waren ebenfalls signifikant erhöht.

Im Vergleich zu gesunden Kontrollen konnte im Plasma von Kindern mit ADHS ein signifikant erhöhter Spiegel von Produkten der oxidativen DNA Schädigung nachgewiesen werden (Chovanova et al., 2006). Im Plasma von Erwachsenen mit ADHS konnten Bulut et al. (2007) einen signifikanten erhöhten Spiegel von MDA zeigen.

Bei Patienten mit Autismus wurden signifikant erhöhte Spiegel von Produkten der LPO im Plasma (Chauhan et al., 2004), in Erythrozyten (Zoroglu et al., 2004) und im Urin (Ming et al., 2005) gefunden. Eine weitere Studie zeigte allerdings keine Veränderungen im Plasma (Sögüt et al., 2003). Im Plasma von autistischen Patienten konnte ein reduzierter Gehalt von totalem GSH sowie ein herabgesetzte Verhältnis von reduziertem zu oxidiertem GSH nachgewiesen werden (James et al., 2004).

Im Zusammenhang mit antioxidativen Enzymen wurde eine signifikant herabgesetzte GPx Aktivität im Plasma und in Erythrozyten von autistischen Kindern gefunden (Yorbik et al., 2002). Weitere Studien zeigten eine signifikant reduzierte Aktivität der Katalase (Zoroglu et al., 2004) sowie eine signifikant erhöhte SOD-Aktivität in Erythrozyten von Patienten (Zoroglu et al., 2004) und in einem anderen Fall eine signifikant niedrigere Aktivität dieses Enzyms in Erythrozyten im Vergleich zu Kontrollen (Yorbik et al., 2002). Eine andere Arbeit beschreibt allerdings eine signifikant erhöhte GPx Aktivität im Plasma und keine Veränderungen der SOD (Sögüt et al., 2003).

In Studien mit Patienten mit bipolarer Erkrankung, bei der depressive und manische Phasen vorkommen, wurden signifikante Anstiege des Gehaltes von Produkten der LPO im Plasma (Kuloglu et al., 2002a; Machado-Vieira et al., 2007) und im Serum (Andreazza et al., 2006) gefunden. Weiterhin konnten in Blutbestandteilen signifikant erhöhte Aktivitäten der SOD (Andreazza et al., 2006; Kuloglu et al., 2002a; Machado-Vieira et al., 2007; Savas et al., 2006) nachgewiesen werden. Andere Studien beschreiben eine signifikant niedrigere SOD-Aktivität im Serum von Patienten (Gergerlioglu et al., 2007; Selek et al., 2007). Die Aktivitäten von GPx und Katalase zeigten kein eindeutiges Verhalten während der verschiedenen Phasen der Erkrankung (Andreazza et al., 2006), während Ranjekar et al. (2003) eine signifikant herabgesetzte Aktivität der Katalase in Erythrozyten von Patienten zeigen konnten.

Im zentralen Nervensystem und in peripheren Organsystemen von Demenzkranken mit verschiedenen Demenzformen wurden ebenfalls Indizien für eine angestiegene Produktion von ROS gefunden. Erhöhte Spiegel von Produkten der LPO wurden sowohl im Blut (Bourdel-Marchasson et al., 2001) wie auch in verschiedenen Hirnarealen (Lovell et al., 1995; Marcus et al., 1998) von Patienten mit Alzheimer'scher Erkrankung gefunden. Veränderungen der Aktivitäten antioxidativ wirksamer Enzyme werden in peripheren

Organsystemen und in Hirnarealen in großem Umfang und kontrovers diskutiert (z. B. Bourdel-Marchasson et al., 2001; Gsell et al., 1995; Lovell et al., 1995; Marcus et al., 1998). Im Zusammenhang mit der Demenz vom Alzheimer Typ zeigten Adams et al. (1991) erhöhte Spiegel von oxidiertem und reduziertem GSH in verschiedenen Hirnarealen nach einer Autopsie.

Auch im Rahmen der Depression wurden viele Anzeichen für eine verstärkte Bildung von ROS nachgewiesen. Im Plasma (Sarandol et al., 2007; Selley, 2004), im Serum (Khanzode et al., 2003) und in Erythrozyten (Bilici et al., 2001; Sarandol et al., 2007) von Patienten mit einem depressiven Syndrom konnte ein signifikant erhöhter Gehalt von Produkten der LPO sowie im Serum ein signifikant angestiegener Spiegel von Produkten der DNA Schädigung (Forlana und Miller, 2006) nachgewiesen werden. Die Untersuchung von Enzymen des antioxidativen Metabolismus konnte im Plasma von depressiven Patienten eine signifikant erhöhte Glutathion Reduktase (GR) Aktivität zeigen (Bilici et al., 2001). Weiterhin wurden in Erythrozyten (Bilici et al., 2001; Sarandol et al., 2007) und im Serum (Khanzode et al., 2003) signifikant angestiegene Aktivitäten der SOD und in Erythrozyten der GPx gefunden (Bilici et al., 2001). Eine weitere Untersuchung zeigte dagegen eine signifikant verringerte SOD-Aktivität im Serum von Patienten (Herken et al., 2007).

Im Rahmen der Schizophrenie werden Anzeichen einer erhöhten Produktion von ROS wie LPO, DNA- und Protein-Schädigung (z. B. Dakhale et al., 2004; Herken et al., 2001; Nishioka and Arnold, 2004; Skinner et al., 2005; Young et al., 2007) kontrovers diskutiert. Dasselbe gilt auch für Aktivitäten der Enzyme des antioxidativen Metabolismus. Dies gilt sowohl für mit Antipsychotika behandelte (z. B. Herken et al., 2001), wie auch für unbehandelte Patienten (z. B. Dakhale et al., 2004) als auch für post-mortem Studien mit Gehirnmaterial von behandelten Patienten (Loven et al., 1996; Michel et al., 2004; Yao et al., 2006).

Auch im Rahmen der Zwangsstörung konnten Anzeichen für eine vermehrte Bildung von ROS gefunden werden. Die Studie von Selek et al. (2007) zeigte, dass das Gleichgewicht zwischen oxidativem und antioxidativem Stoffwechsel im Plasma von Patienten zur antioxidativen Seite hin verschoben ist. In Erythrozyten von Patienten (Ersan et al., 2006; Kuloglu et al., 2002b) wurden signifikant erhöhte Spiegel von MDA, einem Produkt der LPO, gefunden. Kuloglu et al. (2002) zeigten weiterhin signifikant angestiegene Aktivitäten von SOD und GPx im Hämolysat von Erythrozyten. Ersan et al. (2006) beschrieben einen signifikant herabgesetzten Gehalt von Vitamin E im Plasma von Patienten im Vergleich zu Kontrollen.

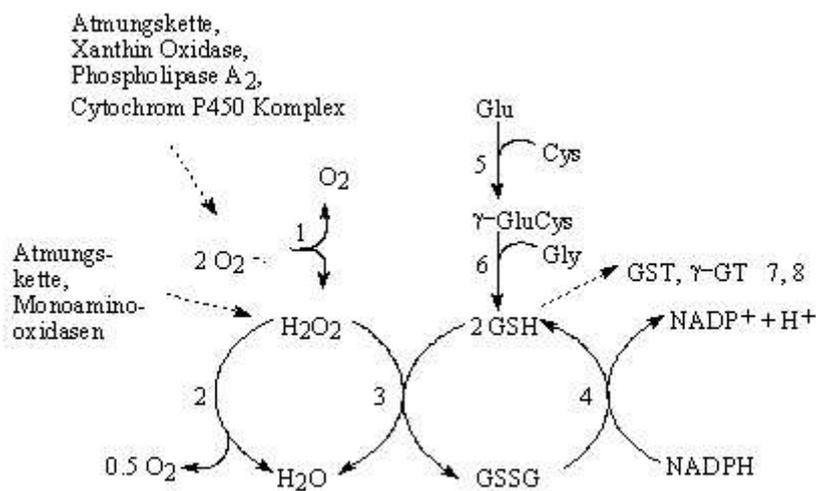


Abbildung 1: Metabolismus von reaktiven oxygenen Spezies und Glutathion (1: Superoxid Dismutase, 2: Katalase, 3: Glutathion Peroxidase, 4: Glutathion Reduktase, 5: γ-Glutamylcystein Synthetase, 6: Glutathion Synthetase, 7: Glutathion-S-Transferase, 8: γ-Glutamyl-transpeptidase)

An der Entgiftung dieser freien Radikale sind neben Substanzen wie Ascorbat (Rice, 2000), Melatonin (Reiter et al., 2000), Vitamin E (Vatassery, 1998) und GSH im Wesentlichen drei Enzymsysteme beteiligt. Die SOD wandelt das Superoxid-Radikal, das im Verlauf der Atmungskette und bei Reaktionen von mitochondrienmembranassoziierten Enzymen wie der Monoaminoxidase in allen Körperzellen entsteht, in Wasserstoffperoxid um. Es existieren zwei Formen der SOD: die Kupfer-Zink-SOD im Zytoplasma der Zellen (SOD1) und extrazellulär (SOD3) sowie die Mangan-SOD in den Mitochondrien (SOD2). Das Wasserstoffperoxid wird von der GPx mit GSH als Substrat und von der Katalase, die in den Zellen in den Peroxisomen lokalisiert ist, in Wasser umgewandelt. Abbildung 1 zeigt alle wesentlichen Reaktionen, die von antioxidativen Enzymen katalysiert werden.

1.2. Stoffwechsel und Funktion von Glutathion im Gehirn

Neben den oben erwähnten Enzymsystemen ist GSH eine der wesentlichsten Komponenten bei der Entgiftung von ROS. Die Synthese von GSH aus L-Glutamat, L-Cystein und Glycin erfolgt durch zwei aufeinanderfolgende Schritte. Die γ -Glutamyl-Cystein Synthetase (γ -GCS) bildet als Produkt das Dipeptid γ -Glutamyl-Cystein. Durch die Reaktion der Glutathion Synthetase wird dann Glycin angehängt. Als Kosubstrat wird für beide Schritte ATP benötigt. Die Regulation des intrazellulären Glutathion-Spiegels erfolgt über eine Feedback-Hemmung der γ -GCS durch das Endprodukt (Richman und Meister, 1975). GSH liegt in Säugetierzellen in Konzentrationen von 0.5 bis 12 mM vor. Der Gehalt im gesamten Gehirn beträgt 2-3 mM (Cooper, 1997b). Raps et al (1989). bestimmten die Gehalte von [reduziertem und oxidiertem(GSSG)] GSH in murinen Astrozyten und Neuronen, wobei der Gehalt in differenzierten und undifferenzierten Astrozyten hoch war (25 bzw. 16 nmol/mg Protein). Im Kontrast dazu waren die Spiegel in Neuronen niedrig (1.0 nmol/mg Protein).

Über Wasserstoffperoxid wird berichtet, dass es besonders toxisch gegenüber den Neuronen des Gehirns wirkt (Mischel et al., 1997; Abe und Saito, 1998). Wasserstoffperoxid führt bei kultivierten Neuronen zu einem apoptotischen Zelltod (Whittemore et al., 1995; Hoyt et al., 1997). Das GSH-System ist die wesentlichste Komponente zur Entgiftung von Wasserstoffperoxid in Neuronen (Desagher et al., 1996). Eine Applikation von Wasserstoffperoxid führt zu einer schnellen Oxidation von GSH. Der Entfernung dieses Peroxids folgt die fast komplette Regeneration des ursprünglichen GSH/GSSG Verhältnisses (Dringen et al., 1999b). Für einen schnellen Abbau des Wasserstoffperoxids in Neuronen sind sowohl die GPx als auch die Katalase essentiell. Im Gegensatz zu der Situation in Astrogliazellkulturen (Dringen und Hamprecht, 1997) kann das GSH-System der Neurone den Ausfall der Katalase nicht kompensieren (Dringen et al., 1999b).

Auch in kultivierten Astrozyten sind beide an der Synthese von GSH beteiligten Enzyme nachgewiesen worden (Makar et al., 1994). Der limitierende Faktor für den GSH-Gehalt in Astrogliazellen ist die Verfügbarkeit von Glutamat (Dringen und Hamprecht, 1996). Kultivierte Astrogliazellen haben sich als sehr effizient in der Entgiftung von exogenem Wasserstoffperoxid (Desagher et al., 1996; Dringen und Hamprecht, 1997) wie auch von organischen Hydroperoxiden, wie zum Beispiel tertiäres Butylhydroperoxid oder Kumenhydroperoxid, (Dringen et al., 1998; Kussmaul et al., 1999) erwiesen. Sowohl Wasserstoffperoxid als auch organische Hydroperoxide sind Substrate der GPx. In Kulturen von Astrogliazellen findet man nach Applikation derartiger Peroxide einen schnellen Anstieg des Spiegels von GSSG (Dringen und Hamprecht, 1997; Dringen et al., 1998; Kussmaul et al., 1999). Zusätzlich zur GPx ist die Katalase an der Entgiftung von Wasserstoffperoxid beteiligt (Desagher et al., 1996; Dringen und Hamprecht, 1997). Die Hemmung der Katalase hat aber nur einen geringen Einfluss auf die Entfernung dieses Peroxids, wohingegen die Hemmung beider Enzyme die Fähigkeit von Astrogliazellen zur Entgiftung von Wasserstoffperoxid deutlich herabsetzt (Dringen und Hamprecht, 1997). Diese Erkenntnisse legen nahe, dass in

kultivierten Astrogliazellen das GSH-System die Funktion der Katalase bei der Entgiftung von Wasserstoffperoxid übernehmen kann. Die Katalase war unter den Bedingungen dieser Versuche nicht in der Lage, organische Hydroperoxide umzusetzen. Deshalb ist das GSH-System verantwortlich für die schnelle Umsetzung dieser Substanzen (Dringen et al., 1998, Kussmaul et al., 1999). Das in diesen Reaktionen produzierte GSSG wird durch die Reaktion der GR wieder in GSH zurückverwandelt. Als Elektronendonator benötigt dieses Enzym Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat (NADPH). Die Entgiftung (Detoxifikation) von Peroxiden ist also von der Verfügbarkeit und der Regeneration von NADPH abhängig. Wie auch in anderen Zellen und Geweben scheint in Astrogliazellen der Pentosephosphatweg die wesentliche Quelle für die Regeneration von NADPH zu sein. Diese Befunde stimmen mit weiteren überein, die besagen, dass der Pentosephosphatweg in kultivierten Astrogliazellen während der Detoxifikation von Wasserstoffperoxid stark aktiviert ist (Ben-Yoseph et al., 1994 und 1996).

Da sie höhere Gehalte von GSH aufweisen, sollen Astrozyten eine wichtige Rolle bei der Abwehr von ROS spielen, zumal sie auch höhere Gehalte von verschiedenen antioxidativ wirksamen Systemen enthalten als andere Zelltypen im Gehirn (Peuchen et al., 1997; Juurlink, 1997; Wilson et al., 1997). Unterstützt wird diese Ansicht durch die Tatsache, dass kultivierte Neurone gegenüber schädigenden Komponenten wie Wasserstoffperoxid, Peroxynitrit oder 6-Hydroxydopamin empfindlicher sind als kultivierte Astrogliazellen (Bolanos et al., 1995; Ben-Yoseph et al., 1996, Abe und Saito, 1998, Iwata-Ichikawa et al., 1999). Ein Grund dafür könnte der geringere GSH-Gehalt der Neurone sein (Bolanos et al., 1995, Dringen et al., 1999b). In Kokultur sind Astrogliazellen in der Lage, andere Gehirnzelltypen in der Abwehr von ROS zu unterstützen. Selbst bei einem Verhältnis [1:20] von Astrogliazellen zu Neuronen wurde eine signifikante Protektion gegen die durch Wasserstoffperoxid induzierte Toxizität beobachtet (Desagher et al., 1996). Neurone in Kultur können durch extrazelluläre ROS geschädigt werden, die durch Astrogliazellen entgiftet

werden können (Drukarch et al., 1998). Für diese Funktion ist GSH von Bedeutung, da diese protektive Wirkung der Astrogliazellen vermindert wird, wenn sie einen geringen GSH-Gehalt aufweisen (Drukarch, 1997).

Im Organismus hat GSH wichtige Funktionen als antioxidativ wirksame Substanz, als Reaktionspartner für die Entgiftung von Xenobiotica, als Kofaktor von Isomerisationsreaktionen und als Lager- und Transportform von Cystein (Cooper, 1997a). Außerdem ist GSH essentiell für die Zellproliferation (Poot et al., 1995) und erhält das Thiol-Redoxpotential in Zellen, indem es die Sulfohydrylgruppen von Proteinen in der reduzierten Form erhält (Cotgreave und Gerdes, 1998). Weiterhin hat GSH auch immunologische Funktionen. Furukawa et al. (1987) zeigten, dass diätätischer GSH-Zusatz den Status dieses Tripeptides in der Milz verbessert und die durch T-Lymphozyten-vermittelte Immunantwort in der alternden Maus erhöht. Neuere Resultate legen zusätzlich nahe, dass GSH eine Rolle bei der Regulation der Apoptose spielt (van den Doppelsteen et al., 1996; Ghibelli et al., 1998; Hall et al., 1999). Extrazelluläres GSH wird als Neurohormon angesehen. Die Effekte von GSH im Rahmen der synaptischen Übertragung bei Säugetieren sind kürzlich zusammengefasst worden (Janaky et al., 1999). So scheint GSH zum Beispiel in der Lage zu sein, an verschiedene Glutamat-Rezeptoren zu binden und als endogener Agonist wirken zu können (Ogita et al., 1995). Außerdem dient extrazelluläres GSH als Substrat für γ -Glutamyltranspeptidasen und hat im Gehirn eine Funktion im Leukotrien-Metabolismus (Dringen, 2000). Weiterhin ist GSH im zentralen Nervensystem an der Regulation des Blutdrucks beteiligt (Murakami et al., 1987). Die Ergebnisse von Honda et al. (1994) und Kimura et al. (1998) zeigen, dass GSSG eine Rolle bei der Regulation des Schlafes spielt.

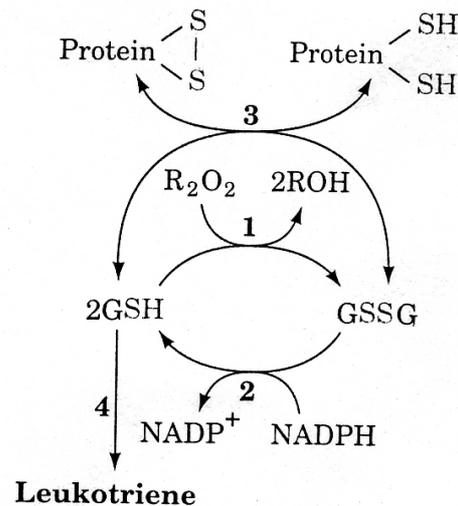


Abbildung 2: Einige Reaktionen mit Glutathion: (1) Peroxid-Entgiftung durch die Glutathion-Peroxidase, (2) Regenerierung von GSH aus GSSG durch die Glutathion-Reduktase, (3) Modulierung des Thiol-Disulfid-Gleichgewichtes durch die Thiol-Transferase und (4) Leukotrien-Biosynthese durch die Glutathion-S-Transferase.

Die Belege, dass GSH eine wichtige Rolle bei der Entgiftung ROS im Gehirn spielt, nehmen zu. Ein GSH-Defizit, das im Gehirn von neugeborenen Ratten durch Gabe eines irreversiblen Hemmstoffs der GSH-Synthese [Buthionin-Sulfoximin (BSO)] induziert wurde, führte zu mitochondrialen Schäden (Jain et al., 1991). Weiterhin ist bekannt, dass eine Reduktion des GSH-Gehaltes im Gehirn durch BSO die toxischen Effekte, die durch Ereignisse, die mit einer erhöhten Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies in Verbindung gebracht werden, wie Ischämie (Mizui et al., 1992), 4-Phenylpyridiniumion-Behandlung (Wüllner et al., 1996) oder 6-Hydroxydopamin (Pileblad et al., 1989) verstärkt. Für die zelluläre Abwehr ROS spielt GSH also eine sehr wichtige Rolle. So kann es einerseits in nicht enzymatischen Reaktionen direkt mit Radikalen wie dem Superoxidradikal reagieren (Saez et al., 1990, Winterbourn und Metodiewa, 1994) und ist andererseits Elektronendonator in der von der GPx katalysierten Reduktion von Peroxiden (Chance et al., 1979).

Wasserstoffperoxid und organische Peroxide werden so durch dieses Enzym mit GSH als Donor von Reduktionsäquivalenten reduziert. Die Aktivität der GPx ist sowohl im Gehirn (De Marchena et al., 1974) als auch in kultivierten Neuronen (Huang und Philbert, 1995; Desagher et al., 1996) nachgewiesen worden. Während der Reaktion der GPx wird das GSH in GSSG umgewandelt. Das GSSG wird dann durch die GR wieder zu GSH reduziert. Die GR nutzt NADPH als Elektronendonator. Die Detoxifikation von Peroxiden ist also an die Verfügbarkeit und Bildung von NADPH gebunden. Wie in anderen Zellen und Geweben scheint auch in Neuronen und Gliazellen der wesentliche Ursprung für die Bildung von NADPH, das zur Regeneration von GSH notwendig ist, der Pentosephosphat-Weg zu sein (Baquer et al., 1988). Für neuronale Kulturen ist die Aktivierung des Pentosephosphat-Weges während der Detoxifikation von Wasserstoffperoxid nachgewiesen worden (Ben-Yoseph et al., 1994 und 1996).

1.3. Pathophysiologie von Glutathion

Änderungen des GSH-Spiegels sowie auch der Aktivität von antioxidativ wirksamen Enzymen sind beim normalen Altern und bei neurodegenerativen Erkrankungen wie der Parkinson'schen Krankheit, der Alzheimer'schen Krankheit, der amyotrophen lateralen Sklerose sowie in Tiermodellen der zerebralen Ischämie beschrieben. Ein altersabhängiger Abfall des GSH-Spiegels ist in einigen Organismen unter anderem in der Maus (z. B. Abraham et al., 1978; Chen et al., 1990), der Ratte (Lang et al., 1989; Langanieri et al., 1989), beim Menschen im Blut (Lang et al., 1992) und im Linsengewebe des Auges (Rathbun und Murray, 1991) bekannt. Bei der Ratte ist die Entwicklung des GSH-Gehaltes in der zerebralen Hemisphäre von der Geburt bis zum 600. Lebensstag gezeigt worden (Sahoo und Chainy, 1997). Immer war der GSH-Spiegel niedriger als der der neugeborenen Ratten. Diese

Studien legen nahe, dass der mit dem Altern verbundene Abfall des GSH-Gehalts einen Schlüsselfaktor in Rahmen des Alterungsprozesses darstellen könnte (Schulz et al., 2000).

Für die Parkinson'sche Krankheit sind verschiedene biochemische Abnormalitäten in den betroffenen Hirnregionen identifiziert worden, die für die Pathogenese dieser Krankheit von Bedeutung zu sein scheinen. Hierbei handelt es sich um ein Defizit des mitochondrialen Komplexes I, oxidativen Stress und Schädigung sowie einen Eisen-Überschuss. Neuropathologisch ist die Parkinson'sche Krankheit durch eine fortschreitende Degeneration von dopaminergen Neuronen in der Pars compacta der Substantia nigra charakterisiert. Die nachdrücklichste und signifikanteste Veränderung im Bereich der Abwehr von ROS ist die Tatsache, dass der GSH-Gehalt in dieser Hirnregion um 40-50% im Vergleich zu Kontrollen erniedrigt ist (Sofic et al., 1992; Sian et al., 1994a). Dies geschieht zu einem Zeitpunkt zu dem sich andere biochemische Marker wie zum Beispiel die Aktivität des Komplex I der Elektronentransportkette noch im normalen Bereich bewegen. Zunächst wurde der komplette Wegfall des GSH in dieser Region bei gleichzeitigem Auftreten von hohen GSSG-Konzentrationen postuliert (Perry et al., 1982; Perry und Yong, 1986; Perry et al., 1988). Wegen möglicher post-mortem Artefakte und ungeeigneter analytischer Methoden wurden diese Arbeiten kritisiert (Slivka et al., 1987). Auf zellulärer Ebene ist ein signifikanter Abfall des GSH-Spiegels in den überlebenden Neuronen der Substantia nigra bekannt (Pearce et al., 1997). Der herabgesetzte GSH-Gehalt scheint der erste Indikator für oxidativen Stress zu sein (Nakamura et al., 1997). Allerdings ist bis heute die Ursache für diese Verminderung des GSH-Gehaltes noch nicht klar. Da es zu keinem korrespondierenden Anstieg der GSSG-Konzentration kommt, kann die Reduktion des GSH-Spiegels nicht allein durch oxidativen Stress erklärt werden. Es kommt nämlich auch zu keiner Veränderung der Aktivität der γ -GCS, des Schrittmacherenzym der GSH-Synthese, im Falle der Parkinson'schen Erkrankung (Sian et al., 1994b), während die Aktivität der γ -Glutamyltranspeptidase (γ -GT) selektiv in der Substantia nigra in von der Parkinson'schen Erkrankung betroffenen Gehirnen ansteigt

(Sian et al., 1994b). Bei der γ -GT handelt es sich um ein membrangebundenes Ektoenzym, das die Übertragung der γ -Glutamyl-Einheit von GSH auf ein Akzeptormolekül katalysiert. Extrazelluläres GSH kann als Substrat für dieses Enzym an Astrogliazellen dienen. Das Produkt dieser Reaktion ist Cysteinylglycin, das danach durch Dipeptidasen zu Cystein und Glycin hydrolysiert werden kann. Diese Aminosäuren können dann von Neuronen aufgenommen und zur Synthese von GSH verwendet werden. Auf der einen Seite könnte es sich hierbei um ein Modell für die Protektion von Neuronen durch Astrozyten handeln, auf der anderen Seite um den initialen Schritt in der Pathogenese der Parkinson'schen Krankheit (Schulz et al., 2000). Wenn Cystein nicht für die Synthese von GSH verwendet wird, könnte es mit Dopamin-O-Quinon, das aus der enzymatischen Oxidation von Dopamin resultiert, zu 5-S-Cysteinyl-dopamin reagieren (Spencer et al., 1998). In der Substantia nigra von Parkinson-Patienten sind die Gehalte der Cysteinyl-Addukte von 3,4-Dihydroxyphenylalanin, Dopamin und 3,4-Dihydroxyphenylacesssäure verglichen mit Kontrollen erhöht. Diese Konjugate können zu zytotoxischen Dihydroxybenzothiazin-Derivaten umgewandelt werden, die als irreversible Inhibitoren für den Komplex I der Atmungskette fungieren (Zhang und Dryhurst, 1994; Shen und Dryhurst, 1996; Li und Dryhurst, 1997). Zusätzlich zu dem erniedrigten GSH-Spiegel sind Änderungen in der spezifischen Aktivität von Enzymen, die am GSH-Stoffwechsel und an der Abwehr von ROS beteiligt sind, beschrieben. Im Tierversuch führte eine experimentell verursachte Verminderung der GSH-Konzentration im Gehirn nicht direkt zu einem reduzierten Überleben von dopaminergen Neuronen in der Pars compacta der Substantia nigra oder zu einer Reduktion von dopaminergen Endigungen im Striatum (Toffa et al., 1997). In einer klinischen Studie ist untersucht worden, wie sich intravenös verabreichtes GSH bei unbehandelter Parkinson'scher Erkrankung auswirkt (Sechi et al., 1996). Bei allen Probanden traten signifikante Verbesserungen nach der Behandlung mit einem 42-%igen Rückgang der Behinderungen auf. Nachdem das GSH abgesetzt wurde, hielt der positive Effekt für 2-4

Monate an. Bisher haben sich also die biochemischen Untersuchungen auf die Substantia nigra - ein Areal mit schwerem Neuronenverlust - konzentriert. Man geht davon aus, dass die Degeneration dieses Areals der Grund für die wesentlichen klinischen Charakteristika der Krankheit ist, da auch andere Areale des zentralen Nervensystems im Rahmen der Pathologie der Krankheit betroffen sind. Die Substantia innominata, ein Teil des basalen Vorderhirns, ist als das Areal des Verlustes von cholinergen Neuronen bekannt. Im Gegensatz zur Substantia nigra findet sich in der Substantia innominata bei den von der Parkinson'schen Krankheit betroffenen Gehirnen kein Abfall des GSH-Gehaltes (Gu et al., 1998). Ebenso wurde im Kortex des Cingulum keine Veränderung im GSH-Spiegel gemessen.

Im Gegensatz dazu wurde in diesen beiden Hirnarealen von Alzheimer-Patienten im Vergleich zu Kontrollen ein signifikanter Abfall des GSH-Gehaltes beobachtet (Gu et al., 1998). Im Gesamthirn scheint sich der GSH-Gehalt im Verlauf der Alzheimer'schen Erkrankung nicht zu verändern (Perry et al., 1987). Die Aktivitäten der GPx und der GR sind laut einer Studie von Lovell et al. (1995) im Hippokampus erhöht, während eine andere Studie keine Veränderungen zeigte (Marcus et al., 1998). Die Transkription beider Enzyme ist im Hippokampus und im inferioren parietalen Lobulus nicht aber im Kleinhirn von Alzheimer-Patienten erhöht. Weiterhin ist im Zusammenhang mit der Alzheimer'schen Krankheit bekannt, dass GSH eine wichtige Rolle beim Schutz von Neuronen gegen oxidative Schädigung durch 4-HNE, einem Produkt der LPO, spielt. Mark et al. (1997a, 1997b) zeigten, dass das Amyloid- β -Peptid in hippokampalen Neuronen die Bildung von 4-HNE induziert. Sie konnten weiterhin zeigen, dass GSH Neurone gegen oxidative Schädigung durch Amyloid- β -Peptid, Eisen und 4-HNE schützen kann.

Im Rahmen der Pathogenese der amyotrophen lateralen Sklerose (ALS), einer sowohl das erste wie auch das zweite Motorneuron betreffenden Krankheit, scheint oxidativer Stress ein entscheidender Faktor zu sein (Robberecht, 2000). Der Anstieg der Zahl der GSH-

Bindungsstellen im Rückenmark dieser Patienten könnte als eine Hochregulation bedingt durch ein Defizit von GSH interpretiert werden. Messungen auf GSH-Rezeptor Ebene lassen also auf einen Rückgang des GSH-Gehaltes schließen (Lanius et al., 1993). Die Aktivität der GPx ist im Gesamtblut (Mitchell et al., 1993), in roten Blutkörperchen (Przedborsky et al., 1996a), im Plasma (Moumen et al., 1997) und präzentralen Gyrus von Patienten, die an der sporadischen ALS leiden, signifikant herabgesetzt (Przedborsky et al., (1996b). Wie bei der Parkinson'schen Erkrankung wurde auch im Falle der ALS eine klinische Studie zur GSH-Gabe durchgeführt (Chio et al., 1998). Hierbei konnten keine signifikanten Veränderungen in der Entwicklung der Erkrankung festgestellt werden. Eine neuere Studie (Chi et al., 2007) mit in vitro und in vivo Versuchen konnte zeigen, dass eine Depletion von GSH viele apoptotische Vorgänge fördert, die zur Degeneration von Motorneuronen beitragen können.

In Falle der Epilepsie steht die Produktion von ROS in Zusammenhang mit der Ausbildung von epilepsieartiger Aktivität und dem Anfall-induzierten Zelltod. Jedoch war bis vor kurzem ein direkter Beweis der Bildung von freien Radikalen in Neuronen im Verlauf von Anfällen nie erbracht worden. Frantseva et al. (2000) demonstrierten in hippokampalen Schnitten, dass ROS in pyramidalen CA3 aber nicht in CA1 Neuronen während der rhythmischen synchronen durch den GABA_A-Rezeptor Antagonist Bicuculin induzierten Aktivität auftreten. Die Autoren zeigten weiterhin, dass sowohl GSH als auch Vitamin E die durch den Anfall induzierte Neurodegeneration ohne eine Unterdrückung der spontanen epileptischen Aktivität signifikant reduzierten. Müller et al. (2001) fanden mit Hilfe der magnetischen Resonanzspektroskopie Beweise für eine ausgedehnte Beeinträchtigung des GSH-Systems bei Epilepsie-Patienten unabhängig von der Anfallsaktivität.

Auch im Fall von psychiatrischen Krankheitsbildern wie der Schizophrenie sind Veränderungen im GSH-Stoffwechsel beobachtet worden. In der zerebrospinalen Flüssigkeit von nicht mit Medikamenten behandelten Patienten ist ein 27-%igen Abfall des GSH-

Gehaltes beschrieben (Do et al., 2000). Weiterhin wurde im frontalen Kortex von Schizophrenie-Patienten im Vergleich zu Kontrollen bei in vivo Beobachtungen mit Hilfe der protonen-magnetischen Resonanzspektroskopie eine 52-%ige Verminderung des GSH-Spiegels (Do et al., 2000) beobachtet. Da man davon ausgeht, dass durch ROS vermittelte pathologische Prozesse eine Rolle bei dem psychiatrischen Krankheitsbild der Schizophrenie spielen könnten (Lohr und Browning, 1995; Reddy und Yao, 1996), existieren verschiedene Studien zur Aktivität antioxidativ wirksamer Enzyme in der Peripherie bei Schizophrenie-Patienten (z. B. Herken et al., 2001).

In einem Tiermodell der humanen Trisomie 21 (Down-Syndrom), der Trisomie 16 bei der Maus, demonstrierten Stabel-Burow et al. (1997), dass kultivierte hippokampale Neurone von Trisomie 16-Mäusen einen herabgesetzten GSH-Spiegel und einen vermehrten Zelltod verglichen mit diploiden Zellen zeigen. Im Zusammenhang mit der Trisomie 21 ist nicht klar, ob der oxidative Stress durch eine vermehrte Produktion von ROS bedingt ist oder durch einen Defekt im Metabolismus bei der Entgiftung dieser ROS. Schuchmann et al. (2000) untersuchten mit Hilfe von mikrofluorimetrischen Techniken den Effekt des GSH-Spiegels auf das Überleben von Neuronen in diploiden und Trisomie 16 Kulturen. Die Resultate dieser Studie zeigen, dass eine erhöhte intrazelluläre GSH-Konzentration protektive Effekte im Falle des Down-Syndroms haben könnte. Brugge et al. untersuchten 1999 in einer Studie den Zusammenhang zwischen der Gedächtnisfunktion und der Aktivität von SOD, GPx und der Katalase in Erythrozyten von älteren erwachsenen Patienten mit Down-Syndrom. Die Aktivität der SOD und der GPx, aber nicht die der Katalase, waren in der Patientengruppe gegenüber der Kontrollgruppe signifikant erhöht.

Wallin et al. (2000) untersuchten zeitabhängig im Rahmen von Tierexperimenten die durch eine Ischämie verursachten Änderungen des totalen GSH-Spiegels und der GSSG-Konzentration in einer mit Mitochondrien angereicherten Fraktion und in

Gewebehomogenaten. Der Gehalt an totalem GSH fiel sofort nach der Ischämie in der mitochondrialen Fraktion vorübergehend signifikant ab, während dieser Effekt in den Gewebeproben nicht zu beobachten war. Zwischen einer und acht Stunden konnten keine signifikanten Unterschiede im Gehalt an totalem GSH festgestellt werden. Zwischen 14 und 72 Stunden war die Konzentration des totalen GSH sowohl in der mitochondrialen Fraktion wie auch in den Gewebeproben erniedrigt, wobei das Minimum nach 24 Stunden erreicht wurde. Die Resultate von Mizui et al. (1992) legen nahe, dass endogenes GSH im Gehirn ein wichtiger Bestandteil im Rahmen der Abwehrmechanismen gegen Läsionen nach einer Ischämie ist. Sie konnten in einem Rattenmodell zeigen, dass eine Verminderung des GSH-Gehalts im Gehirn, die durch BSO hervorgerufen wird, das Infarktgeschehen und das Ödem verstärkt. Weisbrodt-Lefkowitz et al. zeigten 1998 im Rahmen eines Tiermodells der fokalen zerebralen Ischämie in transgenen Mäusen, die verstärkt die intrazelluläre Form der GPx bilden, dass das Infarktvolumen um 48% und das Hirnödeme um 33% im Vergleich zu nicht transgenen Tieren verringert ist.

1.4. Pathophysiologie der Katalase bei neurodegenerativen Erkrankungen

Auch für das System der Katalase sind Untersuchungen an Gehirnen von neurodegenerativ Erkrankten und dann verstorbenen Patienten durchgeführt worden. Chen et al. (1994) fanden im Zusammenhang mit der Alzheimer'schen Erkrankung im Vergleich zu nicht von dementiellen Erkrankungen betroffenen Kontrollpersonen keinen signifikanten Unterschied in der Katalase-Aktivität. Lovell et al. (1995) zeigten eine signifikant erhöhte Aktivität im Hippokampus und den superioren und mittleren temporalen Gyri. Im Blut von Parkinson-Patienten wurde eine erhöhte Katalase-Aktivität detektiert (de la Torre et al., 1996).

1.5. Protektive Effekte von Steroidhormonen

Von Steroidhormonen, im Wesentlichen von 17β -Östradiol und von den synthetischen Glukokortikoiden Dexamethason und 6-Methylprednisolon (6-MP), sind Effekte auf neuronaler Ebene sowohl auf Zelllinien wie auch auf Primärkulturen beschrieben worden. Behl et al. (1995) demonstrierten, dass durch eine Vorinkubation mit 17β -Östradiol vor Zugabe der Neurotoxine Wasserstoffperoxid, Glutamat und Amyloid β Peptid bei hippocampalen HT22 Zellen die durch oxidativen Stress induzierten Schädigungen und der Zelltod verhindert werden. In einer weiteren Arbeit wiesen Behl et al. (1997b) nach, dass die neuroprotektive Aktivität von Östrogenen auf der Gegenwart der Hydroxylgruppe in der C3 Position des A-Rings des Steroidmoleküls beruht. Die Neuroprotektion durch Östrogene ist in diesem Fall ein Rezeptor-unabhängiger Vorgang, da das Stereoisomer des 17β -Östradiols, das 17α -Östradiol, das nicht in den Östrogenrezeptor passt, ebenfalls eine neuroprotektive Wirkung entfaltet. Dies konnte an Primärkulturen und an klonalen hippocampalen Zellen nachgewiesen werden (Behl et al., 1997b). Vedder et al. (1999) zeigten, dass 17β -Östradiol die LPO in Rattenhirnhomogenaten, in menschlichen Hirnhomogenaten, in hippocampalen HT22 Zellen und in neokortikalen Primärkulturen der Ratte herabsetzt. In einem Maus-Modell der fokalen zerebralen Ischämie konnte gezeigt werden, dass sowohl 17β -Östradiol als auch 2-Hydroxy-östradiol die Schädigungen des Hirngewebes nach einem permanenten Verschluss der mittleren zerebralen Arterie in männlichen Mäusen reduziert (Culmsee et al., 1999). In in vitro Versuchen wurde von derselben Gruppe demonstriert, dass die beiden Östrogene auch den Prozentsatz der durch Fe_2SO_4 geschädigten primären embryonalen Neurone beim Huhn herabsetzen. In diesen Neuronen fanden die Autoren außerdem nach Steroidbehandlung eine Absenkung der durch die Behandlung mit Fe_2SO_4 erhöhten Anzahl von freien Radikalen. In klonalen hippocampalen HT22 Zellen schützen Östrogene die Zellen nach Vorinkubation gegen die von Wasserstoffperoxid induzierte Toxizität (Vedder et al.,

2000). Diese Effekte konnten nicht nach Vorinkubation mit Progesteron, Dexamethason und 6-MP, einem synthetischen Steroid mit neuroprotektiver Wirkung im Rückenmark, erreicht werden. Sawada et al (1998) zeigten in primären neuronalen Kulturen des ventralen Mesenzephalons der Ratte, dass Vorinkubation mit 17β -Östradiol zu einer signifikanten Neuroprotektion gegen die durch Glutamat induzierte Neurotoxizität führt. Singer et al. (1996) demonstrierten, dass 17β -Östradiol primäre kortikale Neurone vor der Toxizität des exzitatorischen Neurotransmitters Glutamat schützen kann.

Auch im Zusammenhang mit der zerebralen Ischämie sind protektive Effekte von Östrogenen sowie von Gestagenen bekannt. Besonders hervorzuheben ist die Arbeit von Yang et al. (2000). Hier wurden die neuroprotektiven Effekte von 17β -Östradiol nach dem ischämischen Anfall in einem Modell der fokalen zerebralen Ischämie der weiblichen Ratte beschrieben. Vorher waren neuroprotektive Effekte von Östrogenen sowohl bei weiblichen wie auch bei männlichen Ratten im Tiermodell der zerebralen Ischämie beschrieben worden. In allen Fällen aber erfolgte die Behandlung mit Östrogenen vor dem ischämischen Anfall. Rusa et al. (1999) zeigten, dass 17β -Östradiol in weiblichen Ratten nach Entfernung der Eierstöcke in einer Langzeitbehandlung im Bereich von niederen physiologischen Konzentrationen die durch eine ischämische Hirnverletzung hervorgerufenen Schäden verringert. Toung et al. (1998) demonstrierten, dass akute und chronische 17β -Östradiol-Behandlung im experimentellen Tiermodell eines Verschlusses der mittleren zerebralen Arterie der männlichen Ratte protektive Wirkung hat. Das Vorhandensein von Testosteron beeinflusst nicht die durch 17β -Östradiol vermittelte Schadensminderung nach einem Verschluss der mittleren zerebralen Arterie in männlichen Ratten. Kontrovers wird in diesem Zusammenhang die Frage diskutiert, ob und inwieweit Geschlechtsunterschiede bei der Anfälligkeit für eine zerebrale Ischämie vorliegen. Zhang et al. (1998) beschäftigten sich mit dieser Fragestellung in einer Versuchsreihe mit männlichen und weiblichen Tieren und

untersuchten außerdem, ob zirkulierende Östrogene protektive Effekte nach einer durch einen Verschluss der mittleren zerebralen Arterie verursachten fokalen Ischämie ausüben können. Bei der Untersuchung der geschlechts-abhängigen Schädigung durch eine solche Ischämie ergaben sich folgende Ergebnisse. Das Infarktvolumen in männlichen und ovariectomierten weiblichen Ratten war im Vergleich zu dem bei intakten weiblichen Ratten signifikant erhöht. Weiterhin wurde der Effekt einer Hormonersatztherapie untersucht. Dabei wurde beobachtet, dass sich dann auch das Infarktvolumen bei ovariectomierten Ratten signifikant verkleinerte. Auch Alkayed et al. (1998) wiesen bei weiblichen Ratten ein kleineres Infarktareal nach. Vergouwen et al. (2000) untersuchten in einem Tiermodell der zerebralen Ischämie 201 Tiere auf Geschlechtsunterschiede im Infarktvolumen und die Wirkung von Östrogenen. Darunter waren intakte Männchen, intakte Weibchen und ovariectomierte Weibchen. Sie fanden keine Geschlechtsunterschiede im Bereich des Infarktvolumens. Außerdem führte in dieser Studie weder die Infusion von niedrigen noch die von hohen Östrogendosen zu einer Veränderung des Infarktvolumens. Murphy et al. (2000) zeigten, dass Progesteron im Fall eines Verschlusses der mittleren zerebralen Arterie bei weiblichen Ratten, denen kurz zuvor das Ovar entfernt wurde, nicht die Gewebeverletzungen verbessert, sondern dass eine chronische Behandlung mit diesem Steroid in subkortikalen Regionen den Infarkt verstärkt. Auch vom Progesteron sind aber in diesem Zusammenhang neuroprotektive Effekte beschrieben. So demonstrierten zum Beispiel Jiang et al. (1996) und Chen et al. (1999) derartige Effekte. Schon 1993 hatten Roof et al. zeigen können, dass nach einer Progesterongabe die Größe des zerebralen Ödems nach einer Quetschung bei weiblichen Ratten im Vergleich zu männlichen Tieren einen signifikant niedrigeren Umfang hat. Weitere Studien dieser Arbeitsgruppe an ovariectomierten Ratten mit und ohne Progesteron-Behandlung zeigten, dass die Reduktion des Ödems mit der Präsenz von zirkulierendem Progesteron assoziiert ist. Es scheint so, dass die protektive Wirkung der Östrogene wie die der Gestagene vom Geschlecht abhängig ist. Auch für die bei der ALS selektiv betroffenen spinalen Motorneurone ist inzwischen eine

Neuroprotektion durch Östrogene nachgewiesen worden. Nakamizo et al., (2000) zeigten, dass 17β -Östradiol und das biologisch inaktive Stereoisomer 17α -Östradiol in primären Neuronenkulturen des Rattenrückenmarks den durch Glutamat induzierten Zelltod verhindert.

Wie von den Östrogenen sind, allerdings in geringerem Umfang, auch von androgenen Steroiden neuroprotektive Effekte bekannt. Einige in vivo Studien haben gezeigt, dass Androgene bestimmte Populationen von Motorneuronen vor dem ontogenetisch (Nordeen et al., 1985) und durch Axotomie induzierten Zelltod retten können (Kujawa et al., 1989; Kujawa et al., 1995; Perez et al., 1996). Außerdem ist bekannt, dass Testosteron bei Glukose-Mangel auf hippokampale Neurone protektiv wirkt (Goodman et al., 1996). In einer ersten Studie untersuchten Ahlbom et al. (1999) die Effekte von Testosteron auf die Anfälligkeit zerebellärer granulärer Zellen gegenüber Stimuli, die den apoptotischen Zelltod induzieren können. Die Behandlung von neonatalen Ratten mit Androgenen senkt die Empfindlichkeit der später kultivierten Zellen gegenüber oxidativen Einflüssen durch Hochregulation der Aktivität von antioxidativ wirksamen Enzymen wie der Katalase und der SOD. Diese protektiven Effekte werden jedoch in vitro viele Tage nach der in vivo Administration beobachtet. Dies spricht für einen lang andauernden Effekt des Testosterons entweder direkt auf die zerebellären granulären Neurone oder auf einen anderen Zelltyp, der diese Neurone beeinflussen kann. In einer weiteren Arbeit konnten Ahlbom et al. (2001) zeigen, dass Testosteron zerebelläre granuläre Zellen vor dem durch oxidativen Stress induzierten Zelltod durch einen rezeptorvermittelten Mechanismus schützen kann. Mit Testosteron behandelte zerebelläre granuläre Neurone erwiesen sich als weniger empfindlich gegen durch Wasserstoffperoxid induzierte Schäden. Die Anzahl der Zellen mit einer apoptotischen Morphologie nahm um 30% ab. Die Zugabe eines Antagonisten für Androgen-Rezeptoren (Flutamid) hob den protektiven Effekt von Testosteron auf. Im Gegensatz zu den oben geschilderten Ergebnissen steht die Studie von Hawk et al. (1998). Sie untersuchten die Effekte von Östrogen und Testosteron auf eine zerebrale Ischämie, die durch eine Läsion in

der mittleren zerebralen Arterie induziert wurde. Das Vorhandensein von Testosteron erhöhte die Größe der Läsion, während diese durch die Entfernung von Testosteron reduziert wurde. Gouras et al. (2000) berichten, dass eine Behandlung mit Testosteron (200 nM) die Sekretion von A β -Peptid durch N2a Zellen und Primärkulturen zerebrokortikaler Neurone der Ratte herabsetzt. Diese Resultate legen nach Meinung der Autoren die Möglichkeit nahe, dass eine Therapie mit Testosteron bei älteren Männern eine protektive Funktion in der Behandlung der Alzheimer'schen Erkrankung haben könnte. Auch Pike (2001) vertritt die Meinung, dass eine Androgensersatz-Therapie im Rahmen der Prävention und der Behandlung von neurodegenerativen Alterserkrankungen von Nutzen sein kann. Er untersuchte, ob Testosteron und verwandte androgene Komponenten kultivierte hippocampale Zellen vor dem durch β -Amyloid induzierten Zelltod können. Er konnte zeigen, dass eine signifikante Neuroprotektion bei einer Testosteron-Konzentration von 1 nM auftrat, die bei 10-100 nM ein Plateau erreichte.

Im Zusammenhang mit dem synthetischen Glukokortikoid Dexamethason sind unterschiedliche Erkenntnisse beschrieben. Tuor et al. (1993a) berichten, dass eine Vorbehandlung mit Dexamethason das Gehirn neonataler Ratten vor den mit einer zerebralen Ischämie verbundenen Schädigungen schützen kann. Dieser protektive Effekt wird durch den Glukokortikoid-Antagonisten RU38486 gehemmt. Dies demonstriert, dass es sich bei der Neuroprotektion durch Dexamethason hier um einen rezeptorgesteuerten Vorgang handelt (Tuor und Del Bigio, 1996). Bertorelli et al. (1998) untersuchten das Infarktvolumen nach einer fokalen zerebralen Ischämie im Gehirn der Ratte mit und ohne Dexamethason-Behandlung. Nach Applikation einer hohen Dexamethason-Dosis (3 mg/kg i. p.) fanden sie ein um 50% reduziertes Infarktvolumen. Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen zeigten Behl et al. (1997a), dass Dexamethason und auch das physiologische Glukokortikoid Kortikosteron den durch oxidativen Stress, hervorgerufen durch A β und Glutamat, bedingten Zelltod in

hippokampalen HT22 Zellen verstärken kann. Morita et al. (1999) demonstrierten, dass Dexamethason den durch Serumdeprivation verursachten nekrotischen Zelltod in C₆-Zellen verstärken kann.

Für das synthetische Glukokortikoid 6-MP sind seit Langem protektive Wirkungen im Zusammenhang mit Hirn- und Rückenmarksverletzungen bekannt (Hall, 1992). MP-Präparate sind in diesen Fällen im klinischen Einsatz. In mehreren Studien wie zum Beispiel der doppelblinden randomisierten klinischen Studie an Patienten mit Rückenmarksverletzungen (Bracken et al., 1997) wurden positive Effekte einer Verabreichung von 6-MP nachgewiesen.

1.6. Einflüsse von Steroiden auf das antioxidative System in peripheren und neuronalen Systemen

Über periphere Organe und Zellkulturen peripherer Organzellen existieren eine Vielzahl von Erkenntnissen über die Einflüsse von Glukokortikoiden und gonadalen Steroiden auf antioxidativ wirksame Substanzen und Enzymsysteme. Kawamura et al. (1991) untersuchten die Effekte von Glukokortikoiden auf die Aktivität der GPx und der Katalase in Nierenglomeruli von Ratten. Mehrere Arbeiten beschäftigen sich mit Effekten von Glukokortikoiden auf die Aktivität der SOD, der GPx und der Katalase (Hicks et al., 1997; Asayama et al., 1992) in der Lunge von Ratten. Rajashree et al. (1998) stellten ähnliche Untersuchungen am Herz und in der Niere an, während Pereira et al. (1999) die Wirkung von Glukokortikoiden in Lymphknoten, Thymus, Milz und Muskel untersuchten. Schon 1995 hatten sie Untersuchungen über die hormonelle Regulation der SOD, der Katalase und der GPx-Peroxidase in Makrophagen von Ratten durchgeführt. Rahman et al. (1998) untersuchten die Regulation des GSH-Gehalts in alveolaren Epithelzellen der Ratte. Im Zusammenhang mit gonadalen Steroiden sind bisher im wesentlichen Effekte von 17 β -Östradiol bekannt. Kim et al. (1998) stellten Untersuchungen über Effekte auf den GSH-Spiegel im Hundeherzen an.

Suojanen et al. (1980) beschäftigten sich mit den Auswirkungen von 17β -Östradiol auf den GSH-Gehalt im Uterus der Ratte. Dabrosin et al. (1998) untersuchten die Wirkung von Östradiol und Progesteron auf den GSH-Gehalt sowie auf die Aktivitäten der GPx, der GR und der Katalase in humanen Brustepithelzellen.

In neuronalen Zellsystemen hingegen existieren in diesem Zusammenhang bislang nur relativ wenige Untersuchungen. McIntosh et al. (1998) untersuchten die Auswirkungen von Glukokortikoiden auf antioxidativ wirksame Enzyme, unter anderem der GPx und der Katalase. Ahlbom et al. (2000) konnten zeigen, dass eine pränatale Behandlung mit hohen Dexamethason-Dosen die postnatale Katalase-Aktivität in unterschiedlichen Hirnarealen auf verschiedene Weise beeinflusst. Patel et al. (2002) demonstrierten die Effekte von Kortikosteron auf den GSH-Stoffwechsel in hippokampalen Primärkulturen der Ratte. Brooke et al. (2002) untersuchten in kortikalen Primärkulturen der Ratte Effekte von Kortikosteron und Östradiol auf die Aktivitäten der GPx und der Katalase. Atroshi et al. (1990) bestimmten den GSH-Gehalt im Gesamthirnhomogenat der Ratte nach Testosterongabe. Pajovic et al. (1999) untersuchten die Effekte von Progesteron- und Östradiolbenzoat auf von GSH abhängige Enzyme im Gehirn von weiblichen Ratten. Ahlbom et al. (1999) konnten nachweisen, dass eine Injektion mit Testosteronpropionat am 3. postnatalen Tag zu einem signifikanten Anstieg der Katalase-Aktivität in zerebellären granulären Neuronen der Ratte führt. Sowohl auf die Aktivität der GPx-Peroxidase wie auch auf den GSH-Spiegel konnten in dieser Untersuchung keine Effekte nachgewiesen werden. Cvijic et al. (1955) zeigten, dass eine Behandlung mit Dexamethason zu einem signifikanten Abfall der Katalase-Aktivität im Hypothalamus führt. Öge et al. (2003) konnten keine signifikanten Effekte von Östradiol auf die Aktivitäten von SOD und Katalase im Kortex von Ratten nach einer Ovariectomie zeigen.

In peripheren Organsystemen sind also eine ganze Reihe von Steroideffekten auf antioxidativ wirksame Systeme bekannt. Außerdem geht man wie schon erwähnt davon aus,

dass bei vielen Erkrankungen des zentralen Nervensystems derartige Systeme betroffen sind. Von Steroidhormonen sind eine Reihe von protektiven Effekten in diesem Zusammenhang bekannt. Es ist also von großem Interesse zu untersuchen, auf welchen molekularen Mechanismen diese protektiven Effekte beruhen. Ein Teilaspekt könnte hierbei nach den Ergebnissen in der Peripherie zu urteilen die Beeinflussung des GSH-Stoffwechsels und der Aktivität antioxidativ wirksamer Enzyme sein.

1.7. Einflüsse von Interleukinen auf den Stoffwechsel von Glutathion

Wie von Steroidhormonen so sind auch von verschiedenen Interleukinen (IL) Effekte auf den Glutathion-Spiegel in peripheren Organsystemen bekannt. Behandlung mit IL-1 β senkt den Glutathion-Gehalt in humanen peritonealen mesothelialen Zellen in vitro (Grzybowski, 2000). IL-2 erhöht den intrazellulären Glutathion-Spiegel in Lymphozyten (Aidoo et al., 1991) und in B16 Melanomzellen (Palomares et al., 1997). IL-4 bewirkt dasselbe in B Zellen (Lemaire et al., 1999). Von dem in den eigenen Untersuchungen verwendeten IL-6 ist bekannt, dass die Behandlung mit IL-6 abnormal hohe Glutathion-Spiegel in Leber- und Muskelgewebe der Maus hervorruft (Hack et al., 1997). In der Leber wird ein deutlicher Anstieg der Aktivität der γ -GCS, dem Schrittmacherenzym der GSH-Synthese, beobachtet. In neuronalen Zellsystemen sind bisher keine Effekte von IL-6 auf den GSH-Gehalt bekannt.

1.8. Physiologie und Pathophysiologie von Interleukin-6 im zentralen Nervensystem

Funktionen von IL-6 im Nervensystem sind die Förderung des neuronalen Überlebens (Hama et al., 1989; Kushima und Hatanaka, 1992), Protektion gegen neuronale Schädigungen

(z. B. Akaneya et al., 1995; Yamada und Hatanaka, 1994), Induktion der neuronalen Differenzierung (z. B. März et al., 1997), Verstärkung der intrazellulären Ca^{2+} -Antwort (z. B. Qui et al., 1995), Modulation der Biosynthese von Neurotransmittern (Fahn und Patterson, 1994), Stimulierung der Astrozyten-Proliferation (z. B. Fattori et al., 1995), Stimulierung der HPA-Achse und Induktion von Fieber (z. B. Rothwell et al., 1991; Schöbitz et al., 1994) sowie die Modulation von Schmerz (De Leo et al., 1996; Oka et al., 1995). Im zentralen Nervensystem ist IL-6, ähnlich wie bei den Steroiden das Dexamethason, als ein Molekül mit sowohl konstruktivem wie auch destruktivem Potential bekannt (Gradient und Otten, 1997). Es sind sowohl neuroprotektive wie auch neurotoxische Wirkungen von IL-6 beschrieben worden. So schützt IL-6 hippocampale Neurone gegen den durch Glutamat induzierten Zelltod (Yamada und Hatanaka, 1994). Akaneya et al. (1995) demonstrierten die protektive Wirkung von IL-6 gegen das 1-Methyl-4-phenylpyridiniumion in fetalen dopaminergen Neuronen der Ratte. Laut Kushima et al. (1992) fördert IL-6 das Überleben von katecholaminergen, von fetalen und postnatalen Neuronen des Mittelhirns der Ratte. Weiterhin sind schützende Effekte zum Beispiel für cholinerge Neuronenkulturen (Hama et al., 1989) und für mesenzephalen katecholaminergen und septalen cholinergen Neuronen beschrieben (Hama et al., 1991). Im Zusammenhang mit neurotoxischen Effekten von IL-6 fanden Ma und Zhu (2000) eine signifikant erniedrigte Überlebensrate von primären hippocampalen Neuronen nach Behandlung mit diesem Interleukin. Qui et al. (1998) dokumentierten, dass eine chronische Behandlung mit IL-6 von sich in der Entwicklung befindlichen zerebellären granulären Neuronen die Reaktion auf n-Methyl-d-Aspartat verstärkt.

1.9. Zielsetzung

Das antioxidativ wirksame System des zentralen Nervensystems ist im Rahmen einer Vielzahl von neurologischen und psychiatrischen Erkrankungen und von Rückenmarksverletzungen sowie im Verlauf des normalen Alterns Veränderungen unterworfen. Aufgrund der aus der Peripherie vorliegenden Ergebnisse über die Beeinflussung dieser Systeme mit Steroidhormonen und Interleukinen und den bisherigen Studien im Zusammenhang mit der Neuroprotektion durch Steroide und Interleukine und mit der Hormonersatztherapie ist von großem Interesse zu ermitteln, inwieweit man mit Steroiden und Interleukinen diese Systeme pharmakologisch beeinflussen kann. Diese Erkenntnisse können dann eventuell in der Therapie verschiedener neurodegenerativer Erkrankungen angewendet werden.

Der Hippokampus ist ein wichtiges Hirnareal und im Rahmen seiner Funktionen unter anderem an der Entwicklung des Gedächtnisses und an der neuroendokrinen Regulation beteiligt. Es ist bekannt, dass er unter verschiedenen pathophysiologischen Bedingungen wie Ischämie, Schlaganfall und metabolischen Insulten geschädigt wird (Behl et al., 1997a; McIntosh und Sapolsky, 1996; Sapolsky und Pulsinelli, 1985; Sapolsky et al., 1988). Deshalb beschäftigt sich diese Arbeit im Bereich der Neurone mit Ausnahme der neokortikalen Primärkulturen mit hippocampalen Zellsystemen. Es handelt sich hierbei um die von der Maus stammende hippocampale HT22 Zelllinie und hippocampale Primärkulturen der Ratte. Darüber hinaus wurden zum Vergleich von neuronalen Zellen mit glialen Zellen Versuche mit der von der Ratte stammenden C₆ Gliomazelllinie durchgeführt. Aufgrund der Tatsachen, dass Astrogliazellen in Kokultur mit Neuronen in der Lage sind, diese gegen toxische Insulte zu schützen und hierbei, wie oben geschildert, das GSH-System eine entscheidende Rolle spielt, kommt diesem Vergleich eine große Bedeutung zu.

2. Materialien

2.1. Geräte

- Kühlzentrifuge Z233 MK-2 (Hermle, Gosheim, Deutschland)
- Microplate Reader (Dynex, Denkendorf, Deutschland)
- Mikrotiterplatten (96 Well) (Greiner, Frickenhausen, Deutschland)
- SigmaStat (Jandel Scientific, Kerpenich, Deutschland)
- 24-Well-Platten (Nunc, Wiesbaden, Deutschland)
- Zellkulturflaschen (Greiner, Frickenhausen, Deutschland)

2.2 Chemikalien

- Antibiotisch-antimykotische Lösung (Seromed Berlin, Deutschland)
- 5,5'-Dithio-Bis-2-Nitrobenzoesäure (Sigma, Deisenhofen, Deutschland)
- Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Gibco, Eggenstein, Deutschland)
- Ethanol (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- EZ4U-Essay (Biozol, Eching, Deutschland)
- Fetales Kälberserum (Seromed, Berlin, Deutschland)
- Glutathion (Sigma, Deisenhofen, Deutschland)
- Glutathion-Reduktase (Sigma, Deisenhofen, Deutschland)
- Kaliumperjodat (Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)
- IL-6 (Endogen, Woburn, USA)

- Interleukin-Antikörper (Biotrend, Köln, Deutschland)
- KH_2PO_4 (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- KOH (Baker, Deventer, Niederlande)
- Methanol (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- NADPH (Sigma, Deisenhofen, Deutschland)
- Natriumpyruvat (Seromed, Berlin, Deutschland)
- Neurofilament (Klon 2F11, Dako, Hamburg, Deutschland)
- Protein-Essay (Biorad, München, Deutschland)
- Purpald (Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)
- Start V Medium (Seromed, Berlin, Deutschland)
- Steroide (Sigma, Deisenhofen, Deutschland)
- Sulfosalizylsäure (Sigma, Deisenhofen, Deutschland)
- Triton (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- Wasserstoffperoxid (Merck, Darmstadt, Deutschland)

3. Methoden

3.1. Zellkulturen

3.1.1. HT22 und C₆ Zellen

Die HT22 Zelllinie, ein Subklon des originalen HT4 Klons bestehend aus immortalisierten Hippokampuszellen der Maus, die von Davis und Maher (1994) charakterisiert wurden und die glialen C₆ Zellen der Ratte wurden für die Versuche zur Bestimmung des Glutathion-Gehaltes in 24-Well-Platten in 500 µl DMEM ergänzt mit 10% fetalem Kälberserum, 2% Natriumpyruvat und 1% antibiotisch-antimykotischer Lösung kultiviert. Für die Messung der Katalase-Aktivität und die Neuroprotektions-Versuche wurden beide Zellarten in 96-Well-Platten in 100 µl DMEM ergänzt mit 10% fetalem Kälberserum und 2% Natriumpyruvat und 1% antibiotisch-antimykotischer Lösung kultiviert. Die Zellen wurden bei einer Temperatur von 37°C, einem CO₂-Gehalt von 5% und einer Luftfeuchtigkeit von 95-100% kultiviert.

3.1.2. Primärkulturen

Die Feten (Embryonaltag 18) wurden den mit Äther getöteten Ratten entnommen. Neokortikale und hippokampale Regionen wurden dann unter sterilen Bedingungen präpariert und auf Eis in Präparationsmedium (DMEM/25 mM HEPES) aufbewahrt. Die Dissoziation des Gewebes wurde durch eine mechanische Trituration in demselben Medium erreicht. Danach wurden die Suspension zentrifugiert und die Zellen in DMEM, das mit Antibiotika (antibiotisch/antimykotische Lösung: 10.000 U Penicillin, 10.000 µg Streptomycin, 25 µg Amphotericin/ml Kochsalzlösung), 1 mM Pyruvat und 10% hitzeinaktiviertem fetalem Kälberserum ergänzt wurde, resuspendiert und mit einer Dichte von 1.75×10^5 Zellen/Well ausgesät. Um die Adhärenz der Zellen zu unterstützen, wurden die Platten mit Poly-D-Lysin

(0.1 mg/ml bidestilliertes Wasser) vorbehandelt. Die Kulturen wurden zweimal in der Woche mit START V Medium gefüttert und ebenfalls bei einer Temperatur von 37°C, einem CO₂-Gehalt von 5% und einer Luftfeuchtigkeit von 95-100% kultiviert. Das START V Medium ist ein synthetisches Medium, das kein fetales Kälberserum enthält, und dadurch das Wachstum von nicht-neuronalen Zellen unterdrückt. Es konnte gezeigt werden, dass über 90% der kultivierten Zellen eine positive Färbung für Neurofilament aufweisen (Klon 2F11, Dako, Hamburg, Deutschland), einem spezifischen Marker für neuronale Zellen. Nach 7 bis 9 Tagen wurden die Zellen für Versuche verwendet. Die Steroide wurden in 10⁻² M Äthanol gelöst und in Kulturmedium (10⁻⁴ M und 10⁻⁶ M) weiter verdünnt. Das IL-6 wurde in PBS pH 7.4 gelöst. Zu den Kontrollen wurde jeweils dieselbe Menge Äthanol bzw. Dimethylsulfoxid (Versuche mit Steroiden) oder PBS-Puffer pH 7.4 (Versuche mit IL-6) dazugegeben.

3.2 Messung des Glutathion-Gehaltes

Die Bestimmung des Glutathion-Gehaltes erfolgte nach der von Anderson (1985) geschilderten Methode. Es handelt sich hierbei um einen Recycling-Assay für das gesamte Glutathion (Glutathion und Glutathiondisulfid in Glutathion Äquivalenten). Dabei wird Glutathion (GSH) zunächst durch 5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoesäure) (DTNB) zu Glutathiondisulfid (GSSG) mit stöchiometrischer Formation von 5-Thio-2-nitrobenzoesäure (TNB) oxidiert (1). In der von der Glutathion-Reduktase katalysierten Reaktion wird Glutathiondisulfid mit Hilfe von NADPH zu Glutathion reduziert (2). Die Rate der TNB-Bildung wird bei 405 nm verfolgt. Sie ist proportional zur Summe des vorliegenden GSH und GSSG. Die HT22 und C₆ Zellen wurden in 24-Well-Platten ausgesät und der Versuch bei einer Zellzahl von 320.000 Zellen pro Well durchgeführt. Die Messung erfolgte wie im Falle der weiteren aufgeführten Methoden in einem Microplate Reader (Dynex, Denkendorf, Deutschland).



Die Versuche wurden nach folgendem Schema durchgeführt:

⇒ Abnehmen des Mediums

⇒ 100 µl Puffer (9 ml PBS, pH 7.4 + 1 ml 5%ige Sulfosalizylsäure) pro Well

⇒ Lysieren mit Pipettenspitze

⇒ Poolen von jeweils 3 Wells (bei kortikalen Primärkulturen 6 Wells) und einfrieren der Proben bei -80°C

⇒ Proben 5 Minuten bei 13.000 rpm zentrifugieren (Kühlzentrifuge)

Pipettierschema:

⇒ 140 µl Daily-Puffer (NADPH, wurde täglich frisch angesetzt): 22.4 ml (PBS, pH 7.4) auf 5 mg NADPH

⇒ 20 µl 6mM DTNB-Lösung: in Stock-Puffer: EDTA, NaH₂PO₄ und Na₂HPO₄

⇒ 30 µl Standard oder Probe

⇒ 15 min bei Raumtemperatur inkubieren

⇒ 10 µl GSSG-Reduktase

⇒ Messung bei 405 nm

3.3. Messung der Katalase-Aktivität

Die Bestimmung der Katalase-Aktivität wurde nach der von Johansson und Borg (1988) beschriebenen Methode durchgeführt. Sie beruht auf der Tatsache, dass das Enzym in der Lage ist, Wasserstoffperoxid im Rahmen von zwei verschiedenen Reaktionstypen umzusetzen. Beiden Mechanismen ist gemeinsam, dass als erster Schritt ein Intermediat der Katalase mit einem Molekül Wasserstoffperoxid gebildet wird. In der normalen physiologischen Katalyse findet dann die Reaktion mit einem weiteren Molekül Wasserstoffperoxid und damit die Umsetzung zu Wasser statt. Das Intermediat von Katalase und Wasserstoffperoxid kann aber auch mit anderen Wasserstoff-Donatoren im Rahmen der peroxidativen Aktivität reagieren. So werden niedrige Alkohole wie Methanol und Ethanol zu den entsprechenden Aldehyden umgewandelt. Im Rahmen dieser Methode wird Methanol als Wasserstoff-Donator genutzt und spektrophotometrisch die Produktion von Formaldehyd mit 4-Amino-3-hydrazino-5-mercapto-1,2,4-triazol (Purpald) als Chromogen gemessen. Diese Substanz bildet mit Aldehyden einen bityklischen Heterozyklus. Um eine gefärbte Verbindung zu erzielen, wird dieses Reaktionsprodukt mit Kaliumperjodat oxidiert. Die photometrische Messung findet bei einer Wellenlänge von 550 nm statt. Die Zellen wurden in 96-Well-Platten ausgesät und der Versuch bei einer Zellzahl von 8000 Zellen pro Well nach folgendem Schema durchgeführt.

⇒ Absaugen des Überstandes

⇒ 50 µl 0.1 M TRIS (0.1 % Triton)

⇒ 10 Minuten schütteln bei Raumtemperatur

⇒ 25 µl KH_2PO_4 -Puffer (250 mM, pH 7.0)

⇒ 25 µl Methanol (100%ig)

- ⇒ 5 µl H₂O₂ (0.27%ig)
- ⇒ 50 µl Standard bzw. Probe
- ⇒ 20 Minuten schütteln bei Raumtemperatur
- ⇒ 25 µl KOH (7.8 M)
- ⇒ 50 µl Purpald (34.2 mM) in 480 mM HCl
- ⇒ 10 Minuten schütteln bei Raumtemperatur
- ⇒ 25 µl KJO₄ (65.2 mM in 480 mM HCl)
- ⇒ Messung bei 550 nm

3.4. Messung des Proteingehalts

Die Bestimmung des Proteingehalts wurde wie bei Lowry et al. (1951) beschrieben, unter Benutzung des BioRad Kit (BioRad, München, Deutschland) mit bovinem Serumalbumin als Standard durchgeführt. Die Messung erfolgte bei 620 nm.

3.5. Quantifizierung des Zellüberlebens

Die Versuche wurden mit einem modifiziertem MTT [3-(4, 5-dimethyl-tetrazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromid]-Essay (EZ4U, Biozol, Eching, Deutschland) durchgeführt. Die Zellen wurden nach Ende der Behandlung mit Steroiden 3,5 Std. mit dem Reagenz inkubiert. Danach erfolgte die Messung bei 490 nm.

3.6. Statistische Analyse der Daten

Es wurden jeweils Daten von mindestens 3 unabhängigen Experimenten gepoolt. Die Daten wurden mit Hilfe der One-Way Analysis of Variance (ANOVA) und einem nachfolgenden Mann-Whitney Rank Sum-test analysiert und als Mittelwerte \pm SEM Werte dargestellt. $P < 0.05$ (*) und $p < 0.01$ (**) wurden als statistisch signifikante Unterschiede akzeptiert. Für die statistischen Auswertungen wurde SigmaStat verwendet.

4. Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, inwieweit Glukokortikoide, gonadale Steroide und Interleukine den Spiegel antioxidativ wirksamer Substanzen und die Aktivität von entsprechenden Enzymen in neuronalen (hippokampale HT22 Zellen, hippokampale und neokortikale Primärkulturen) und glialen (C₆ Zellen) Zellsystemen beeinflussen können.

4.1. Effekte von Glukokortikoiden auf den GSH-Spiegel in HT22 Zellen

Abbildung 3 demonstriert die Effekte der Glukortikoide Kortikosteron, Dexamethason und 6-MP in einer Konzentration von 10^{-7} M auf den GSH-Gehalt in hippokampalen HT22 Zellen. Nach einer Behandlung mit Kortikosteron für 1 Std. ($93\% \pm 9\%$), für 3 Std. ($100\% \pm 6\%$) und für 24 Std. ($99\% \pm 8\%$) wurden keine Veränderungen des GSH-Spiegels festgestellt. Eine Inkubation mit dem synthetischen Glukokortikoid Dexamethason ließ sowohl Kurzzeiteffekte [1 Std. ($107\% \pm 11\%$) und 3 Std. ($118\% \pm 6\%$, $p < 0.05$)] als auch Langzeiteffekte (24 Std. ($122\% \pm 5\%$, $p < 0.05$)) erkennen. Eine Kurzzeitbehandlung mit dem zweiten synthetischen Glukokortikoid 6-MP führte nach 1 Std. zu einem signifikanten Anstieg des GSH-Gehalts ($135\% \pm 12\%$, $p < 0.05$) und nach 3 Std. zu einer geringfügigen Absenkung ($96\% \pm 6\%$) des GSH-Spiegels. Verglichen mit allen anderen Behandlungsarten kam es nach einer Inkubation mit 6-MP für 24 Std. zum größten Anstieg des GSH-Gehalts in HT22 Zellen ($208\% \pm 32\%$, $p < 0.01$). Nach einer Behandlung mit BSO in einem Konzentrationsbereich von 100-500 μM konnte dieser Effekt nicht mehr nachgewiesen werden (Daten nicht im Bild gezeigt). BSO hemmt irreversibel das Schrittmacherenzym der GSH-Synthese, die γ -GCS.

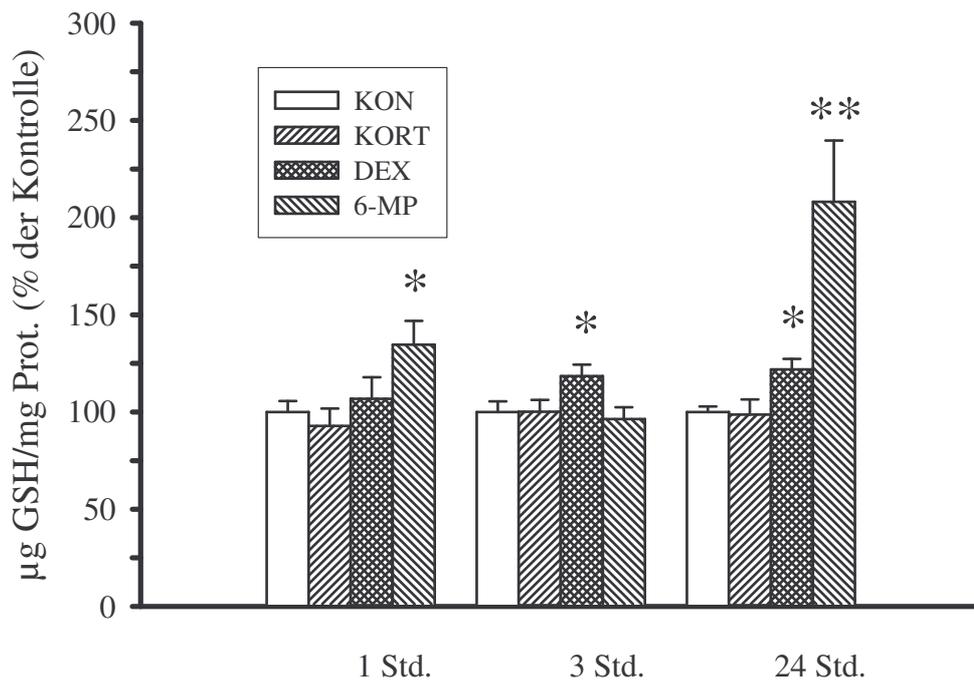


Abbildung 3: Effekte von Glukokortikoiden auf den GSH-Spiegel in HT22 Zellen

4.2. Effekte von Dexamethason (10^{-6} M) auf den GSH-Spiegel in HT22 Zellen

Der Einfluss von 10^{-6} M Dexamethason auf den GSH-Spiegel in HT22 Zellen nach 1, 4, 12, 14, 24 und 36 Std. wurde untersucht. Wie in Abbildung 4 dargestellt kam es zu allen Zeitpunkten zu einer Erhöhung des GSH-Gehalts der Zellen. Signifikante Veränderungen traten nach 1 ($152\% \pm 20\%$, $p < 0.05$), nach 4 ($129\% \pm 10\%$, $p < 0.05$), nach 12 ($145\% \pm 16\%$, $p < 0.05$), nach 14 ($155\% \pm 8\%$, $p < 0.01$) und nach 24 Std. ($144\% \pm 10\%$, $p < 0.01$) auf. Der Anstieg des GSH-Spiegels nach 36 Std. ($115\% \pm 13\%$) erreichte kein Signifikanzniveau.

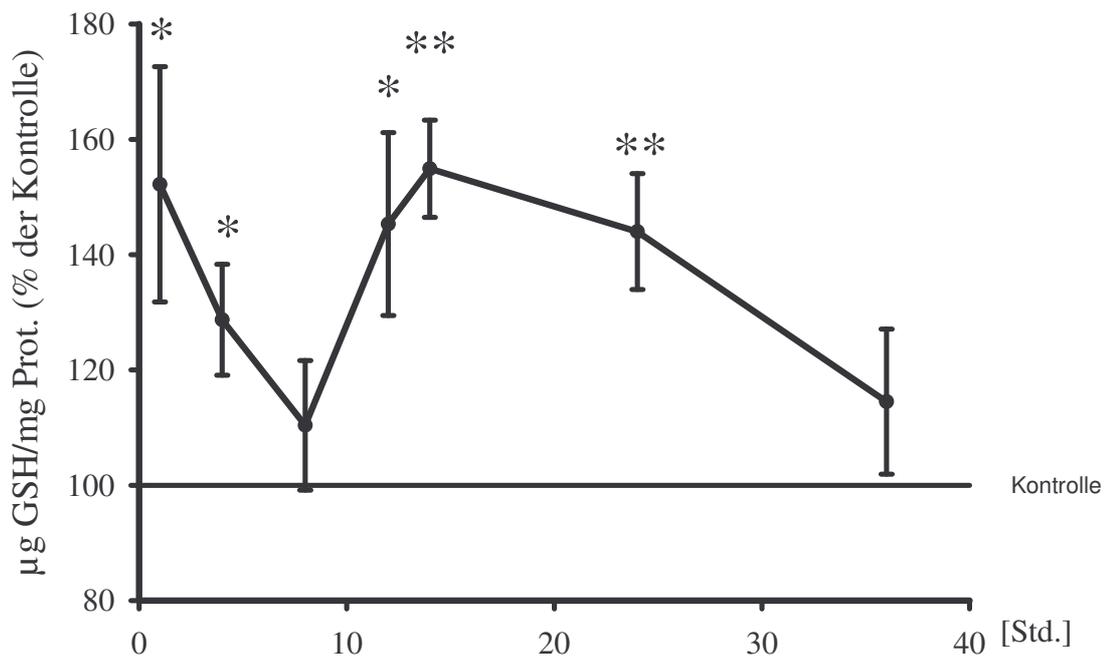


Abbildung 4: Effekte von Dexamethason (10^{-6} M) auf den Glutathion-Gehalt in HT22 Zellen

4.3. Effekte von Dexamethason (10^{-7} M) auf den GSH-Spiegel in HT22 Zellen

Abbildung 5 zeigt, dass nach einer Inkubation mit 10^{-7} M Dexamethason nach 12 (154% \pm 13%, $p < 0.01$), nach 14 Std. (171% \pm 25%, $p < 0.05$) und nach 24 Std. (122% \pm 5%, $p < 0.05$) ein signifikanter Anstieg des GSH-Gehalts beobachtet werden konnte. Wie auch bei einer Dexamethason-Konzentration von 10^{-6} M kam es im Falle von allen untersuchten Zeiträumen zu einer Steigerung des GSH-Spiegels, die jedoch nach 1 (107% \pm 11%), nach 4 (105% \pm 11%), nach 8 (108% \pm 12%) und nach 36 Std. (107% \pm 11%) das signifikante Niveau verfehlten.

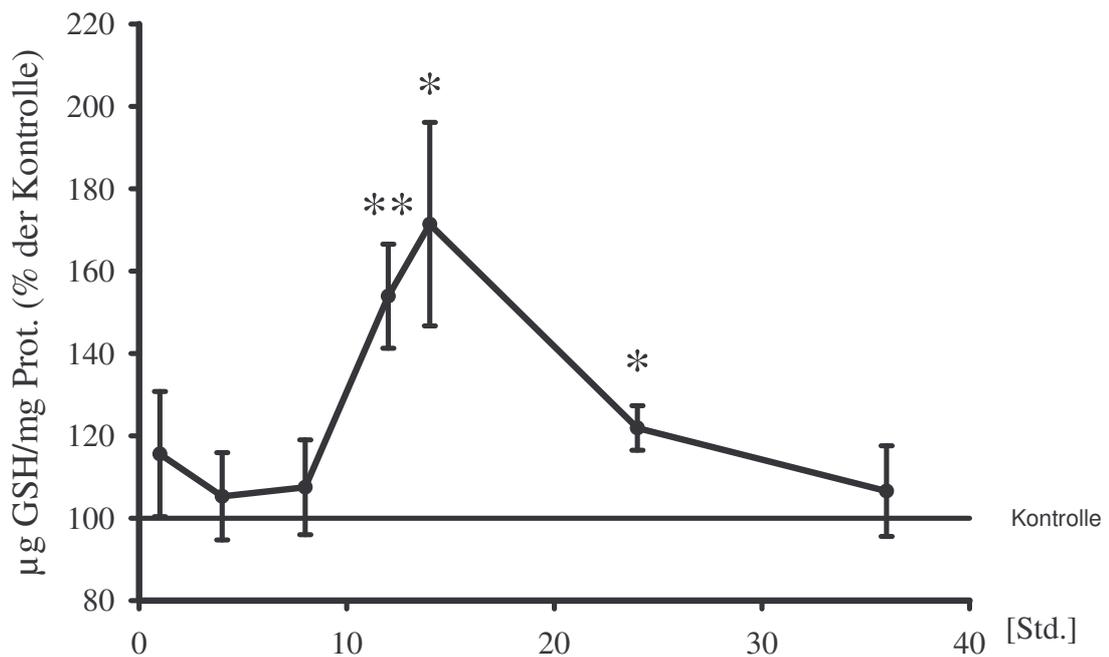


Abbildung 5: Effekte von Dexamethason (10^{-7} M) auf den Glutathion-Gehalt in HT22 Zellen

4.4. Effekte des Glukokortikoid-Agonisten RU362 auf den GSH-Spiegel in HT22 Zellen

Kurzzeitinkubationen mit dem Glukokortikoid-Agonisten RU362 (10^{-7} M) (Abbildung 6) führten in beiden Fällen zu einem signifikanten Anstieg des GSH-Spiegels in hippokampalen HT22 Zellen (1 Std.: $152\% \pm 10\%$, $p < 0.01$ und 3 Std.: $122\% \pm 7\%$, $p < 0.05$). Eine Behandlung der Zellen mit RU362 für 24 Std. führte nicht zu einer signifikanten Veränderung ($94\% \pm 5\%$). Nach einer Behandlung für 24 Std. mit dem Glukokortikoid-Antagonisten RU 486 (10^{-7} M) kam es jedoch zu einem signifikanten Abfall ($57\% \pm 9\%$, $p < 0.05$) des GSH-Gehalts.

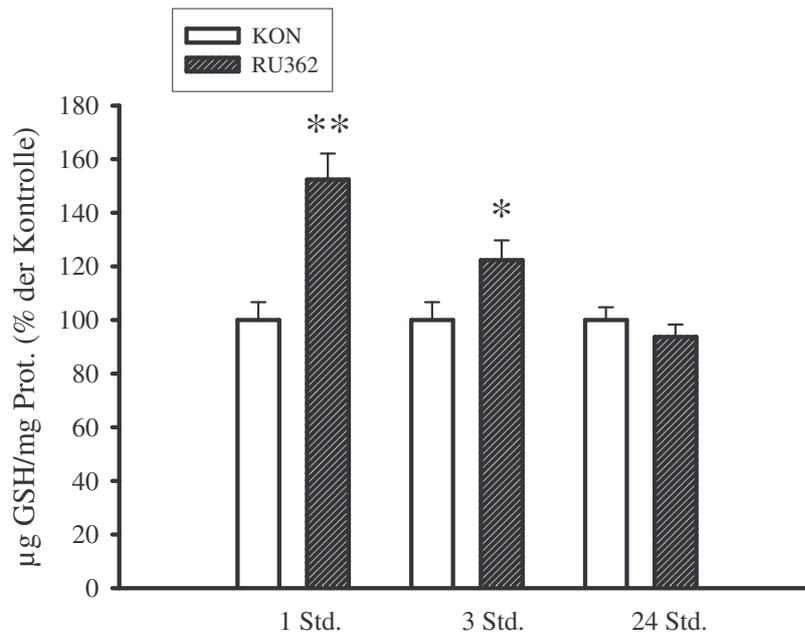


Abbildung 6: Effekte des Glukokortikoid-Agonisten RU362 auf den GSH-Spiegel in HT22 Zellen

4.5. Effekte von gonadalen Steroiden auf den GSH-Spiegel in HT22 Zellen

Abbildung 7 stellt die Effekte der gonadalen Steroide 17β -Östradiol, Progesteron und Testosteron in einer Konzentration von 10^{-7} M auf den GSH-Gehalt in HT22 Zellen dar. Die Behandlung mit 17β -Östradiol führte in den Kurzzeitversuchen (1 Std.: $110\% \pm 7\%$; 3 Std.: $103\% \pm 11\%$) zu nicht signifikanten Anstiegen des GSH-Spiegels. Nach 24 Std. erreichte der Anstieg eine signifikante Ebene ($134 \pm 10\%$, $p < 0.01$). Ein ähnliches Östrogen, das 2 Hydroxy- 17β -Östradiol führte dagegen nach 24 Std. zu einem signifikanten Abfall ($62\% \pm 10\%$, $p < 0.01$) des GSH-Gehalts. Progesteron induzierte nach 1 Std. einen Abfall ($83\% \pm 6\%$) gefolgt vom Erreichen des Kontroll-Niveaus ($99\% \pm 11\%$) nach 3 Std. Eine Langzeitbehandlung mit Progesteron für 24 Std. resultierte in einem signifikanten Abfall ($79\% \pm 9\%$, $p < 0.01$) des

GSH-Spiegels. Mit Testosteron konnten ähnliche Effekte wie mit 17β -Östradiol festgestellt werden. Nach 1 Std. konnte kein Effekt ($103\% \pm 7\%$) gefunden werden. Nach 3 Std. ließ sich ein allmählicher aber nicht signifikanter Anstieg ($116\pm 10\%$) beobachten, während nach 24 Std. ein signifikanter Anstieg ($155\% \pm 17\%$, $p < 0.01$) des GSH-Spiegels festzustellen war.

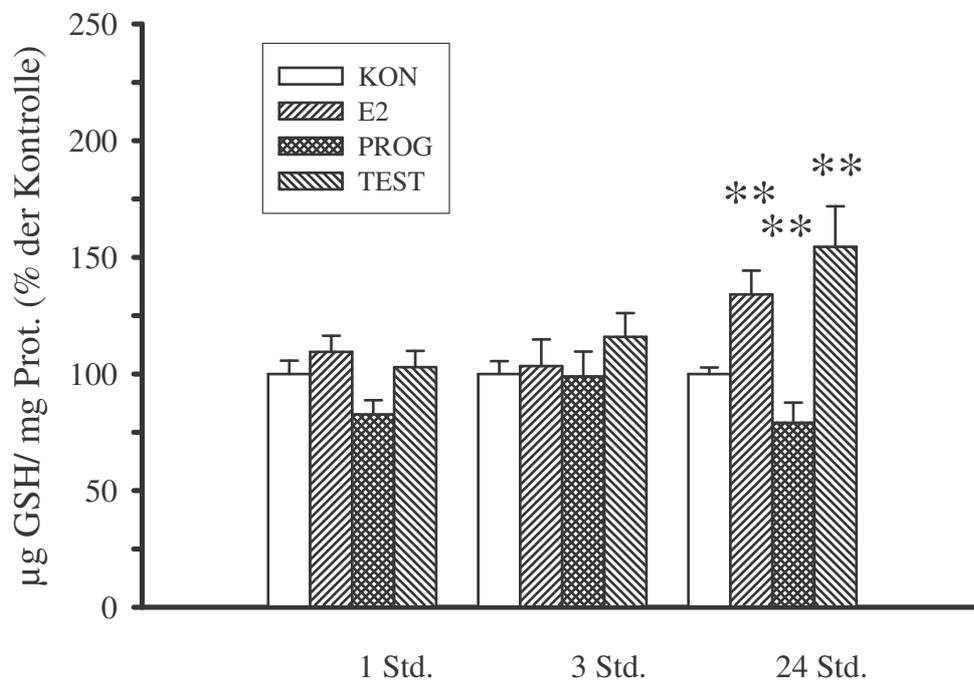


Abbildung 7: Effekte von gonadalen Steroiden auf den GSH-Spiegel in HT22 Zellen

4.6. Dosis-Wirkungskurve von 17β -Östradiol: Effekte auf den GSH-Spiegel in HT22 Zellen

Die Effekte von 17β -Östradiol im Konzentrationsbereich von 10^{-5} bis 10^{-9} M auf den GSH-Gehalt in HT22 Zellen nach einer Behandlung von 24 Std. wurden bestimmt. Wie in Abbildung 8 gezeigt, führte die Inkubation mit 10^{-5} M 17β -Östradiol zu einem signifikanten

Abfall des GSH-Spiegels ($76\% \pm 5\%$, $p < 0.01$). Eine Behandlung mit 10^{-6} M 17β -Östradiol zeigte keinen Effekt ($109\% \pm 12\%$), während sich, wie schon oben erwähnt, nach einer Inkubation mit 10^{-7} M 17β -Östradiol ein signifikanter Anstieg des GSH-Gehalts ($134\% \pm 10\%$, $p < 0.01$) zeigte. Ein leichter aber nicht signifikanter Abfall war nach einer Behandlung mit 10^{-8} M 17β -Östradiol zu beobachten ($93\% \pm 10\%$), während 10^{-9} M 17β -Östradiol zu einer signifikanten Herabsetzung des GSH-Spiegels ($83\% \pm 7\%$, $p < 0.01$) führte.

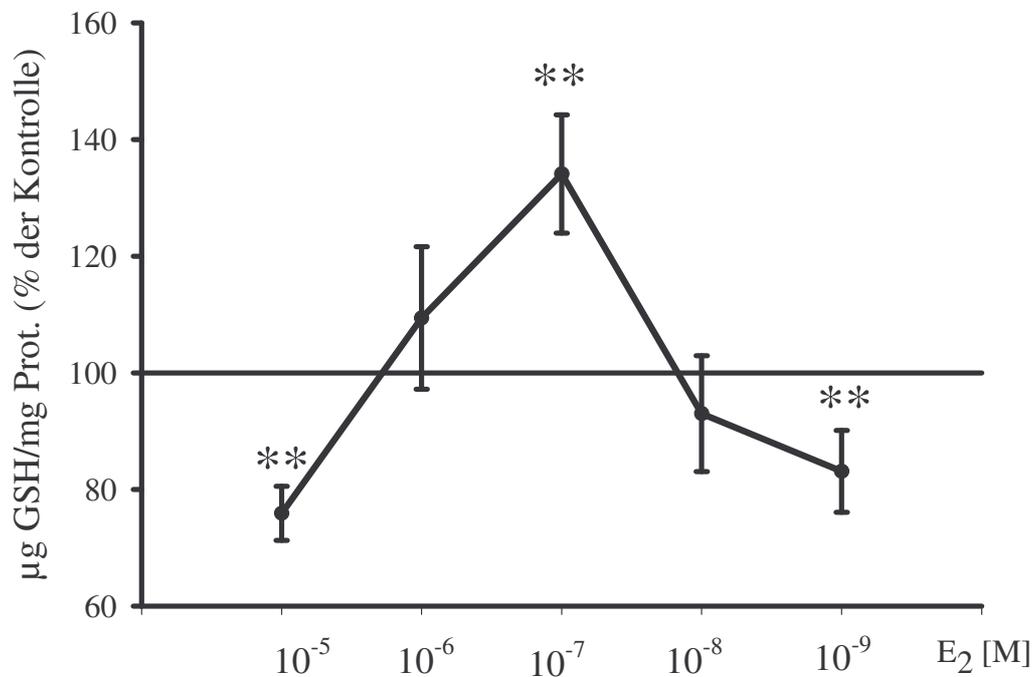


Abbildung 8: Dosis-Wirkungskurve von 17β -Östradiol

4.7. Kurzzeiteffekte von Glukokortikoiden und gonadalen Steroiden auf hippokampale und neokortikale Primärkulturen

Hippokampale Primärkulturen der Ratte wurden für 1 und für 3 Std. mit den synthetischen Glukokortikoiden Dexamethason und 6-MP sowie mit 17β -Östradiol (10^{-7} M)

inkubiert (Abbildung 9). In Falle der Inkubation für eine Stunde konnten keine signifikante Veränderungen des GSH-Spiegels nachgewiesen werden (Dexamethason: $88\% \pm 6\%$; 6-Methylprednisolon: $122\% \pm 13\%$ und 17β -Östradiol: $95\% \pm 9\%$). Eine Inkubation mit den Steroiden für drei Std. ergab für Dexamethason ($94\% \pm 7\%$) und für 6-MP ($105\% \pm 6\%$) keine signifikanten Änderungen des GSH-Spiegels. Eine Behandlung mit 17β -Östradiol führte zu einem signifikanten Abfall ($76\% \pm 6\%$, $p < 0.01$) des GSH-Gehalts. In neokortikalen Primärkulturen wurden Kurzzeitversuche mit 17β -Östradiol durchgeführt. Nach einer Inkubation für eine Stunde zeigte sich ein signifikanter Anstieg des GSH-Spiegels ($125\% \pm 3\%$, $p < 0.01$). Nach drei Std. zeigte sich kein Effekt ($105\% \pm 6\%$) (Daten nicht im Bild gezeigt).

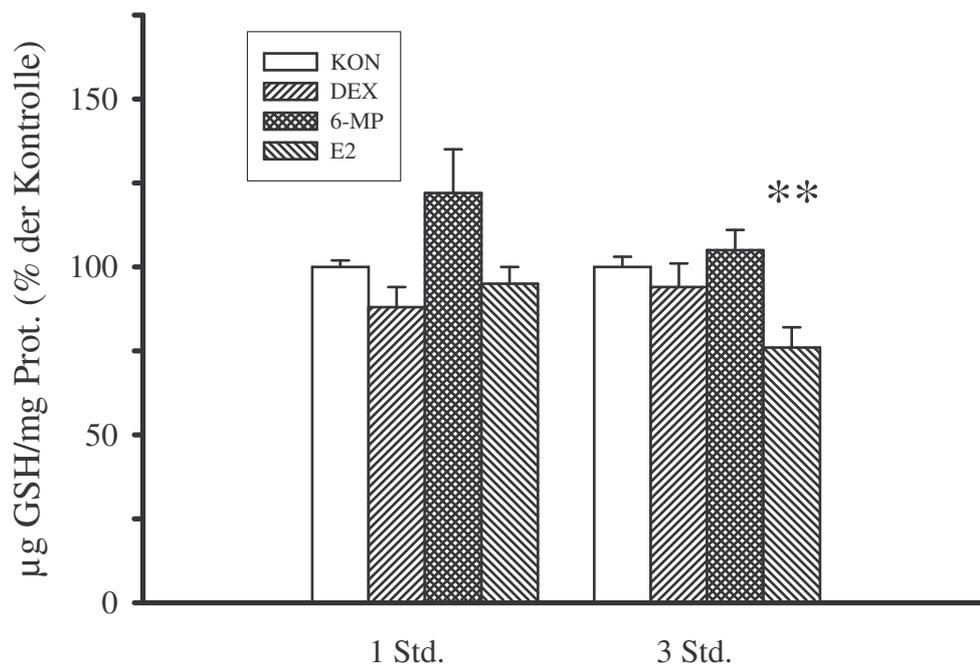


Abbildung 9: Effekte von Glukokortikoiden und gonadalen Steroiden auf den GSH-Spiegel in hippokampalen Primärkulturen

4 8. Langzeiteffekte von Glukokortikoiden und gonadalen Steroiden auf den GSH-Spiegel in hippocampalen Primärkulturen

Abbildung 10 zeigt die Effekte von Glukokortikoiden und gonadalen Steroiden (10^{-7} M) auf den GSH-Spiegel in hippocampalen Primärkulturen der Ratte. Auch in hippocampalen Primärkulturen zeigten sich keine Effekte des physiologischen Glukokortikoids der Nagetiere, Kortikosteron, auf den GSH-Gehalt der Zellen ($106\% \pm 10\%$) nach einer Behandlung von 24 Std.. Wie in der hippocampalen Zelllinie führte eine Inkubation mit dem synthetischen Glukokortikoid Dexamethason zu einem signifikanten Anstieg des GSH-Pegels nach einer Inkubation für 24 Std. ($140\% \pm 8\%$, $p < 0.01$). Im Gegensatz zur hippocampalen HT22 Zelllinie konnte nach Behandlung mit 6-MP kein Anstieg des GSH-Gehalts in hippocampalen Primärkulturen beobachtet werden ($104\% \pm 8\%$). Dies war aber nach einer Behandlung von 48 Std. der Fall ($132\% \pm 11\%$, $p < 0.05$) (nicht im Bild gezeigt). Eine Inkubation mit 17β -Östradiol führte wie auch in HT22 Zellen zu einem signifikanten Anstieg des GSH-Spiegels ($123\% \pm 6\%$, $p < 0.01$). Im Falle des Progesteron ist in hippocampalen Primärkulturen im Gegensatz zur hippocampalen Zelllinie eine signifikante Erhöhung des GSH-Spiegels ($118\% \pm 5\%$, $p < 0.01$) zu beobachten. Im Falle des Testosterons konnte eine leichte aber nicht signifikante Steigerung ($106\% \pm 8\%$) gemessen werden.

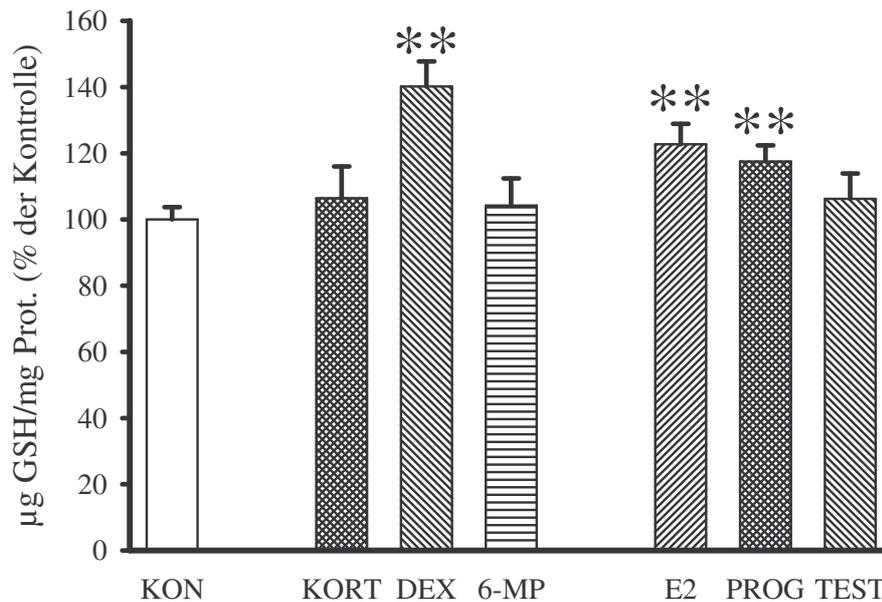


Abbildung 10: Effekte von Glukokortikoiden und gonadalen Steroiden (10^{-7} M) auf den GSH-Spiegel in hippokampalen Primärkulturen

4.9. Langzeiteffekte von Glukokortikoiden und gonadalen Steroiden in neokortikalen Primärkulturen

Wie in Abbildung 11 dargestellt zeigte sich nach Behandlung von neokortikalen Primärkulturen der Ratte mit Kortikosteron (10^{-7} M) ein leichter Abfall des GSH-Gehalts ($95\% \pm 7\%$). Nach einer Inkubation mit Dexamethason (10^{-7} M) war eine leichte Erhöhung des GSH-Spiegels ($106\% \pm 8\%$) zu beobachten. Wie im Falle des Kortikosterons führte auch eine Behandlung mit 6-MP (10^{-7} M) zu einer leichten aber nicht signifikanten Reduktion des GSH-Gehalts ($95\% \pm 5\%$). Wie in allen Zelllinien und Primärkulturen hatte eine Langzeitinkubation (24 Std.) mit 17β -Östradiol (10^{-7} M) einen signifikanten Anstieg ($149\% \pm 8\%$, $p < 0.01$) zur Folge. Im Falle der anderen beiden eingesetzten gonadalen Steroide (10^{-7}

M) Progesteron ($108\% \pm 7\%$) und Testosteron ($105\% \pm 8\%$) ließen sich keine Effekte auf den GSH-Spiegel beobachten.

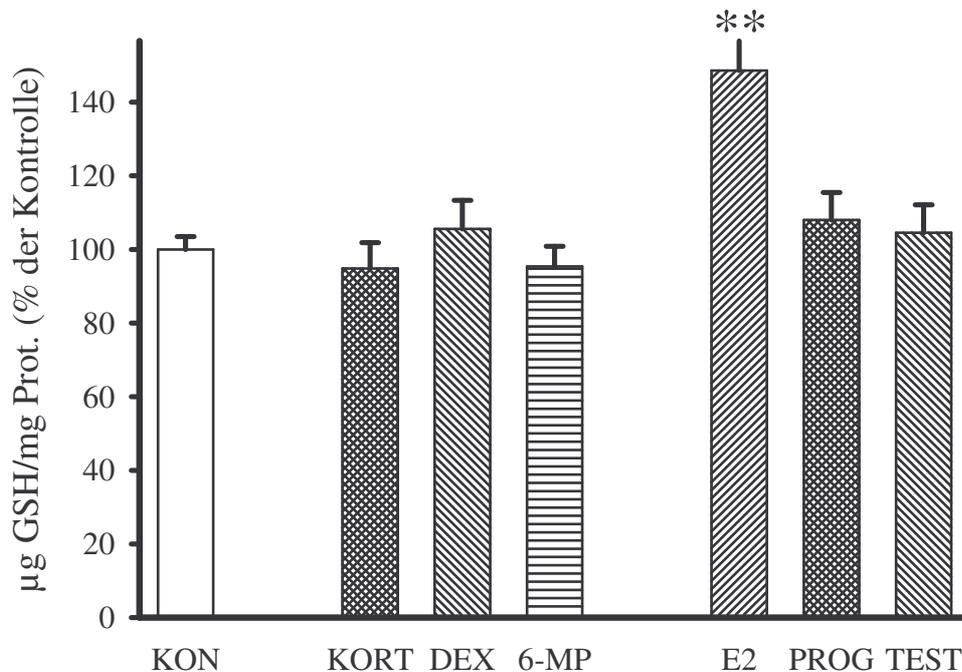


Abbildung 11: Effekte von Glukokortikoiden und gonadalen Steroiden auf den GSH-Spiegel in neokortikalen Primärkulturen

4.10. Effekte von Glukokortikoiden auf den GSH-Spiegel in C_6 Zellen

Abbildung 12 zeigt die Effekte von Glukokortikoiden (10^{-7} M) auf die C_6 Zelllinie. Eine Inkubation der Zellen mit Kortikosteron für 1 Std. führte zu einem signifikanten Anstieg des GSH-Spiegels ($114\% \pm 5\%$, $p < 0.05$), während nach 3 Std. kein Effekt zu beobachten war ($104\% \pm 5\%$). Eine Behandlung für 24 Std. führte hingegen zu einem signifikanten Abfall des GSH-Gehalts ($74\% \pm 4\%$, $p < 0.01$). Nach einer einstündigen Inkubation mit dem synthetischen Glukokortikoid Dexamethason konnte ein signifikanter Abfall des GSH-

Spiegels festgestellt werden ($90\% \pm 3\%$, $p < 0.01$). Ein signifikanter Anstieg des GSH-Pegels in C_6 Zellen war dagegen im weiteren Kurzzeitversuch (3 Std.) mit Dexamethason zu beobachten ($115\% \pm 5\%$, $p < 0.05$). Nach einer Behandlung von 24 Std. zeigte sich kein Effekt ($102\% \pm 4\%$). Das zweite synthetische Glukokortikoid 6-MP führte zu keinerlei signifikanten Kurzeffekten (1 Std.: $95\% \pm 4\%$; 3 Std.: $91\% \pm 4\%$). Nach der leichten Absenkung des GSH-Spiegels in beiden Kurzzeitversuchen konnte nach 24 Std. ein signifikanter Abfall des GSH-Gehalts beobachtet werden ($84\% \pm 5\%$, $p < 0.01$).

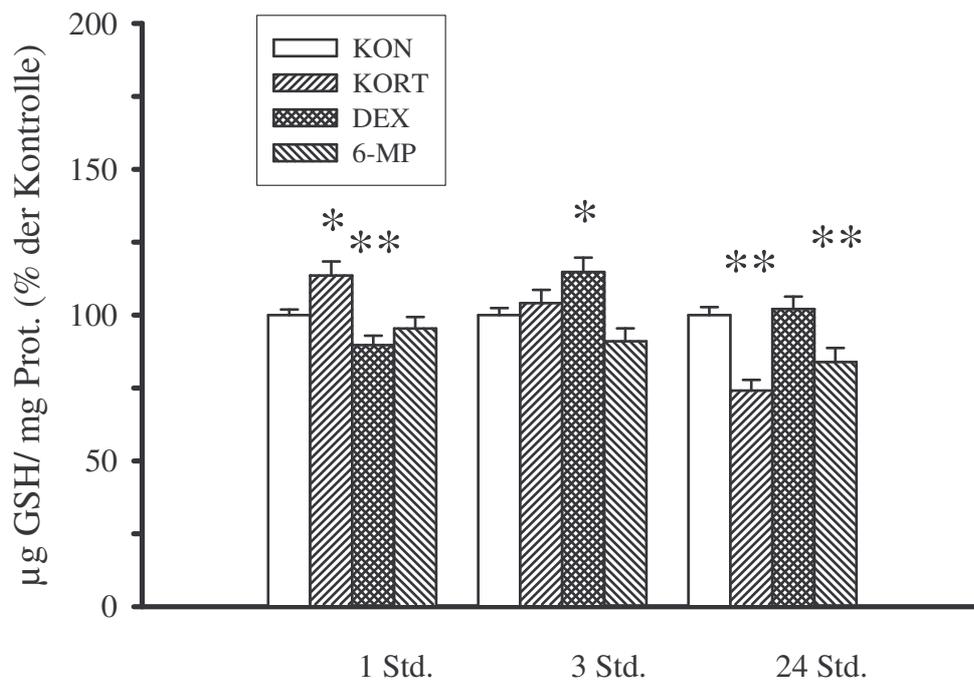


Abbildung 12: Effekte von Glukokortikoiden auf den GSH-Spiegel in C_6 Zellen

4.11. Effekte von gonadalen Steroiden auf den GSH-Spiegel in C_6 Zellen

Abbildung 13 stellt die Effekte der gonadalen Steroide 17β -Östradiol, Progesteron und Testosteron (10^{-7} M) auf den GSH-Gehalt in C_6 Zellen dar. Eine Inkubation mit 17β -Östradiol

bewirkte nach einer Stunde eine signifikante Absenkung des GSH-Spiegels ($88\% \pm 3\%$, $p < 0.05$), nach 3 Std. ($122\% \pm 6\%$, $p < 0.01$) und 24 Std. ($115\% \pm 6\%$, $p < 0.05$) kam es dagegen zu signifikanten Anstiegen des GSH-Gehalts. In den Kurzzeitversuchen mit Progesteron (1 Std.: $92\% \pm 6\%$; 3 Std.: $101\% \pm 6\%$) waren keine signifikanten Änderungen zu beobachten. Nach einer Inkubation mit Progesteron für 24 Std. kam es zu einer signifikanten Herabsetzung des GSH-Gehalts ($91\% \pm 4\%$, $p < 0.05$). Nach einer Behandlung mit Testosteron zeigte sich im Fall der Kurzzeitversuche nach einer Stunde kein Effekt ($102 \pm 7\%$) und nach drei Std. eine signifikante Reduktion des GSH-Spiegels ($78\% \pm 4\%$, $p < 0.01$). Dagegen kam es nach 24 Std. zu einer signifikanten Erhöhung des GSH-Gehalts ($116\% \pm 5\%$, $p < 0.05$).

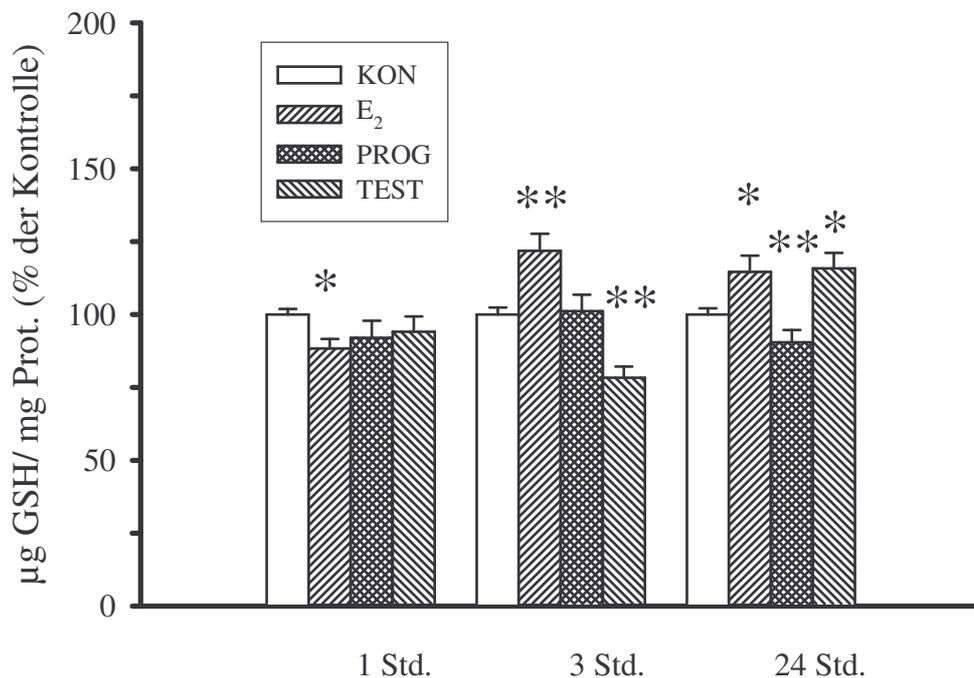


Abbildung 13: Effekte von gonadalen Steroiden auf den GSH-Spiegel in C₆ Zellen

4.12. Effekte von Interleukin-6 auf den GSH-Spiegel in HT22 Zellen

Es wurden die Effekte von Interleukin-6 (IL-6) in den Konzentrationen von 0.5 ng/ml und 1.0 ng/ml auf den GSH-Spiegel in hippokampalen HT22 Zellen untersucht. Abbildung 14 zeigt die Reaktionen auf eine Behandlung mit 0.5 ng/ml. Nach einer Stunde ($94\% \pm 4\%$) und nach vier Std. ($104\% \pm 11\%$) waren keine Effekte detektierbar. Die Behandlungen für 8 Std. ($131\% \pm 6\%$, $p < 0.01$), 15 Std. ($160\% \pm 16\%$, $p < 0.01$) und 24 Std. ($156\% \pm 12\%$, $p < 0.05$) hatten einen signifikanten Anstieg des GSH-Spiegels in hippokampalen HT22 zur Folge. Nach 48 Std. war die Kontrollebene ($106\% \pm 8\%$) wieder erreicht.

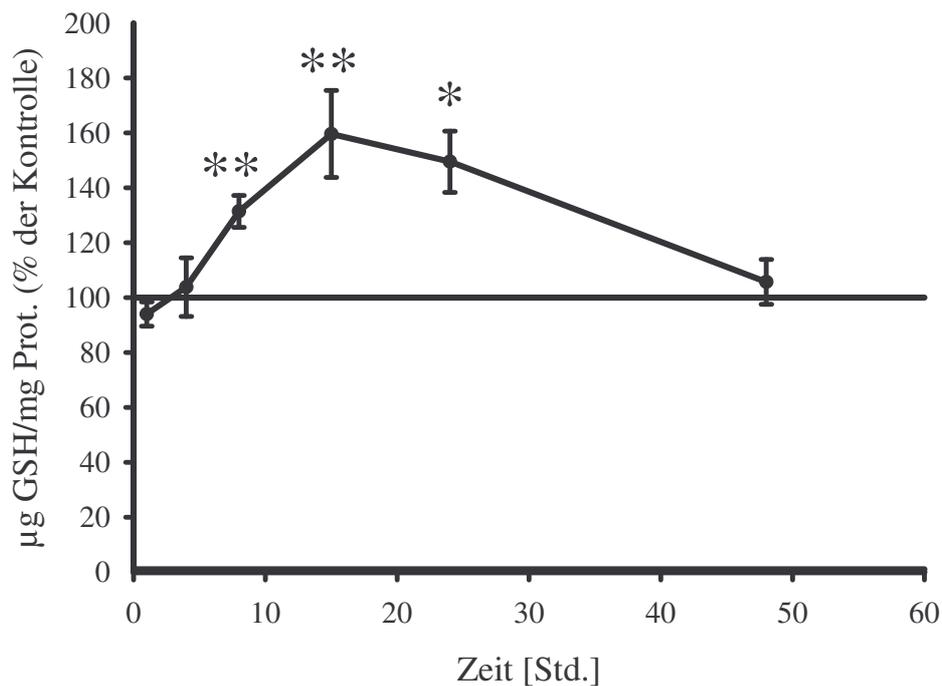


Abbildung 14: Effekte von IL-6 (0.5 ng/ml) auf den GSH-Spiegel in HT22 Zellen

Abbildung 15 demonstriert die Effekte von Interleukin-6 in einer Konzentration von 1.0 ng/ml auf hippokampale HT22 Zellen. Eine Inkubation für eine Stunde resultiert in einem Abfall des GSH-Gehalts ($87\% \pm 6\%$). Nach Behandlung der Zellen mit IL-6 für 4 Std. ($131\% \pm 10\%$, $p < 0.01$), 8 Std. ($130\% \pm 6\%$, $p < 0.01$), 15 Std. ($135\% \pm 8\%$, $p < 0.01$) and 24 Std. ($147\% \pm 7\%$, $p < 0.01$) konnten signifikante Anstiege des GSH-Spiegels beobachtet werden. Der Abfall nach 48 Std. ($88\% \pm 7\%$) war nicht signifikant. Im Gegensatz zu den signifikanten Anstiegen des GSH-Gehalts nach einer Behandlung für 24 Std. mit 0.5 ng/ml und 1.0 ng/ml konnte nach einer Inkubation mit 4.0 ng/ml kein signifikanter Effekt ($85\% \pm 6\%$) beobachtet werden.

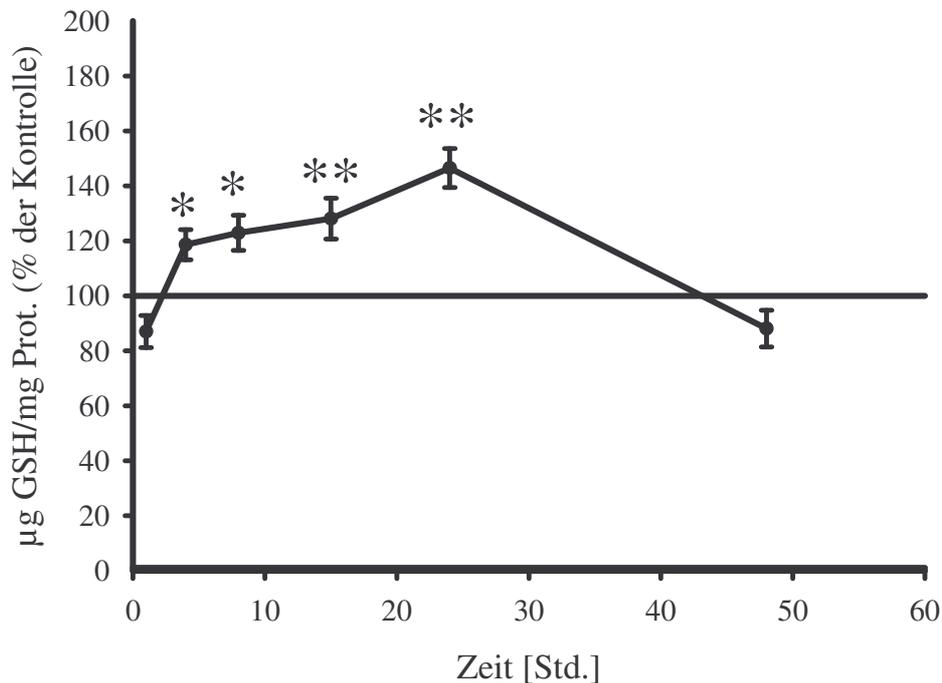


Abbildung 15: Effekte von IL-6 (1.0 ng/ml) auf den GSH-Spiegel in HT22 Zellen

4.13. Effekte des IL-6 Antikörpers auf den IL-6 induzierten GSH-Anstieg in HT22 Zellen

Nach einer Behandlung von HT22 Zellen mit 0.5 ng/ml für 15 Std. konnte der höchste durch dieses Interleukin induzierte Anstieg des GSH-Spiegels gemessen werden. Wie Abbildung 16 demonstriert, konnte die GSH-Induktion mit einem IL-6 Antikörper (0.5 ng/ml) vollständig blockiert werden ($102\% \pm 7\%$). Die statistische Analyse ergab signifikante Unterschiede der GSH-Spiegel in mit IL-6 behandelten Zellen im Vergleich zur Kontrolle und zu mit IL-6 und dem Antikörper behandelten Zellen.

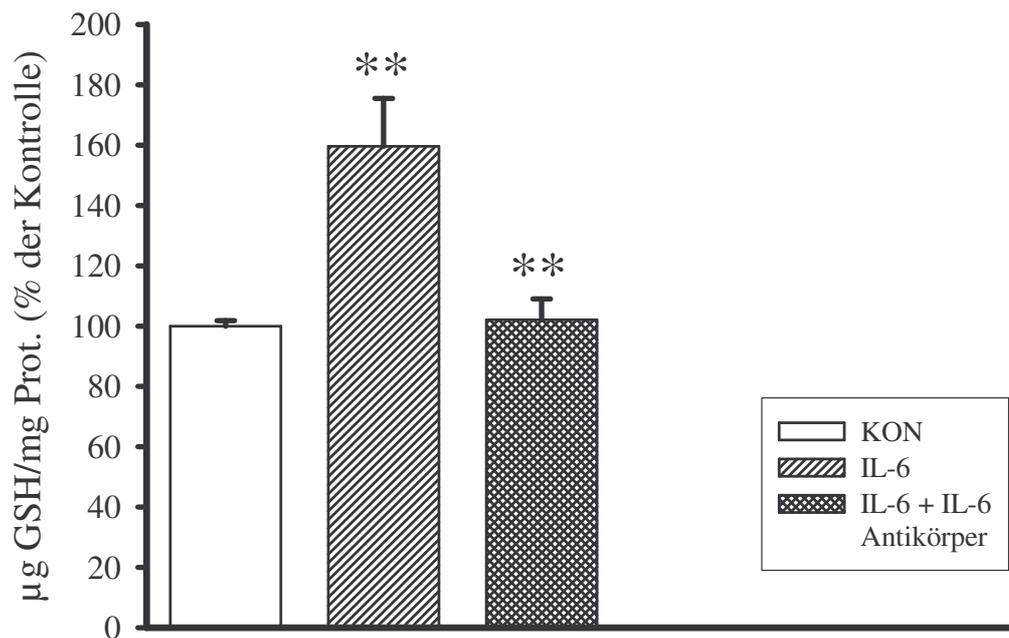


Abbildung 16: Effekte des IL-6 Antikörpers auf den GSH-Spiegel in HT22 Zellen

4.14. Effekte von Interleukin-6 auf hippokampale Primärkulturen

In Abbildung 17 sind die Effekte von Interleukin-6 (1.0 ng/ml) auf primäre hippokampale Zellkulturen in Zeiträumen zwischen 1 Std. und 72 Std. dargestellt. Nach 1 Stunde war kein Effekt nachweisbar ($105\% \pm 8\%$). Nach 4 Std. ($159\% \pm 11\%$, $p < 0.01$), 8 Std. ($141\% \pm 9\%$, $p < 0.01$), 15 Std. ($147\% \pm 8\%$, $p < 0.01$), 24 Std. ($146\% \pm 8\%$, $p < 0.01$) und 48 Std. ($178\% \pm 13\%$, $p < 0.01$) kam es zu einem signifikanten Anstieg des GSH-Spiegels. Eine Inkubationsperiode von 72 Std. führte zu keinem signifikanten Effekt ($98\% \pm 6\%$).

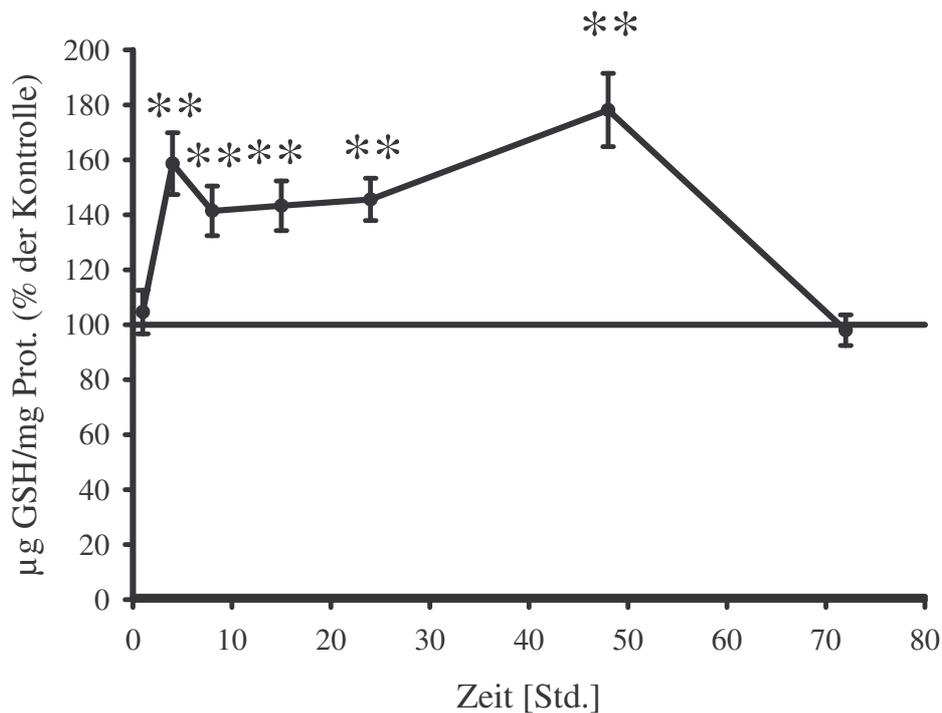


Abbildung 17: Effekte von Interleukin-6 (1 ng/ml) auf den GSH-Spiegel in hippokampalen Primärkulturen

4.15. Effekte von Glukokortikoiden auf die Katalase-Aktivität in HT22 Zellen

4.15.1. Effekte von Glukokortikoiden (10^{-5} M) auf die Katalase-Aktivität

Abbildung 18 zeigt die Effekte einer Behandlung von HT22 Zellen mit Glukokortikoiden (10^{-5} M) für 1 und für 24 Std. Eine Inkubation der Zellen mit Kortikosteron führte weder nach 1 ($103\% \pm 9\%$) noch nach 24 Std. ($103\% \pm 5\%$) zu einem Effekt. Dexamethason führte nach 1 Std. ($101\% \pm 4\%$) zu keinem Effekt und nach 24 Std. ($106\% \pm 3\%$, $p < 0.01$) zu einer signifikanten Erhöhung der Aktivität. Eine Behandlung der Zellen mit 6-MP zeigte weder im Kurzzeitversuch ($107\% \pm 6\%$) noch im Langzeitversuch ($102\% \pm 6\%$) einen Effekt.

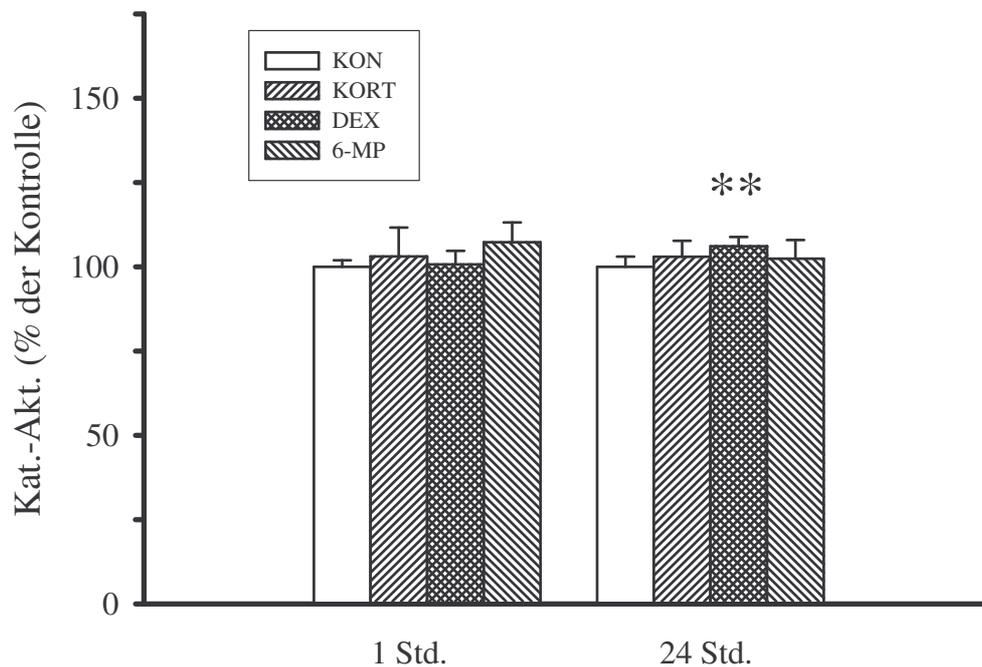


Abbildung 18: Effekte von Glukokortikoiden (10^{-5} M) auf die Katalase-Aktivität in HT22 Zellen

4.15.2. Effekte von Glukokortikoiden (10^{-7} M) auf die Katalase-Aktivität

Wie in Abbildung 19 dargestellt führte eine Behandlung mit dem physiologischen Steroid Kortikosteron nach 1 Stunde zu einem signifikanten Abfall ($91\% \pm 9\%$, $p < 0.05$) und nach 3 Std. zu einem signifikanten Anstieg ($125\% \pm 11\%$, $p < 0.01$) der Katalase-Aktivität. Nach 24 Std. konnte kein Effekt ($100\% \pm 5\%$) beobachten werden. Nach einer Inkubation mit dem synthetischen Glukokortikoid Dexamethason konnten weder Kurzzeiteffekte (1 Stunde: $104\% \pm 7\%$, 3 Std.: $100\% \pm 2\%$) noch Langzeiteffekte (24 Std.: $98\% \pm 5\%$) auf die Katalase-Aktivität gezeigt werden. Die Behandlung mit dem zweiten synthetischen Glukokortikoid 6-MP zeigte ähnliche Ergebnisse wie die mit Kortikosteron. Nach 1 Std. kam es zu einem signifikanten Abfall ($86\% \pm 4\%$, $p < 0.01$) der Katalase-Aktivität, während nach 3 Std. ein signifikanter Anstieg ($116\% \pm 7\%$, $p < 0.05$) zu beobachten war. Nach 24 Std. war kein Effekt feststellbar ($105\% \pm 7\%$).

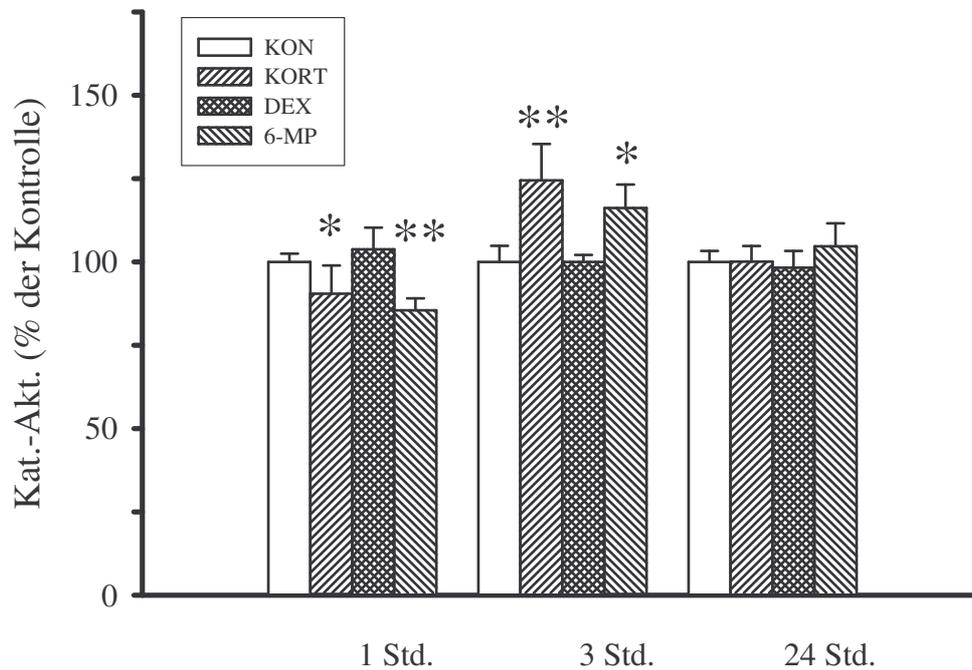


Abbildung 19: Effekte von Glukokortikoiden (10^{-7} M) auf die Katalase-Aktivität in HT22 Zellen

4.15.3. Effekte des Glukokortikoid-Agonisten RU 362 auf die Katalase-Aktivität

Eine Behandlung mit dem Agonisten (10^{-7} M) führte sowohl im Rahmen der Kurzzeitversuche (1 Std.: $118\% \pm 6\%$, $p < 0.01$ und 3 Std.: $121\% \pm 4\%$, $p < 0.01$) wie auch im Langzeitversuch (24 Std.: $129\% \pm 8\%$, $p < 0.01$) zu einer signifikanten Steigerung der Katalase-Aktivität.

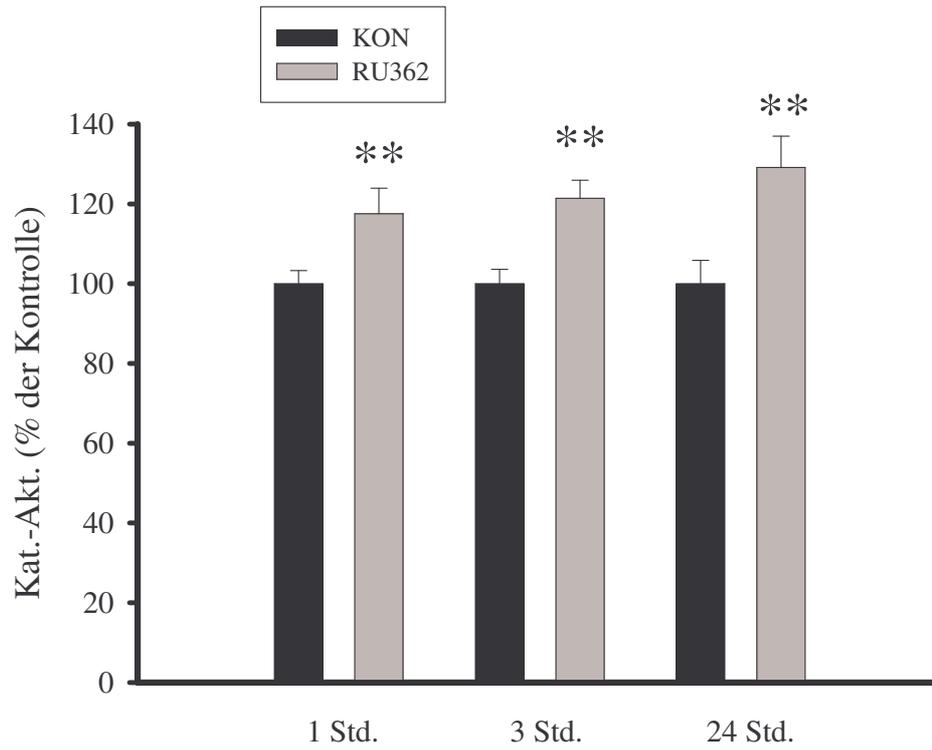


Abbildung 20: Effekte des Glukokortikoid-Agonisten RU362 auf die Katalase-Aktivität in HT22 Zellen

4.16. Effekte von gonadalen Steroiden auf die Katalase-Aktivität in HT22 Zellen

4.16.1. Effekte von gonadalen Steroiden (10^{-5} M) auf die Katalase-Aktivität

Wie in Abbildung 21 dargestellt, führte eine Inkubation mit E₂ weder nach 1 Std. ($101\% \pm 7\%$) noch nach 24 Std. ($93\% \pm 6\%$) zu einem Effekt. Nach einer Behandlung mit Progesteron kam es sowohl nach 1 Std. ($91\% \pm 4\%$, $p < 0.05$) als auch nach 24 Std. ($84\% \pm 5\%$, $p < 0.01$) zu einer signifikanten Verringerung der Aktivität. Die Inkubation der Zellen mit Testosteron resultierte in beiden Fällen (1 Std.: $185\% \pm 16\%$, $p < 0.01$ und 24 Std.: $113\% \pm 7\%$, $p < 0.05$) in einem signifikanten Anstieg der Katalase-Aktivität.

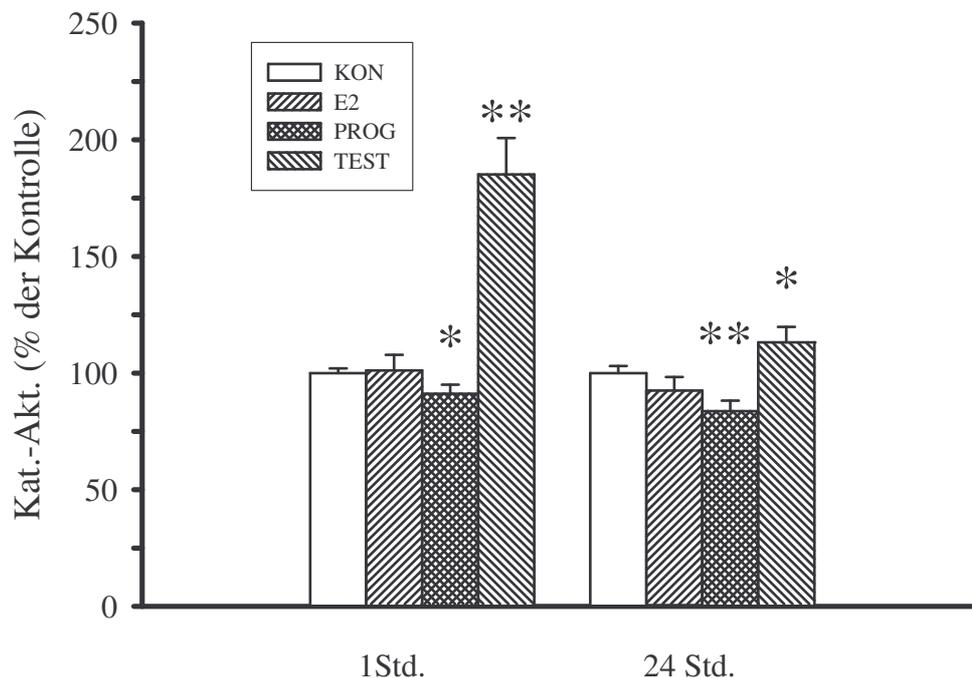


Abbildung 21: Effekte von gonadalen Steroiden (10^{-5} M) auf die Katalase-Aktivität in HT22 Zellen

4.16.2. Dosis-Wirkungskurve mit Testosteron: Wirkung auf die Katalase-Aktivität in HT22 Zellen

Mit Testosteron wurde eine Dosis-Wirkungskurve im Konzentrationsbereich von 5×10^{-4} - 10^{-8} M und einer Inkubationsdauer von einer Std. durchgeführt. Eine Behandlung der Zellen mit 10^{-4} M ($99\% \pm 4\%$) und 5×10^{-4} M ($107\% \pm 5\%$) Testosteron zeigte keine Effekte. Eine Inkubation mit 10^{-5} M ($144\% \pm 11\%$, $p < 0.01$) Testosteron führte zu einem signifikanten Anstieg der Katalase-Aktivität in HT22 Zellen. Im Gegensatz dazu konnte eine signifikant herabgesetzte Katalase-Aktivität beobachtet werden, wenn die Zellen 5×10^{-5} ($92\% \pm 3\%$, $p < 0.05$) und 10^{-6} M ($87\% \pm 5\%$, $p < 0.05$) Testosteron ausgesetzt wurden. Von den weiteren Konzentrationen führte nur eine Hormonbehandlung mit 10^{-7} M zu einem signifikanten Effekt ($117\% \pm 4\%$, $p < 0.01$). Dagegen zeigten 5×10^{-6} ($99\% \pm 5\%$), 5×10^{-7} ($106\% \pm 4\%$) und 10^{-8} M ($101\% \pm 4\%$) keine Effekte.

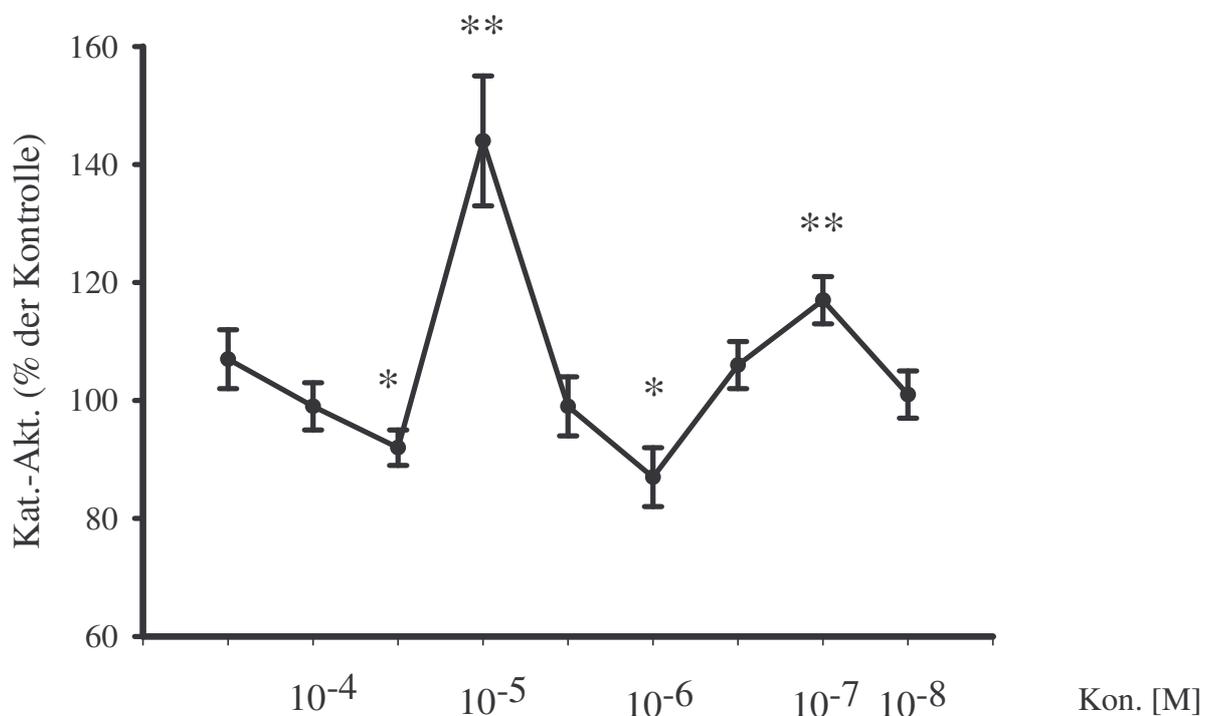


Abbildung 22: Dosis-Wirkungskurve mit Testosteron auf HT22 Zellen

4.16.3. Neuroprotektive Effekte von Testosteron in HT22 Zellen

Weiterhin wurden mögliche neuroprotektive Effekte nach einer Behandlung der Zellen mit Testosteron (1 Std., 10^{-5} M) und einer Schädigung durch 1.0, 1.25 und 1.5 mM Wasserstoffperoxid untersucht. Unter diesen Bedingungen einer Inkubation mit Testosteron wurde der größte signifikante Anstieg der Katalase-Aktivität im Rahmen der in dieser Arbeit durchgeführten Versuche gemessen. Nach einer Behandlung mit 1.25 und 1.5 mM Wasserstoffperoxid führte Testosteron zu einem signifikant gesteigerten Zellüberleben [1.25 mM: $78\% \pm 20\%$ auf $85\% \pm 30\%$ ($p < 0.05$), 1.5 mM: $67\% \pm 20\%$ auf $75\% \pm 17\%$ ($p < 0.05$)].

4.16.4. Effekte von gonadalen Steroiden (10^{-7} M) auf die Katalase-Aktivität

In Abbildung 23 sind die Effekte der gonadalen Steroide E_2 , Progesteron und Testosteron auf die Katalase-Aktivität in hippokampalen HT22 Zellen dargestellt. Eine Behandlung mit E_2 führte zu einer Herabregulation der Katalase-Aktivität (1 Std.: $96\% \pm 3\%$; 3 Std.: $93 \pm 7\%$ und 24 Std.: $87\% \pm 4\%$, $p < 0.05$). Eine Inkubation der Zellen mit Progesteron führte nach 1 Stunde zu einem signifikanten Anstieg ($123\% \pm 8\%$, $p < 0.01$), auf den nach 3 Std. ($89\% \pm 7\%$) und nach 24 Std. ($76\% \pm 5\%$, $p < 0.01$) ein Abfall der Katalase-Aktivität folgte. Wurden die Zellen Testosteron ausgesetzt, so kam es nach 1 Stunde ($127\% \pm 7\%$, $p < 0.01$) zu einem signifikanten Anstieg der Katalase-Aktivität, der nach 3 Std. wieder das Niveau der Kontrolle erreichte ($104\% \pm 7\%$). Nach 24 Std. war ein signifikanter Abfall der Aktivität zu beobachten ($91\% \pm 6\%$, $p < 0.05$).

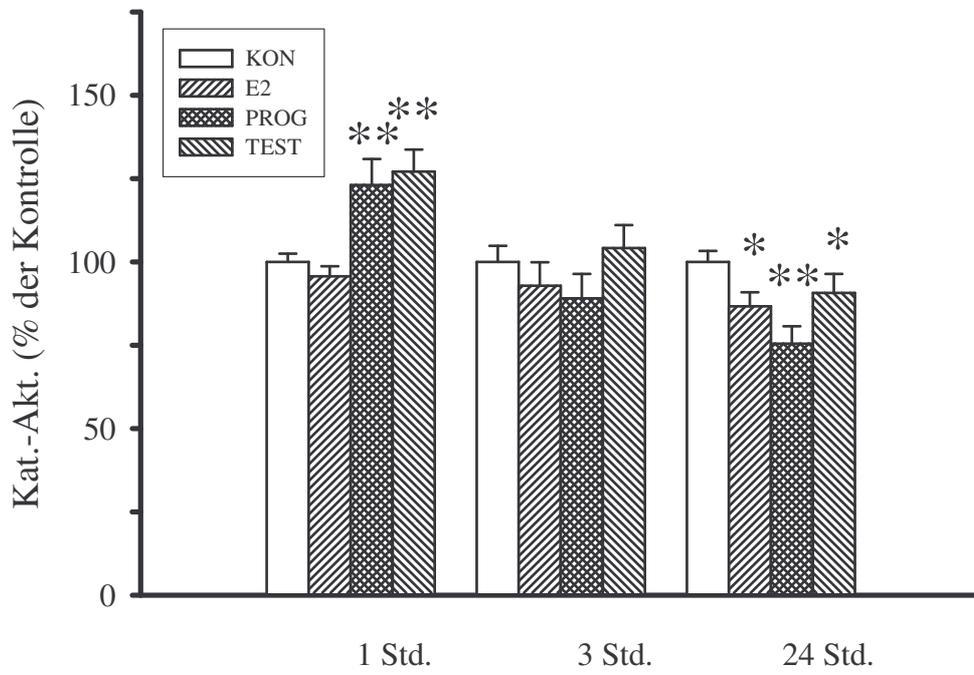


Abbildung 23: Effekte von gonadalen Steroiden (10^{-7} M) auf die Katalase-Aktivität in HT22 Zellen

4.16.5. Effekte von weiteren Östrogenen auf die Katalase-Aktivität

Eine Behandlung der HT22 Zellen mit Estron (10^{-7} M) führte nach einer Stunde ($94\% \pm 4\%$) nach drei Std. ($92\% \pm 4\%$) und nach 24 Std. ($81\% \pm 5\%$, $p < 0.05$) zu einer Absenkung der Katalase-Aktivität, die nach 24 Std. ein signifikantes Niveau erreichte

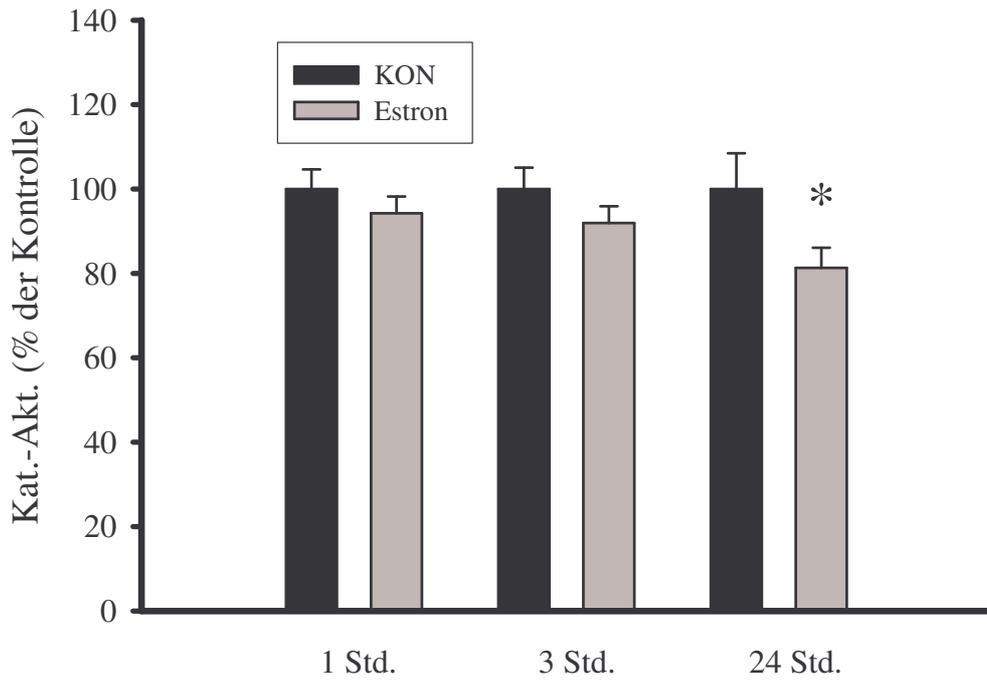


Abbildung 24: Effekte von Estron auf die Katalase-Aktivität in HT22 Zellen

Die Inkubation von HT22 Zellen mit 2-HT (10^{-7} M) hatte nach einer Stunde einen signifikanten Anstieg ($112\% \pm 5\%$, $p < 0.05$) der Katalase-Aktivität zur Folge. Nach drei Std. war ein nicht signifikanter Abfall der Aktivität ($90\% \pm 8\%$) zu beobachten. Eine Behandlung für 24 Std. führte zu einem leichten Anstieg ($105\% \pm 5\%$) der Aktivität der Katalase.

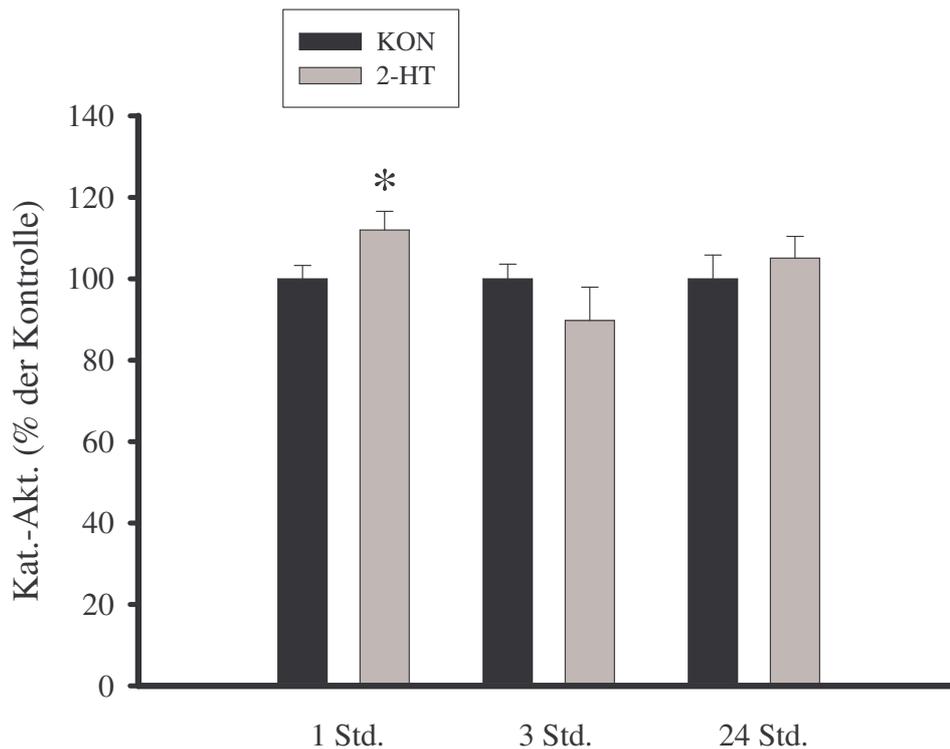


Abbildung 25: Effekte von 2-HT auf die Katalase-Aktivität in HT22 Zellen

4.17. Effekte von Glukokortikoiden auf die Katalase-Aktivität in C₆ Zellen

Nach einer Inkubation mit dem physiologischen Glukokortikoid der Nagetiere Kortikosteron war nach 1 Std. kein Effekt ($103\% \pm 3\%$) zu beobachten, während sowohl nach 3 Std. ($107\% \pm 5\%$) wie auch nach 24 Std. ($113\% \pm 2\%$, $p < 0.01$) ein Anstieg zu detektieren war. Auch mit dem synthetischen Glukokortikoid Dexamethason konnte nach 1 Stunde keine Veränderung ($101\% \pm 2\%$) der Katalase-Aktivität nachgewiesen werden. Nach 3 Std. ($90\% \pm 3\%$, $p < 0.05$) konnte ein signifikanter Rückgang und nach 24 Std. ($110\% \pm 2\%$, $p < 0.01$) eine signifikante Steigerung der Katalase-Aktivität beobachtet werden. Mit dem zweiten synthetischen Glukortikoid 6-MP ließen sich weder nach 1 Stunde ($95\% \pm 2\%$) noch nach 3 Std. ($99\% \pm 4\%$) oder nach 24 Std. ($98\% \pm 3\%$) Effekte beobachten.

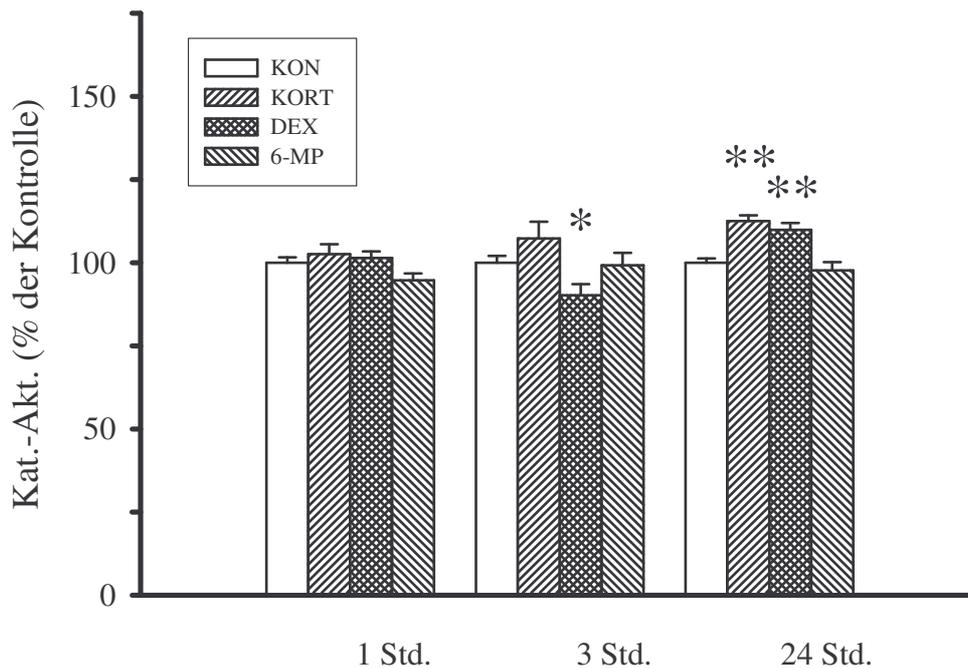


Abbildung 26: Effekte von Glukokortikoiden (10^{-7} M) auf die Katalase-Aktivität in C_6 Zellen

4.18. Effekte von gonadalen Steroiden auf die Katalase-Aktivität in C_6 Zellen

Eine Inkubation der C_6 Zellen mit E_2 führte nach 1 Stunde zu keinem Effekt ($99\% \pm 3\%$), während sowohl nach 3 Std. ($114\% \pm 4\%$, $p < 0.01$) als auch nach 24 Std. ($112\% \pm 2\%$, $p < 0.01$) ein signifikanter Anstieg zu beobachten war. Im Falle des Progesterons zeigte sich bei den Kurzzeitversuchen kein Effekt (1 Std.: $104\% \pm 2\%$ und 3 Std.: $105\% \pm 3\%$). Eine Langzeitinkubation mit Progesteron für 24 Std. hatte einen signifikanten Anstieg der Katalase-Aktivität ($106\% \pm 2\%$, $p < 0.05$) zur Folge. Eine Behandlung der Zellen mit Testosteron führte nach beiden Kurzzeitinkubationen (1 Std.: $89\% \pm 4\%$, $p < 0.01$ und 3 Std.: $94\% \pm 2\%$, $p < 0.05$) zu einem signifikanten Abfall der Katalase-Aktivität. Nach 24 Std. ließ sich kein Effekt ($104\% \pm 2\%$) detektieren.

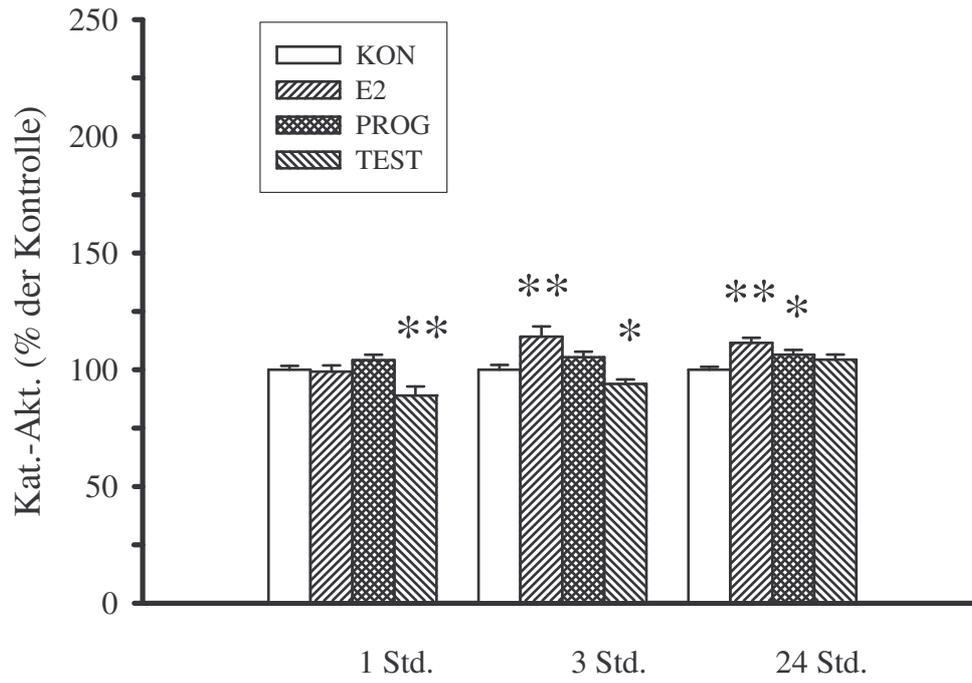


Abbildung 27: Effekte von gonadalen Steroiden (10^{-7} M) auf die Katalase-Aktivität in C_6 Zellen

5. Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, die verschiedenen Effekte von physiologischen (Kortikosteron) und synthetischen (Dexamethason und 6-MP) Glukokortikoiden, gonadalen Steroiden (17 β -Östradiol, Progesteron und Testosteron) sowie IL-6 auf den GSH-Spiegel und die Katalase-Aktivität in verschiedenen Zellarten zu untersuchen. Dafür wurden sowohl hippokampale neuronale Zellsysteme (HT22 Zelllinie und hippokampale Primärkulturen der Ratte) und neokortikale Primärkulturen der Ratte als auch die C₆ Zelllinie, ein undifferenzierter astrozytotischer Zelltyp, untersucht. Im Falle der neuronalen Zellsysteme wurden die Untersuchungen also im Wesentlichen an hippokampalen Zellen durchgeführt. Von den verwendeten Steroiden sind protektive Effekte sowohl *in vitro* als auch *in vivo* beschrieben. Über die genauen molekularen Mechanismen, die diesen Wirkungen zugrunde liegen, ist jedoch bisher so gut wie nichts bekannt. Eine mögliche Erklärung wäre, dass es zu einer Beeinflussung des antioxidativ wirksamen Systems kommt, welches in der hier vorliegenden Arbeit untersucht wurde.

Der Hippokampus ist sehr sensitiv für viele Typen von neurologischen Insulten und im Falle der Alzheimer'schen Erkrankung im Gehirn der betroffenen Patienten ein wesentliches Zielgebiet für die Neurodegeneration (Behl et al., 1997a). Aufgrund der vielfältigen Funktionen von GSH im antioxidativen Stoffwechsel konzentriert sich die vorliegende Arbeit weitgehend auf die Beeinflussung des GSH-Stoffwechsels in neuronalen und glialen Zellsystemen durch Steroide und Interleukine. In einigen Studien konnte gezeigt werden, dass Veränderungen des GSH-Gehalts und der Aktivitäten von Enzymen des GSH-Metabolismus im Falle einiger neurologischer und psychiatrischer Erkrankungen im Hippokampus nachweisbar sind. Do et al. (2000) untersuchten den GSH-Spiegel im Liquor von Pharmakafreien Patienten mit schizophrenen Störungen. Sie zeigten verglichen mit den Kontrollen einen signifikanten Abfall. Mit Hilfe protonenmagnetischer Resonanzspektroskopie

bestimmten sie weiterhin den GSH-Spiegel im medialen präfrontalen Kortex von Schizophrenie-Patienten und fanden einen um 52% verringerten GSH-Gehalt vor. In kultivierten hippokampalen Neuronen mit Trisomie 16, einem Mausmodell für die Trisomie 21 (Down-Syndrom), demonstrierten Stabel-Burow et al. (1997) einen herabgesetzten GSH-Spiegel und einen vermehrten Zelltod verglichen mit diploiden Zellen. Die Resultate der Arbeit von Schuchmann und Heinemann (2000) legen nahe, dass ein reduzierter GSH-Spiegel den Anstieg des neuronalen Zelltods in Trisomie 16-Kulturen beeinflussen kann. Lovell et al. (1995) fanden eine signifikante Erhöhung der Aktivität der GSH-Peroxidase im Hippokampus von Alzheimer-Patienten im Vergleich zu Kontrollen. Aksenov und Markesberry (1999) wiesen einen Anstieg der GR- und GPx-mRNA-Spiegel im Hippokampus von Alzheimer-Patienten nach. Möglichkeiten der pharmakologischen Beeinflussung des GSH-Spiegels zum Beispiel durch Steroidhormone im Falle derartiger Erkrankungen können dadurch von großem neuro- und psychopharmakologischen Interesse sein. In den folgenden Abschnitten werden die eigenen Ergebnisse vergleichend zur vorhandenen Literatur aufgeteilt nach den verwendeten Zellsystemen dargestellt. Es wurden die Einflüsse von Glukortikoiden, gonadalen Steroiden und IL-6 in verschiedenen Konzentrationen und Inkubationszeiten auf die GSH-Spiegel untersucht

5.1. Einflüsse von Glukokortikoiden auf den GSH-Spiegel in HT22 Zellen

Für periphere Organsysteme existieren eine Reihe von Erkenntnissen darüber, dass Steroidhormone und insbesondere Glukokortikoide in der Lage sind, den GSH-Spiegel und die Aktivität von Enzymen des GSH-Stoffwechsels zu verändern. Kawamura et al. (1991) zeigten in aus Wistar Ratten isolierten Nierenglomeruli einen Anstieg der Aktivität der GPx am 10. Tag nach einer Behandlung mit 6-MP (15 mg/kg/Tag) für 9 Tage. Hicks et al. (1997) fanden in Lungen von adulten Ratten nach einer subkutanen Applikation von Dexamethason

(0.2 mg/100 μ l) eine Erhöhung der Aktivität der GPx. Sie konnten einen signifikanten Anstieg der Aktivität nach einer und nach zwei Std., sowie einen signifikanten Abfall nach drei Std. beobachten. In fetalen Rattenlungen führten hohe Konzentrationen von Dexamethason zu einem Zeit- und Dosis-abhängigen Anstieg der Aktivität der GPx (Asayama et al., 1992). Pereira et al. (1995) untersuchten die Regulation von antioxidativ wirksamen Enzymen in intraperitonealen Makrophagen und fanden nach einer 24-stündigen Glukokortikoid-Behandlung (2 mg/ml Dexamethason) eine reduzierte Aktivität der GPx. Dieselbe Arbeitsgruppe bestimmte die Aktivitäten dieser Enzyme in mesenterialen Lymphknoten, Milz, Thymus und in der Skelettmuskulatur. In Lymphknoten, Milz und Thymus stieg die GPx-Aktivität an, während es in der untersuchten Skelettmuskulatur zu einem Abfall kam (Pereira et al., 1999). Rahman et al. (1998) führten Messungen zur Regulation des GSH-Spiegels durch Dexamethason in alveolaren Epithelzellen durch und stimulierten Epithelzellkulturen mit 3 μ M Dexamethason für 1, 6 und 24 Std. Es kam zu einer zeitabhängigen Verminderung des intrazellulären GSH-Spiegels. Schon nach einer Stunde war ein signifikanter Abfall im Vergleich zur Kontrolle zu beobachten. Rajashree und Puvanakrisnan (1998) bestimmten den enzymatischen und nicht-enzymatischen antioxidativen Status im Herz und in der Niere von männlichen Wistar Ratten nach Dexamethason-Behandlung. Die Ratten erhielten subkutane Injektionen mit Dexamethason in einer Dosierung von 2.5 mg/kg/Woche an den Tagen 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 und 15. Im Herz wurde ein signifikanter Anstieg des GSH-Spiegels an den Tagen 4 und 8 gefunden. An den Tagen 12 und 16 traten keine signifikanten Veränderungen auf. Am Tag 4 nach dem Absetzen von Dexamethason wurde ein signifikanter Abfall beobachtet. Der GSH-Spiegel in der Niere zeigte in diesen Experimenten einen ähnlichen Verlauf. In Zusammenhang mit neuronalen Systemen existieren bislang nur sehr wenige Daten. McIntosh et al. (1998) zeigten in kinetischen Studien, dass Glukokortikoide die Aktivität der GPx im Hippokampus und im Kortex signifikant herabsetzen.

In den hier durchgeführten Untersuchungen zeigte sich in hippokampalen HT22 Zellen weder nach einer Kurzzeit- (1 und 3 Std.) noch nach einer Langzeitbehandlung (24 Std.) mit dem physiologischen Glukokortikoid der Nagetiere, Kortikosteron, eine Veränderung des GSH-Spiegels. Nach Inkubation mit den beiden synthetischen Glukokortikoiden Dexamethason und 6-MP traten jedoch vielfältige Effekte auf. Die Behandlung der HT22 Zellen mit Dexamethason (10^{-7} M) führte dabei jeweils zu einer Erhöhung des GSH-Spiegels, die nach 3 und nach 24 Std. ein signifikantes Niveau erreichten. Im Rahmen der weiteren Versuche mit diesem Steroid wurden Messungen des GSH-Gehalts nach Behandlungen mit 10^{-6} M und 10^{-7} M Dexamethason für 1, 4, 8, 12, 14, 24 und 36 Std. durchgeführt. Nach allen Inkubationszeiten mit diesem Steroid kam es zu einer Erhöhung des GSH-Spiegels. Das Maximum wurde bei beiden Konzentrationen nach 14 Std. erreicht. In der Peripherie (alveolare Epithelzellen) konnte dagegen eine Absenkung des GSH-Spiegels nach 1 und nach 24 Std. beobachtet werden (Rahman et al., 1998). Eine Inkubation mit 6-MP, dessen pharmakologische Verwendung in der Therapie von Rückenmarksverletzungen diskutiert wird (Bracken et al., 1997), führte nach 24 Std. zu der stärksten gemessenen Erhöhung des GSH Spiegels.

Von den in dieser Arbeit verwendeten Glukokortikoiden sind protektive Wirkungen in Zusammenhang mit einer hypoxischen Ischämie bekannt. Die Ergebnisse von Barks et al. (1991) zeigten, dass die Administration von Dexamethason vor einer zerebralen hypoxischen Ischämie den Schädigungen bei 7 Tage alten Ratten vorbeugen kann. Tuor und Del Bigio (1996) demonstrierten, dass eine vorherige Gabe von Kortikosteron ebenfalls die Schädigungen verringert. Auch vom 6-MP ist bekannt, dass es die Infarktgröße reduziert (Tuor et al., 1995). Im Falle des Dexamethasons ist untersucht worden, ob an der Neuroprotektion Aktivitätsveränderungen der antioxidativ wirksamen Enzyme beteiligt sind (Tuor et al., 1993b). Die Aktivitäten beider Formen der SOD, sowie die der Katalase und der

GPx waren in beiden Gruppen, mit oder ohne hypoxischer Ischämie, ähnlich. Effekte auf den GSH-Spiegel sind jedoch in diesem Zusammenhang nicht untersucht worden.

Auf der anderen Seite sind von Glukokortikoiden (Kortikosteron und Dexamethason) auch neurotoxische Wirkungen bekannt. So steigern sie die Empfindlichkeit von hippokampalen Neuronen gegenüber Amyloid β -Protein (A β) und Glutamat (Behl et al., 1997a). Eine Vorbehandlung von HT22 Zellen mit 10^{-6} M Kortikosteron oder Dexamethason für 20 Std. führte zu einem signifikanten Anstieg des durch Glutamat induzierten Zelltods. In einer weiteren Versuchsreihe wurden die Wirkungen der Glukokortikoide Kortikosteron und Dexamethason in den Konzentrationen 10^{-5} M, 10^{-7} M und 10^{-9} M nach 24 Std. auf die durch A β und Glutamat induzierte Toxizität bestimmt. Bei einer Steroidkonzentration von 10^{-5} M kam es zu einer signifikanten Herabsetzung der Überlebensrate der HT22 Zellen, was weder bei der Konzentration von 10^{-7} M noch bei einer Konzentration von 10^{-9} M der Fall war. Die toxischen Wirkungen zeigten sich also bei relativ hohen Steroidkonzentrationen (10^{-5} und 10^{-6} M). Bei Glukokortikoiden gilt eine Konzentration von 10^{-7} M als hohe physiologische Konzentration und Konzentrationen von 10^{-8} M und 10^{-9} M als normaler bis niedriger physiologischer Bereich (Brooke und Sapolsky, 2000). Im Falle der Konzentration von 10^{-7} M Dexamethason könnte der in der hier vorliegenden Arbeit beobachtete signifikante Anstieg des GSH-Spiegels nach einer entsprechenden Inkubation ein Grund für die nicht herabgesetzte Überlebensrate im Rahmen der Versuche von Behl et al. (1997a) sein.

Von 6-MP sind seit vielen Jahren neuroprotektive Eigenschaften bekannt (Hall, 1992). Es wird in der Behandlung von Rückenmarksverletzungen angewandt (Bracken et al., 1997). Die Rolle von freien Radikalen bei Verletzungen des zentralen Nervensystems wird seit längerem diskutiert. Liu et al. (1998) zeigten in einem Tiermodell der Rückenmarksverletzung bei der Ratte einen um fast das doppelte erhöhten Spiegel von Superoxid-Radikalen. Diese Erhöhung blieb für über 10 Std. erhalten. In einer weiteren Arbeit (Liu et al., 1999)

untersuchte dieselbe Arbeitsgruppe ebenfalls an der Ratte die durch Rückenmarksverletzungen induzierte Bildung von Wasserstoffperoxid und fand für einen Zeitraum von über 11 Std. einen signifikant erhöhten Gehalt. In der HT22 Zelllinie führte eine Langzeitbehandlung mit 6-Methylprednisolon zum stärksten in dieser ganzen Arbeit beobachteten signifikanten Anstieg des GSH-Spiegels. Hieraus lässt sich unter Berücksichtigung der bekannten neuroprotektiven Effekte von 6-MP und der Tatsache, dass GSH das Substrat von einem der beiden Wasserstoffperoxid verarbeitenden Enzyme ist, die Vermutung ableiten, dass die Erhöhung des GSH-Spiegels neben der Erniedrigung der Lipidperoxidation (Hall, 1992) ein wichtiger Bestandteil der Neuroprotektion durch 6-MP ist.

Dies erscheint umso wahrscheinlicher, da bekannt ist, dass der GSH-Spiegel ein bedeutender Faktor im Zusammenhang mit dem Überleben von Rückenmarksneuronen nach Verletzungen zu sein scheint. Es existieren eine Reihe von Studien, die sich mit dem GSH-Stoffwechsel und dessen möglicher Beeinflussung bei Rückenmarksverletzungen beschäftigen. Azbill et al. (1997) untersuchten die Aktivitäten antioxidativ wirksamer Enzyme und den GSH-Spiegel nach einer Rückenmarksverletzung in der Ratte. Sie führten eine Laminektomie (Resektion des gesamten Wirbelkörpers und der Dornfortsätze) auf Höhe des 10. Thorakalwirbels durch und fügten dem Rückenmark eine Quetschungsverletzung zu. Die Kontrolltiere wurden nur einer Laminektomie unterzogen. Die Tiere wurden 1, 4 und 24 Std. nach der Verletzung getötet. Die Aktivität der SOD zeigte keine Veränderungen. Die Aktivität der Katalase war nach einer Stunde unverändert, nach 4 Std. leicht erhöht und nach 24 Std. signifikant erhöht. Die Veränderungen des GSH-Spiegels zeigten deutliche Parallelen zur Katalase-Aktivität. Die Autoren postulieren, dass die Zellen mit einer erhöhten Katalase-Aktivität und einem erhöhten GSH-Spiegel auf oxidativen Stress reagieren. Da aber diese Reaktion relativ spät erfolgt, müssen diese antioxidativ wirksamen Systeme entweder relativ langsam reagieren oder aber der Spiegel der freien Radikale muss soweit ansteigen, dass es zu einer Signalwirkung kommt. Lucas et al. (1998) zeigten in einem in vitro Traumamodell an

embryonalen Rückenmarkszellen der Maus, dass eine vorherige Reduktion des GSH-Gehalts mit Buthioninsulfoximin, einem Hemmstoff der GSH-Synthese, zu einem dosisabhängigen Abfall des neuronalen Überlebens nach einer Dendrotomie führt. Andererseits aber konnten sie demonstrieren, dass ein durch eine vorherige Gabe von γ -Glutamylcystein hervorgerufener Anstieg des GSH-Spiegels zu einem signifikanten Anstieg der Überlebensrate der Neurone führt. In einem in vivo Modell (Wistar Ratten) prüften Kamencic et al. (2001), ob eine Gabe des Cystein-Vorläufers L-2-Oxothiazolidin-4-carboxylat zu einer Steigerung des GSH-Spiegels und einer Verringerung des oxidativen Stresses führt. Weiterhin wollten sie feststellen, ob reduzierter oxidativer Stress zu besseren Ergebnissen bei der Gewebe- und der Funktionserhaltung führt. Sie induzierten eine Kompressionsverletzung des Rückenmarks auf Höhe des sechsten thorakalen Wirbels. Die Rückenmarkssegmente auf Höhe des 3. Zervikalwirbels und auf Höhe des 3., 5., 6., 7. und 9. thorakalen sowie des 4. lumbalen Wirbels wurden entnommen. Für Verhaltensstudien zur Bestimmung der funktionalen Erholung wurden drei Tiergruppen gebildet. Die erste Gruppe wurde keiner Operation unterzogen. Die zweite Gruppe wurde der Operation und der Kompression des Rückenmarks unterzogen und die Tiere erhielten L-2-Oxothiazolidin-4-carboxylat. Die Tiere der dritten Gruppe wurden operiert und erhielten eine Salzlösung. Auf biochemischer Ebene bestimmten die Autoren unter anderem den GSH-Spiegel und die Aktivität der GR als Marker für oxidativen Stress im Gewebe des Rückenmarks, das jeweils 1, 3, 6, 24 und 48 Std. nach der Verletzung isoliert wurde. Die Messung des GSH-Spiegels ergab, dass eine Rückenmarksverletzung auf eine schnelle und umfangreiche Art und Weise zu oxidativem Stress führt. Auf Höhe des 6. thorakalen Wirbels, der Verletzungsstelle, kommt es innerhalb von einer Stunde zu einer Reduktion des GSH-Spiegels auf weniger als die Hälfte des normalen Gehalts. Im Verlauf der nächsten 48 Std. wurden weiterhin Absenkungen des GSH-Spiegels in so entfernten Bereichen wie dem des 3. zervikalen und dem des 4. lumbalen Wirbelkörpers beobachtet. Eine Laminektomie ohne Rückenmarksverletzung führte zu einem

10%igen Abfall des GSH-Spiegels im Bereich des 6. thorakalen Wirbels, zeigte aber keine Wirkungen in weiter entfernten Bereichen. Die große Verminderung des GSH-Spiegels an der Verletzungsstelle und den benachbarten Bereichen korrelierten mit einem signifikanten Abfall der Aktivität der GR im Bereich vom 3. bis zum 9. thorakalen Wirbels 24 Std. nach dem Trauma. Die Gabe von L-2-Oxothiazolidin-4-carboxylat nach dem Rückenmarkstrauma führte zu einer Erhöhung des GSH-Spiegels im Rückenmark und zu einer höheren Aktivität der GR verglichen mit den Tieren, die eine Salzlösung erhalten hatten. Eine neuere Untersuchung (Genovese et al., 2007) zeigt, dass endogenes GSH eine wichtige protektive Rolle im Zusammenhang mit Schädigungen durch eine experimentelle Rückenmarksverletzung bei Mäusen spielt. Kahraman et al. (2007) fanden keine Effekte einer Behandlung mit 6-MP auf den Spiegel von Produkten der LPO wie auch auf die Aktivitäten von Cu, Zn SOD und GPx nach einer experimentellen Rückenmarksverletzung bei Mäusen in Vergleich zu Tieren, bei denen die Operation nur simuliert wurde. Da man davon ausgeht, dass die Wirkungen von 6-MP im Rahmen von Rückenmarksverletzungen über Glukokortikoidrezeptoren vermittelt werden, untersuchten Yan et al. (1999) das Verhalten dieser Rezeptoren bei Rückenmarksverletzungen. Sie konnten einen vorübergehenden Rezeptorspiegelanstieg nachweisen.

GSH interagiert mit der Einleitungsphase der LPO durch eine Reduktion des Spiegels von freien Radikalen wie zum Beispiel dem Hydroxylradikal. Es limitiert die Zunahme der durch die LPO verursachten Schäden, indem es für die GPx als Kofaktor dient. GSH inhibiert weiterhin die Einleitungs- und die Vermehrungsphase durch seine Rolle bei der Regeneration von Ascorbat (Lucas et al., 1998). Es existieren einige Studien, die nahe legen, dass die durch die LPO hervorgerufene Zytotoxizität nicht auftritt, bevor der GSH-Spiegel nicht unter 10-15 % der Originalwerte gefallen ist (Annundi et al., 1979; Younes et al., 1981).

Berücksichtigt man die Ergebnisse der Untersuchungen zum GSH-Stoffwechsel bei Rückenmarksverletzungen und die zuletzt geschilderten Studien, also die Zusammenhänge zwischen GSH und der LPO, so kann man davon ausgehen, dass die Wirkung von 6-MP auf das GSH-System eine Rolle bei der Neuroprotektion durch dieses Hormon im Rahmen von Rückenmarksverletzungen spielt. Die Arbeit von Kamencic et al. (2001) zeigt, dass im Bereich der thorakalen Wirbel im Falle einer Rückenmarksverletzung der GSH-Spiegel drastisch absinkt, was sich über 48 Std. nach dem Insult hinaus bis in relativ weit entfernte Bereiche des Rückenmarks fortsetzt. Auch nach 24 Std. kommt es im Bereich des verletzten Rückenmarkssegments und den benachbarten Segmenten zu einem signifikanten Abfall des GSH-Spiegels. Im Gegensatz dazu fanden Azbill et al. (1997) einen signifikanten Anstieg des GSH-Gehalts nach einer Verletzung im Thorakalbereich des Rückenmarks nach 24 Std.. Beide Studien wurden mit Ratten durchgeführt. In den HT22 Zellen war schon nach einer einstündigen Inkubation mit 6-MP ein signifikanter Anstieg des GSH-Gehalts feststellbar und ebenso nach 24 Std., während in hippokampalen Primärkulturen erst nach 48 Std. ein signifikanter Anstieg des GSH-Spiegels zu beobachten war. In den beiden Tiermodellen wurden gegensätzliche Resultate gefunden. Folgt man dem Modell von Kamencic et al. (2000), so kann man davon ausgehen, dass ein wesentlicher Effekt der Gabe von 6-MP bei Rückenmarksverletzungen mindestens eine Wiederherstellung des ursprünglichen physiologischen GSH-Spiegels ist. In HT22 Zellen konnte in der hier vorliegenden Arbeit der größte überhaupt detektierte Effekt eines Steroids auf den GSH-Gehalt nachgewiesen werden. Es wurde mehr als das doppelte des Kontrollwertes erreicht. Auch schon nach einer Stunde wurde eine deutliche und signifikante Steigerung des GSH-Spiegels gefunden. Zu diesem Zeitpunkt hatten Kamencic et al.(2000) schon einen Abfall auf mehr als die Hälfte des ursprünglichen Wertes beobachtet. Man kann also auch schon zu diesem Zeitpunkt davon ausgehen, dass hier ein Effekt von 6-MP erfolgen kann. In hippokampalen Primärkulturen konnte nach 48 Std. ein deutlicher Effekt beobachtet werden. Zu diesem Zeitpunkt

beobachteten Kamencic et al. (2000) sogar in relativ weit von der Verletzungsstelle entfernten Bereichen einen deutlichen Abfall des GSH-Spiegels. Im Modell von Azbill et al. (1997) würde durch eine pharmakologische Gabe von 6-MP der durch die Rückenmarksverletzung hervorgerufene Anstieg des GSH-Spiegels und damit die körpereigene Schutzreaktion noch deutlich verstärkt werden.

5.2. Wirkungen von gonadalen Steroiden auf den GSH-Spiegel in HT22 Zellen

Gonadale Steroiden, insbesondere die Östrogene, sind für vielfältige (patho-) physiologische Vorgänge im zentralen Nervensystem verantwortlich. Ziele für die Aktionen von Östrogenen im zentralen Nervensystem sind das cholinerge System des basalen Vorderhirns, das serotoninerge System des Mittelhirns, das dopaminerge System des Mittelhirns und des Hypothalamus und seine Projektionen, das catecholaminerge System des Hirnstamms, der Hippokampus, das Rückenmark, Gliazellen und das zerebrale Gefäßsystem (McEwen, 1999). Im Hippokampus induzieren Östrogene die de novo Formation von Synapsen der pyramidalen Neurone unter Mitbeteiligung von N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptoren. Die Behandlung mit Östrogenen reguliert außerdem vorübergehend die γ -Aminobuttersäure- und Brain-derived Neurotrophic Faktor-Aktivität in Interneuronen herunter. Dieser Mechanismus kann durch Antiöstrogene blockiert werden (McEwen, 1999). Die Signalwirkung von Östrogenen kann sich über genomische wie auch über nichtgenomische Mechanismen entfalten. Bei den genomischen Mechanismen werden heute direkte und indirekte unterschieden. Direkte genomische Wirkungen werden über nukleare Rezeptoren (ER- α und ER- β), die als Transkriptionsfaktoren agieren, indem sie sich als Dimer an spezifische Elemente der DNA binden und die Expression von Zielgenen regulieren (Woolley, 1999), ausgeübt. Indirekte genomische Wirkungen der Östrogene werden über

membrangebundene und mit second messenger-Systemen gekoppelte Rezeptoren vermittelt (Lee und McEwen, 2001). Östrogene regulieren neuronale Funktionen jedoch nicht nur über langfristige genomische Mechanismen, sondern auch über sehr kurzfristige Effekte (Sekunden oder Minuten), die zu schnell ablaufen, als dass sie über genomische Mechanismen gesteuert sein könnten. Es sind über genomische und nicht genomische Mechanismen vermittelte neuroprotektive Wirkungen von Östrogenen bekannt. Vermutlich über genomische Wirkungen wird zum Beispiel die Protektion vor der durch Kainsäure oder durch eine Mischung von Kaliumzyanid und 2-Desoxyglukose hervorgerufenen Schädigung kortikaler Kulturen vermittelt (Wilson et al., 2000). In dieser Studie wurden die neuroprotektiven Effekte bei niedrigen Östrogen-Konzentrationen (1, 10 und 30 nM) beobachtet. Höhere Konzentrationen (>60 nM) führten zu keinem protektiven Effekt. Versuche mit 17 α -Östradiol, das nicht an den Östrogen-Rezeptor binden kann, zeigten ebenfalls keinen Effekt. Green et al. (1997) zeigten, dass Östradiol (0.2 und 2 nM) SK-N-SH Zellen einer humanen Neuroblastoma-Zelllinie gegen die Effekte einer Serumdeprivation schützen kann. Sowohl 17 β -Östradiol als auch 17 α -Östradiol übten einen neuroprotektiven Effekt auf die Zellen aus. Ein zehnfaches molares Übermaß an Tamoxifen antagonisierte nur ungefähr ein Drittel der protektiven Wirkung beider Isomere des Östradiols. Hieraus lässt sich schließen, dass diese Wirkungen nicht über einen rezeptorvermittelten Vorgang ablaufen.

In peripheren Organsystemen existieren einige Untersuchungen über den Einfluss von gonadalen Steroiden auf den GSH-Spiegel und antioxidativ wirksame Enzymsysteme. Suojanen et al. (1980) fanden einen Anstieg des GSH-Spiegels im Uterus von Ratten nach einer täglichen pharmakologischen Dosis von 0.4 μ g 17 β -Östradiol. Kim et al. (1998) untersuchten den Effekt einer zweiwöchigen Behandlung mit 17 β -Östradiol auf den myokardialen GSH-Gehalt bei Hunden und in isolierten Rattenherzen, die einer kurzen koronaren Ischämie und Reperfusion ausgesetzt waren. 17 β -Östradiol führte zu einem

Anstieg des myokardialen GSH-Gehalts und zeigte einen protektiven Effekt unter ischämischen Bedingungen. Azevedo et al. (2001) zeigten, dass Östrogen in peritonealen Makrophagen von Ratten, denen das Ovar entfernt worden war, den dadurch hervorgerufenen Abfall der Aktivität der GPx im Gegensatz zum kleineren Effekt von Progesteron voll aufhebt. In neuronalen Systemen sind einige wenige Untersuchungen über die Effekte von gonadalen Steroiden auf das antioxidativ wirksame System durchgeführt worden. Pajovic et al. (1999) beschäftigten sich mit den Wirkungen von Progesteron und Östradiolbenzoat auf die Aktivitäten von Enzymen des GSH-Stoffwechsels in Gesamthirnhomogenaten weiblicher Ratten, denen das Ovar entfernt worden war. Die Aktivität der GPx wurde durch Östradiolbenzoat nach 24 Std. nicht beeinflusst, während Progesteron nach 24 Std. die Aktivität ansteigen ließ. Auch die Aktivität der GR wurde durch eine 24stündige Behandlung mit Progesteron erhöht, während sie nach 2 Std. durch Östradiolbenzoat herabgesetzt wurde. Atroshi et al. (1990) untersuchten den Einfluss von Testosteron auf den GSH-Spiegel in Gesamthirnhomogenaten der Ratte. Die Ratten erhielten eine Dosis von 100 mg/kg und das Gehirn wurde nach drei Tagen zur GSH-Bestimmung verarbeitet. Dabei konnten sie einen signifikanten Anstieg des GSH-Gehalts feststellen. Ahlbom et al. (1999) konnten in zerebellären granulären Neuronen der Ratte keinen Effekt von Testosteron auf den intrazellulären GSH-Spiegel nachweisen.

In der in dieser Arbeit verwendeten hippokampalen HT22 Zelllinie konnten keine Östrogenrezeptoren nachgewiesen werden. Bei den an diesen Zellen beschriebenen protektiven Wirkungen von Östrogenen handelt es sich folglich um Rezeptor-unabhängige Mechanismen (Behl et al., 1995).

Von gonadalen Steroiden ist neben den Effekten in peripheren Organsystemen auch in neuronalen Systemen eine Vielzahl von protektiven Wirkungen beschrieben. Dies gilt sowohl für die Östrogene als auch für das Progesteron und das Testosteron. Auf zellulärer Ebene sind

in vielen neuronalen Systemen protektive Wirkungen von Östrogenen bekannt. Goodman et al. (1996) berichten, dass 17β -Östradiol in kultivierten hippocampalen Neuronen nach zweistündiger Vorbehandlung in einem Konzentrationsbereich von 100 nM bis 10 μ M gegen die Toxizität von Glutamat, FeSO_4 -Toxizität und Amyloid β -Peptid sowie vor dem Entzug von Glukose schützt. Sawada et al. (1998) untersuchten den Effekt von 17β -Östradiol in Zusammenhang mit der durch Glutamat, Superoxid-Anionen und Wasserstoffperoxid vermittelten Toxizität in neuronalen Primärkulturen des ventralen Mesenzephalon der Ratte. Die Zellen wurden vorher für 24 Std. in einem Medium, das 100 μ M 17β -Östradiol enthielt, inkubiert. 17β -Östradiol schwächt die Toxizität sowohl des Glutamats als auch des Wasserstoffperoxids ab. Die Verwendung des Östrogenrezeptor-Antagonisten Tamoxifen blockiert die Neuroprotektion nicht signifikant. Andere Steroide wie Kortikosteron und Testosteron zeigten in dieser Versuchsanordnung keine protektiven Wirkungen gegen die Toxizität von Glutamat. Vedder et al (1999) beschäftigten sich mit den Effekten von Östrogenen (10 μ M) auf die Lipidperoxidation in Rattenhirnhomogenaten, hippocampalen HT22 Zellen, neokortikalen Primärkulturen der Ratte und menschlichen Hirnhomogenaten. In allen Systemen konnte eine Reduktion der Lipidperoxidation festgestellt werden. In einer weiteren Arbeit konnten Vedder et al. (2000) zeigen, dass Östrogene HT22 Zellen gegen die durch Wasserstoffperoxid induzierte Toxizität schützen können. Die Zellen wurden für 22 Std. mit Östrogenen inkubiert. In diesen Arbeiten wurden hohe supraphysiologische Konzentrationen von 17β -Östradiol verwendet. Neuroprotektive Wirkungen dieses Hormons konnten aber auch schon bei Konzentrationen von 0.2-2 nM beobachtet werden. Green et al. (1996) zeigten, dass 17β -Östradiol in diesen Konzentrationen gegen die durch β -Amyloid(25-35) induzierte Toxizität in menschlichen Neuroblastomazellen effektiv ist. In der vorliegenden Arbeit wurden die Steroide in physiologischen Konzentrationen (10^{-7} M) eingesetzt. In allen verwendeten Zellsystemen so auch in der hippocampalen HT22 Zelllinie

und in hippokampalen Primärkulturen konnte nach einer Inkubationszeit von 24 Std. ein signifikanter Anstieg des GSH-Spiegels beobachtet werden. In HT22 Zellen konnten keine Kurzzeiteffekte von 17β -Östradiol nachgewiesen werden. In hippokampalen Primärkulturen konnte dagegen nach 3 Std. eine signifikante Erniedrigung des GSH-Gehalts festgestellt werden, während nach einer Stunde auch hier kein Effekt zu beobachten war.

Auch von dem weiteren verwendeten weiblichen gonadalen Steroid, dem Progesteron, sind verschiedene protektive Wirkungen im zentralen Nervensystem beschrieben worden. Aus pharmakologischer Sicht ist in diesem Zusammenhang von Bedeutung, dass es sich in einigen Fällen um Effekte handelt, bei denen die Progesterongabe nach dem Insult stattgefunden hat. Jiang et al. (1996) zeigten, dass sowohl eine Behandlung mit Progesteron (4 mg/kg) vor wie auch nach einem vorübergehenden Verschluss der mittleren zerebralen Arterie in männlichen Ratten eine Reduktion des zerebralen Infarktes und eine Verbesserung der neuronalen Funktionen bewirken. Dies galt in dieser Studie aber nur für das in Dimethylsulfoxid lösliche Progesteron, nicht jedoch für das wasserlösliche. Chen et al. (1999) demonstrierten, dass wasserlösliches Progesteron in einer Dosis von 8 mg/kg in Form einer intravenösen Injektion 2 Std. nach Beginn des Verschlusses der mittleren zerebralen Arterie signifikant das Infarktvolume verringert und ebenso signifikant die Ergebnisse auf dem Gebiet der neurologischen funktionalen Tests verbessert. Mit Progesteron-Konzentrationen von 4 mg/kg und 32 mg/kg konnten diese Ergebnisse nicht erzielt werden. Thomas et al. (1999) demonstrierten, dass Progesteron (4 mg/kg) nach einer experimentellen Rückenmarksverletzung bei der Ratte neuroprotektiv wirkt, wenn beginnend 30 Minuten nach der Verletzung das Steroid 5 Tage lang verabreicht wird. Die behandelten Tiere zeigen sowohl im klinischen wie auch im histologischen Bereich bessere Resultate. Auch für den Bereich des Hippokampus sind protektive Wirkungen des Progesterons bekannt. Gonzalez-Vidal et al. (1998) behandelten ovariectomierte Ratten 7 Tage vor und 7 Tage nach einer akuten globalen Ischämie mit Progesteron (10 mg/kg/Tag). Die akute globale Ischämie führte ohne

Behandlung besonders in den Arealen CA1 und CA2 des Hippokampus zu einem schweren Verlust von Neuronen. Dieser Verlust wurde durch die Behandlung mit Progesteron signifikant reduziert. In der HT22 Zelllinie konnten in der vorliegenden Arbeit keine Kurzzeiteffekte einer Inkubation mit Progesteron beobachtet werden, während eine Behandlung für 24 Std. zu einem signifikanten Abfall des GSH-Spiegels führte. Dagegen war in hippokampalen Primärkulturen ein signifikanter Anstieg zu beobachten. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass der Anstieg des GSH-Spiegels bei den neuroprotektiven Effekten in den Tierversuchen des Progesterons eine Rolle spielt. Darauf weisen auch die Ergebnisse der Arbeit von Nilsen und Brinton (2002) hin. Sie fanden einen signifikanten protektiven Effekt von Progesteron (48 Std., 3×10^{-8} M) in hippokampalen Primärkulturen.

Auch für das männliche gonadale Steroid Testosteron sind in der Literatur neuroprotektive Wirkungen beschrieben. Hammond et al. (2001) untersuchten den Effekt von Testosteron und Testosteronderivaten in physiologischen Konzentrationen auf Kulturen primärer humaner Neurone, die einer Serumdeprivation ausgesetzt worden waren. Diese Serumdeprivation induziert in signifikanter Weise die Apoptose der Zellen. Testosteron in physiologischen Konzentrationen erwies sich in dieser Versuchsanordnung als neuroprotektiv. Da der Androgenantagonist Flutamid diese Neuroprotektion aufhebt, kann man davon ausgehen, dass es sich in diesem Fall bei der Wirkung des Testosterons um einen durch Rezeptoren vermittelten Vorgang handelt. Ahlbom et al. (2001) demonstrierten ebenfalls eine Rezeptor-vermittelte Neuroprotektion durch Testosteron. Sie zeigten, dass dieses Steroid (10^{-6} M) zerebelläre granuläre Zellen vor dem durch oxidativen Stress induzierten Zelltod schützen kann. Wurden diese Neurone mit Testosteron behandelt, so waren sie weniger empfindlich gegen durch Wasserstoffperoxid induzierte Schädigungen. Zuvor war im Wesentlichen bekannt, dass Testosteron neuroprotektive Effekte im Bereich der Motorneurone ausüben kann (Kujawa et al., 1989; Kujawa et al., 1995; Perez et al., 1996). Nach einer Behandlung von HT22 Zellen mit 10^{-7} M Testosteron konnte in der hier vorliegenden Arbeit in den

Kurzzeitversuchen (eine und drei Std.) ein Anstieg des GSH-Spiegels beobachtet werden, der dann nach 24 Std. ein deutlich signifikantes Niveau erreichte. Effekte von Testosteron auf den GSH-Spiegel im zentralen Nervensystem sind bisher in zwei Untersuchungen berücksichtigt worden. Dabei bestimmten Atroschi et al. (1990) den Effekt einer Behandlung von Mäusen mit Testosteronpropionat (100 mg/kg) drei Tage vor deren Dekapitierung. Sie fanden im Gesamthirnhomogenat einen signifikanten Anstieg des GSH-Spiegels. Auch im Rahmen der zweiten Untersuchung wurden die Tiere (Ratten) mit Testosteronpropionat (500µg) behandelt (Ahlbom et al., 1999). Dies geschah am dritten postnatalen Tag. Am 7. Tag wurden dann zerebelläre granuläre Zellen präpariert. Im Vergleich zu den Kontrollen konnten sie keine signifikanten Unterschiede feststellen. Beide Arbeiten lassen sich aber aufgrund der Versuchsbedingungen (Testosteronmenge, Wirkungszeitraum des Hormons) kaum mit der hier vorliegenden Versuchsanordnung vergleichen. Pike (2001) demonstrierte, dass Testosteron kultivierte hippokampale Zellen aus Rattenembryonen (Embryonaltag 18) gegen die Toxizität von Amyloid β schützen kann. Dieser protektive Effekt konnte bei Konzentrationen von 1, 10 und 100 nM beobachtet werden. In der vorliegenden Arbeit konnte nach einer Behandlung mit 100 nM Testosteron ein signifikanter Anstieg des GSH-Gehalts in hippokampalen HT22 Zellen beobachtet werden. In hippokampalen Primärkulturen kam es ebenfalls zu einem wenn auch nicht signifikanten Anstieg des GSH-Spiegels. Berücksichtigt man dazu noch die Erkenntnis von Mark et al. (1997a), dass GSH die Schädigung durch Amyloid β vermindern kann, so kann man davon ausgehen, dass der durch Testosteron hervorgerufene Anstieg des GSH-Spiegels einen wesentlichen Bestandteil der Neuroprotektion gegen Amyloid β darstellt.

5.3. Einflüsse von Glukokortikoiden auf den GSH-Spiegel in neuronalen Primärkulturen

Neben der hippokampalen HT22 Zelllinie wurden in dieser Arbeit im Bereich der neuronalen Zellsysteme hippokampale und neokortikale Primärkulturen, die aus 18 Tage alten Rattenembryonen gewonnen wurden, verwendet. Mit den Primärkulturen wurden im wesentlichen Langzeitexperimente durchgeführt. Zwischen den HT22 Zellen und den hippokampalen Primärkulturen zeigten sich zum Teil Übereinstimmungen zum Teil aber auch einige wesentliche Unterschiede bei den Effekten der Behandlung mit Steroiden. Führt in HT22 Zellen die Behandlung mit beiden synthetischen Glukokortikoiden (Dexamethason und 6-MP) zu einem signifikanten Anstieg des GSH-Spiegels, so zeigte sich in hippokampalen Primärkulturen ein solcher Anstieg nach 24 Std. nur nach einer Behandlung mit Dexamethason. Erst nach 48 Std. wurde ein signifikanter Anstieg des GSH-Spiegels nach einer Behandlung mit 6-MP beobachtet. Im Falle des Kortikosterons konnten in beiden Zellarten wie auch in der neuronalen Zelllinie keine Veränderungen nachgewiesen werden. In der Literatur existieren bis jetzt keine Untersuchungen über die Wirkung von Glukokortikoiden auf den GSH-Gehalt von anderen neuronalen Primärkulturen.

5.4. Einflüsse von gonadalen Steroiden auf den GSH-Spiegel in neuronalen Primärkulturen

Unter den gonadalen Steroiden verhielt sich das 17 β -Östradiol in beiden Zellarten gleich. Es führte zu einem signifikanten Anstieg des GSH-Gehalts. Den deutlichsten Unterschied zwischen Zelllinie und Primärkultur zeigt das Verhalten des Progesterons. Während es in HT22 Zellen zu einem signifikanten Abfall des GSH-Spiegels kam, zeigte sich in hippokampalen Primärkulturen ein signifikanter Anstieg. Das Testosteron führte in beiden

Fällen zu einem Anstieg, der aber nur in HT22 Zellen signifikant war. In der Literatur sind Effekte von Steroidhormonen auf hippokampale Primärkulturen beschrieben. Goodman et al. (1996) zeigten, dass Östrogen hippokampale Neurone in Kultur gegen Glutamat-Toxizität, Glukose-Deprivation, Fe₂SO₄-Toxizität und Amyloid β -Peptid-Toxizität schützen kann. Die Toxizität der verschiedenen Insulte war nach einer Vorbehandlung der Kulturen mit 100nM-10 μ M 17 β -Östradiol oder Progesteron für 2 Std. signifikant abgeschwächt. Im Gegensatz dazu verstärkte Kortikosteron die durch Glutamat, Fe₂SO₄ und Amyloid β -Peptid hervorgerufenen Schäden. Weitere Steroide wie Testosteron zeigten keine Effekte.

In neokortikalen Primärkulturen der Ratte konnte nur nach einer Langzeitinkubation mit 17 β -Östradiol ein Effekt und zwar ein signifikanter Anstieg des GSH-Spiegels beobachtet werden. Bei keinem der fünf anderen Steroide zeigte sich ein signifikanter Effekt. Singer et al. (1996) zeigten, dass die Vorbehandlung mit 17 β -Östradiol für 24 Std. gegen die Toxizität von Glutamat schützen kann. Der maximale protektive Effekt wurde bei einer Hormonkonzentration von 15 und von 50 nM beobachtet. Brinton et al. (1997) demonstrierten, dass bestimmte neokortikale Neurone, die 17 β -Östradiol (1 nM) ausgesetzt wurden, eine größere Viabilität und ein vermehrtes Überleben als Kontrollneurone aufwiesen. 17 β -Östradiol (10⁻⁶ M) reduziert in primären neokortikalen Neuronen ebenfalls die Eisen-induzierte LPO und steigert die Zahl der überlebenden Neurone (Vedder et al., 1999).

5.5. Einflüsse von Glukokortikoiden auf den GSH-Spiegel in Gliazellen

Als Beispiel für Gliazellen wurde in dieser Arbeit eine C₆ Glioma-Zelllinie verwendet. Diese Zellen kann man als undifferenzierte Astrozyten ansehen. Für C₆ Zellen sind in der Literatur Effekte von Dexamethason und protektive Effekte von Östrogenen wenn auch in geringerem Umfang als für neuronale Zellsysteme beschrieben worden. Morita et al. (1999)

zeigten, dass Dexamethason den durch Serumdeprivation induzierten nekrotischen Zelltod signifikant verstärkt. Dexamethason wurde in einer Konzentration von 1 μ M für 24, 48 und 72 Std. eingesetzt. Der Effekt war in allen Fällen zu beobachten. Weiterhin bestimmten sie die Überlebensrate der Zellen in serumfreien Medium nach Behandlungen mit 0.01, 0.1 und 1.0 μ M Dexamethason und Kortikosteron für 48 Std. und zeigten für Dexamethason, dass bei allen Konzentrationen die Überlebensrate signifikant erniedrigt war. Eine Behandlung mit Kortikosteron führte bei den Konzentration von 0.1 und 1.0 μ M zu einem signifikanten Abfall der Überlebensrate der Zellen. Über Effekte des synthetischen Glukokortikoids 6-MP auf C₆ Zellen ist in der Literatur bisher noch nichts bekannt.

Im Gegensatz zur verwendeten neuronalen Zelllinie konnten in der Gliazelllinie Effekte des physiologischen Glukokortikoids der Nagetiere, Kortikosteron, beobachtet werden. Führt in C₆ Zellen eine einstündige Inkubation mit diesem Hormon noch zu einem signifikanten Anstieg des GSH-Spiegels, so zeigte sich nach 3 Std. kein Effekt und nach 24 Std. kam es zu einem signifikanten Abfall des GSH-Gehalts auf dreiviertel des Kontrollwertes. Bei derselben Konzentration beobachteten Morita et al. (1999) in Langzeitversuchen eine signifikante Herabsetzung der Überlebensrate der Zellen nach Wegnahme des Serums. Im Falle des Dexamethasons waren in C₆ Zellen nur Kurzeffekte zu beobachten. Wie schon im Fall des Kortikosterons konnten Morita et al. (1999) einen signifikanten Abfall der Überlebensrate der Zellen bei Serumdeprivation nach Dexamethasongabe beobachten. Gorman et al. (2000) untersuchten den Effekt der Vorbehandlung mit Dexamethason auf die durch Staurosporin induzierte Apoptose in Gliomazellen. Der protektive Effekt von Dexamethason war in diesem Fall Zeit- und Dosis-abhängig. Eine maximale Protektion wurde nach einer Vorbehandlungszeit von 24 Std. bei einer Konzentration von 100 nM und höher beobachtet. Nach dieser Inkubationszeit und mit dieser Steroidkonzentration konnte in der C₆ Zelllinie kein Effekt des Steroids auf den GSH-Spiegel festgestellt werden. Nach den Behandlungen mit dem weiteren synthetischen

Glukokortikoid 6-Methylprednisolon kam es nach 24 Std. zu einem signifikanten Rückgang des GSH-Spiegels. Kurzzeiteffekte traten nicht auf. Damit konnte der starke Anstieg nach einer Langzeitbehandlung, der in der neuronalen Zelllinie zu beobachten war, in der Gliazelllinie nicht gezeigt werden.

5.6. Einflüsse von gonadalen Steroiden auf den GSH-Spiegel in Gliazellen

In vitro verfügen Gliomazellen nicht über Östrogenrezeptoren (Zhang et al., 1992). Im Zusammenhang mit Östrogenen sind wie auch in neuronalen Zellsystemen eine Reihe von protektiven Effekten bekannt. So zeigten Bishop und Simpkins (1994), dass eine Zugabe von 17β -Östradiol zu serumfreiem Medium die Überlebensrate von C_6 Zellen innerhalb von 24 Std. um 40% und um 75% nach 96 Std. erhöht. Shy et al. (2000) wiesen nach, dass 17β -Östradiol in C_6 Glioma 2B Klon Zellen nach einer Vorbehandlung mit 0.01 mM Östradiol signifikant den durch eine Glutamat-Behandlung induzierten Zelltod reduziert. In den hier vorliegenden Untersuchungen konnte nach Inkubationszeiten von 3 und 24 Std. mit 17β -Östradiol ein signifikanter Anstieg des GSH-Spiegels beobachtet werden. Eine Behandlung mit Progesteron führte nur zu einem Langzeiteffekt (signifikante Erniedrigung des GSH-Gehalts). Eine Inkubation mit Testosteron führte nach 3 Std. zu einer signifikanten Erniedrigung und nach 24 Std. zu einer signifikanten Erhöhung des GSH-Spiegels. Nach einer Stunde zeigte sich kein Effekt. Über Wirkungen der beiden letztgenannten Steroide (Progesteron und Testosteron) auf diese Zellen ist in der Literatur bislang noch nichts bekannt. Damit ergab sich bei den Langzeitinkubationen in der verwendeten Gliazelllinie im Prinzip dasselbe Bild wie in der neuronalen Zelllinie im Gegensatz zu der Konstellation bei den Glukokortikoiden.

5.7. Effekte von IL-6 auf den GSH-Spiegel in hippokampalen Zellsystemen

Weiterhin wurden Effekte von IL-6 auf den GSH-Spiegel in hippokampalen Zellsystemen (HT22 Zellen, hippokampale Primärkulturen) untersucht. Von verschiedenen Interleukinen sind Effekte auf den GSH-Spiegel bekannt. Grzybowski et al. (2000) untersuchten den Effekt von Interleukin-1 β auf den GSH-Spiegel in humanen peritonealen mesothelialen Zellen und fanden nach 24 Std. einen herabgesetzten GSH-Gehalt. Aidoo et al. (1991) wiesen in Kulturen von Lymphozyten der Ratte einen erhöhten GSH-Spiegel nach Behandlung mit IL-2 nach. Auch in B16 Melanoma-Zellen der Maus konnte ein durch IL-2 induzierter Anstieg des GSH-Gehalts gezeigt werden (Palomares et al., 1997). Weiterhin sind vom Interleukin-4 Wirkungen auf das GSH beschrieben. In B-Lymphozyten ist ein erhöhter GSH-Spiegel nach Behandlung mit IL-4 bekannt (Lemaire et al, 1999). Effekte von IL-6 auf den GSH-Spiegel und die Enzyme des GSH-Stoffwechsels sind bisher erst in einem Fall beschrieben. Hack et al. (1996) bestimmten den GSH-Gehalt in Leber- und Muskelgewebe von mit IL-6 behandelten Mäusen. Sie zeigten einen signifikanten Anstieg der Aktivität des Schrittmacherenzyms der GSH-Synthese, der γ -GCS. Über Effekte von Interleukinen und insbesondere IL-6 auf den GSH-Metabolismus in neuronalen Systemen war bisher noch nichts bekannt. Eine Behandlung von HT22 Zellen mit 0.5 ng/ml IL-6 führte nach verschiedenen Inkubationszeiten zu einem signifikanten Anstieg des GSH-Spiegels. Das Maximum lag bei einer Behandlungszeit von 15 Std.. Im Gegensatz dazu war bei einer Konzentration von 1.0 ng/ml der maximale Anstieg nach einer Inkubationszeit von 24 Std. zu beobachten. In hippokampalen Primärkulturen der Ratte kam es nach einer Behandlung mit 1.0 ng/ml IL-6 zu einem maximalen Anstieg nach 48 Std.. Neuroprotektive Effekte von IL-6 wurden im Wesentlichen bei höheren Konzentrationen dieses Interleukins beobachtet. In Kulturen von fetalen dopaminergen Neuronen der Ratte schützt IL-6 gegen die Toxizität von 1-Methyl-4-phenylpyridinium (Akaneya et al., 1995). Dieser Effekt war bei einer

Konzentration von 10 ng/ml zu beobachten. Kushima et al. (1992) beschreiben IL-6 als einen neurotrophen Faktor, der das Überleben von catecholaminergen Neuronen von fötalen und postnatalen Mittelhirnen der Ratte fördert. Die optimale Dosis für diesen Effekt war 5 ng/ml. Auch in hippocampalen Zellen sind neuroprotektive Wirkungen von IL-6 bekannt. So zeigten Yamada und Hatanaka (1994), dass IL-6 in einer Konzentration von 50 ng/ml hippocampale Neurone gegen den durch Glutamat induzierten Zelltod schützt. Weitere Effekte von IL-6 auf das Überleben von Neuronen wurden in cholinergen Zellkulturen (Hama et al., 1989) und in kultivierten mesenzephalen catecholaminergen und septalen cholinergen Neuronen (Hama et al., 1991) gefunden. Weiterhin legen die Ergebnisse von Matsuda et al. (1996) nahe, dass IL-6 protektive Effekte auf ischämische hippocampale Neurone ausübt. Auf der anderen Seite sind aber auch mögliche neurotoxische Effekte von IL-6 beschrieben worden. Ma und Zhu (2000) fanden eine signifikant verringerte Überlebensrate von primären hippocampalen Neuronen nach einer Behandlung der Zellen mit Interleukinkonzentrationen von 4, 40 und 400 ng/ml IL-6. Qui et al. (1998) demonstrierten, dass eine chronische Behandlung mit IL-6 von sich entwickelnden zerebralen granulären Neuronen die Membran- und die augenblickliche Reaktion auf N-Methyl-d-Aspartat ansteigen lässt. Diese Varianten der funktionalen Reaktionen in den verschiedenen Modellen sind wahrscheinlich auf die verschiedenen Zelltypen und ihre verschiedenen Entwicklungsstadien zurückzuführen (Benveniste, 1998). In den vorliegenden Untersuchungen wurden in hippocampalen Zellen unter den meisten eingesetzten Bedingungen signifikante Anstiege des GSH-Spiegels gefunden. Diese Daten legen nahe, dass die signifikanten Erhöhungen des GSH-Gehalts eine Rolle im Rahmen der neuroprotektiven Wirkungen dieses Zytokins spielen könnten. Nur höhere Konzentrationen führen zu einem herabgesetzten GSH-Spiegel. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass IL-6 den GSH-Gehalt in hippocampalen Zellsystemen in einer Zeit- und Dosis-abhängigen Weise reguliert.

5.8. Effekte von Glukokortikoiden auf die Katalase-Aktivität in HT22 Zellen

Neben der GPx mit dem Tripeptid GSH als Kosubstrat ist die Katalase das zweite Enzymsystem, das an der Entsorgung von Wasserstoffperoxid beteiligt ist. Die Mitochondrien verfügen jedoch nicht über dieses Enzym und sind somit auf die GPx mit GSH als Substrat zur Verarbeitung des anfallenden Wasserstoffperoxids angewiesen. In der Zelle gilt die Katalase als Marker für die Peroxisomen, die überall im Zytoplasma verbreitet sind. Katalase-Aktivität lässt sich sowohl in Neuronen wie auch in Gliazellen nachweisen (Moreno et al., 1995). In peripheren Organsystemen sind Effekte von Steroiden auf die Katalase-Aktivität bekannt (Asayama et al., 1992; Azevedo et al., 2001; Dabrosin et al., 1998; Hicks et al., 1997; Kawamura et al., 1991; Pereira et al., 1995 und 1999; Rajashree und Puvanakrishnan, 1998; Yoshioka et al., 1990). Im Vergleich zum GSH traten nach Inkubation von HT22 Zellen mit Glukokortikoiden (Kortikosteron, Dexamethason und 6-Methylprednisolon) ausschließlich Kurzzeiteffekte nach einer und nach drei Std. auf. Nach einer einstündigen Behandlung mit diesen Steroiden war nach Inkubation mit Kortikosteron und 6-MP ein signifikanter Abfall der Katalase-Aktivität zu beobachten, während es nach drei Std. mit allen drei Glukokortikoiden zu einem signifikanten Anstieg der Aktivität der Katalase kam. Auch Hicks et al. (1997) beobachteten nach einer dreistündigen Behandlung mit Dexamethason (0.2 mg/100µl) einen Anstieg der Aktivität dieses Enzyms in der Lunge von adulten Ratten. Langzeiteffekte (24 Std.) von Glukokortikoiden konnten in HT22 Zellen nicht beobachtet werden. Kawamura et al. (1991) konnten nach vier Tagen eine signifikante Erhöhung in Nierenglomeruli von Ratten nach einer Behandlung mit 6-MP finden. Pereira et al. (1999) beschrieben nach einer Dexamethason-Injektion (1 mg/kg Körpergewicht) eine reduzierte Aktivität in den mesenterialen Lymphknoten und dem Thymus und eine gesteigerte Aktivität in der Milz und in Skelettmuskeln nach drei Tagen.

5.9. Effekte von gonadalen Steroiden auf die Katalase-Aktivität in HT22 Zellen

Während im Falle der gonadalen Steroide in HT22 Zellen ausschließlich Langzeiteffekte (24 Std.) auf den GSH-Spiegel auftraten, konnten bei der Messung der Katalase-Aktivität sowohl Kurzzeit wie auch Langzeiteffekte beobachtet werden. Die Behandlung mit den verwendeten Steroiden führte im Rahmen der Langzeitinkubation in allen drei Fällen zu einer signifikanten Absenkung der Katalase-Aktivität, während bei der GSH-Bestimmung hier nach Behandlung mit 17β -Östradiol und mit Testosteron ein signifikanter Anstieg des Gehalts zu beobachten war. Progesteron führte nach einer Stunde und Testosteron nach beiden Kurzzeitinkubationen zu einem signifikanten Anstieg der Katalase-Aktivität. Ahlbom et al. (2001) fanden in zerebellären granulären Zellen nach einer Behandlung für 48 Std. mit 10^{-6} M Testosteron einen signifikanten Anstieg der Katalase-Aktivität. Mit einem weiteren gonadalen Steroid, dem Östrogen Estron, konnte in der hier vorliegenden Arbeit ebenfalls nach 24 Std. wie mit allen anderen verwendeten gonadalen Steroiden ein signifikanter Abfall der Katalase-Aktivität beobachtet werden. Mit Testosteron wurde eine Dosis-Wirkungs-Kurve nach einer Inkubation von einer Std. im Konzentrationsbereich von 10^{-4} - 10^{-8} M erstellt. Eine Behandlung der Zellen mit einer Hormonkonzentration von 10^{-5} M führte zur höchsten in dieser Arbeit gemessenen Steigerung der Katalase-Aktivität. Neuere Studien beobachten ebenfalls eine Erhöhung der Katalase-Aktivität nach Behandlung von Neuroblastomazellen mit Testosteron (Chisu et al., 2007). Weitere Versuche in Rahmen der vorliegenden Arbeit zeigten eine neuroprotektive Wirkung von Testosteron gegen eine Schädigung der Zellen mit Wasserstoffperoxid unter diesen Versuchsbedingungen.

5.10. Effekte von Glukokortikoiden auf die Katalase-Aktivität in C₆ Zellen

Im Gegensatz zur neuronalen HT22 Zelllinie waren in der Gliazelllinie (C₆ Zellen) auch Langzeiteffekte aber weniger Kurzzeiteffekte der Glukokortikoide auf die Katalase-Aktivität zu beobachten. Inkubation mit dem physiologischen Glukokortikoid Kortikosteron und mit Dexamethason führten zu einer signifikanten Steigerung der Katalase-Aktivität. Generell lässt sich zum Bereich der Glukokortikoide für die beiden verwendeten Zelllinien feststellen, dass in Kurzzeitversuchen (1 und 3 Std.) eher eine Reaktion in der neuronalen Zelllinie erfolgt, während sich bei Langzeitversuchen (24 Std.) ausschließlich Effekte in der Gliazelllinie zeigten. Weitere Erkenntnisse über die Wirkung von Glukokortikoiden auf die Katalase-Aktivität in glialen Zellkulturen sind in der Literatur nicht beschrieben.

5.11. Effekte von gonadalen Steroiden auf die Katalase-Aktivität in C₆ Zellen

Die gonadalen Steroide übten wie auch in HT22 Zellen in C₆ Zellen sowohl Kurzzeit- als auch Langzeiteffekte aus. Kam es bei den Langzeitversuchen im Falle der Hippokampuszelllinie jedoch in allen drei Fällen zu einem signifikanten Abfall der Aktivität des Enzyms, so führte hier eine Inkubation mit 17 β -Östradiol und mit Progesteron zu einem signifikanten Anstieg der Aktivität. Eine Langzeitbehandlung mit Testosteron zeigte keine Wirkung. Auch die in HT22 Zellen zu beobachtenden signifikanten Zunahmen (1 Std.: 17 β -Östradiol und Testosteron; 3 Std.: Testosteron) der Aktivität waren in der glialen Zelllinie nicht zu beobachten. Es kam im Gegenteil dazu im Falle des Testosterons jeweils zu einem signifikanten Abfall der Aktivität der Katalase.

Im Fall der gonadalen Steroide ist keine so klare Aussage wie bei den Glukokortikoiden möglich. Es lassen sich in beiden Fällen, dem der neuronale Zelllinie und der Gliazelllinie, sowohl Kurzzeit- wie auch Langzeiteffekte beobachten. Der wesentlichste

Unterschied liegt im Verhalten der Zellen nach einer Inkubation mit den Hormonen für 24 Std.

5.12. Zusammenfassung und Schlussfolgerungen

Zusammenfassend kann aus der vorliegenden Arbeit gefolgert werden, dass Glukokortikoide, gonadale Steroide und Interleukine auf vielfältige Art und Weise in der Lage sind, die Aktivitäten und Spiegel von antioxidativ wirksamen Enzymsystemen und Substanzen zu beeinflussen. Hervorzuheben sind hierbei die Langzeiteffekte (24 Std.) des 17 β -Östradiols, das in jeder untersuchten Zellart, Zelllinie wie auch Primärkultur, zu einem signifikanten Anstieg des GSH-Spiegels führte.

Hierbei wird es sich also um einen Teilaspekt der protektiven Wirkungen dieses Steroids handeln. In einer tierexperimentellen Studie an der Ratte zeigten Wallin et al. (2000), dass im Falle einer zerebralen Ischämie der stärkste Abfall des GSH-Gehalts nach 24 Std. auftritt. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine Gabe von Östrogenen in physiologischen Konzentrationen sowohl in Neuronen als auch in Gliazellen nach einer Inkubation für 24 Std. zu einem signifikanten Anstieg des GSH-Spiegels führt. Im Zusammenhang mit diskutierten protektiven Wirkungen von Östrogenen im Rahmen des Krankheitsbildes der zerebralen Ischämie könnten diese Erkenntnisse von Bedeutung sein.

Die Wirkungen von Östrogenen auf den GSH-Spiegel könnten auch pharmakologisch von Bedeutung sein, da die Hormonersatztherapie für Frauen nach der Menopause in Zusammenhang mit der Parkinson'schen Erkrankung, mit der zerebralen Ischämie und mit der Alzheimer'schen Erkrankung diskutiert wird.

Saunders-Pullman et al. (1999) fanden einen positiven Zusammenhang zwischen dem Gebrauch von Östrogenen und einer Minderung der Schwere der Symptome bei Frauen mit

einer Parkinson'schen Erkrankung im frühen Stadium, die noch kein L-Dopa nehmen. Diese Ergebnisse zeigen nach Meinung der Autoren, dass eine Therapie mit Östrogenen nicht vermieden werden sollte und in einer frühen Phase der Erkrankung hilfreich sein könnte. Tsang et al. (2000) wiesen in diesem Zusammenhang nach, dass eine Gabe von geringen Östrogen-Dosen (0.625 mg/Tag) eine effektive zusätzliche Therapie in Ergänzung zu den existierenden Parkinson-Therapien bei an Parkinson erkrankten Frauen nach der Menopause in Verbindung mit motorischen Veränderungen ist.

Weiterhin wird die Hormonersatztherapie in Zusammenhang mit der zerebralen Ischämie diskutiert. Bushnell et al. (2001) fanden jedoch keinen Effekt einer Östrogen-therapie auf die Schwere des Insultes. Paganini-Hill (2001) führt in einem Review zu diesem Thema aus, dass in den letzten 25 Jahren 29 Studien keinen schlüssigen Beweis für einen positiven Effekt darbringen konnten. Die existierenden Daten zeigen jedoch seiner Meinung nach, dass diejenigen, die Östrogene einnehmen, ein mäßig reduziertes Risiko haben, einen schweren Schlaganfall zu erleiden. Details wie die optimale Dosis, die Dauer und der Östrogentyp sind aber bislang noch ungenügend geklärt.

Sehr intensiv wird die Hormonersatztherapie bei Frauen nach der Menopause auch im Zusammenhang mit der Alzheimer'schen Erkrankung diskutiert. In einigen klinischen Studien werden positive Effekte besonders im Bereich der Kognition gefunden in anderen nicht. Monk und Brodaty (2000) kommen in einer Übersichtsarbeit mit diesem Fokus zu dem Schluss, dass die Belege der Östrogen-Effekte auf das Gehirn im allgemeinen und besonders auf die Kognition zusammengenommen mit den Erkenntnissen über protektive Effekte gegen die Alzheimer'sche Erkrankung, die in retrospektiven Fall kontrollierten Studien gewonnen wurden, zu gewichtig sind um sie zu ignorieren. Man kann mittlerweile davon ausgehen, dass die Hormonersatztherapie in diesem Fall als eine für die Prävention und die Behandlung wertvolle Maßnahmen in Betracht zu ziehen ist. In Hinsicht auf Mangel an prospektiven

Langzeitdaten, großen klinischen Studien und der Untersuchung von Nebeneffekten ist nach ihrer Meinung aber nach wie vor Vorsicht geboten.

Einige Autoren vertreten in letzter Zeit die Meinung, dass für Männer eine Hormonersatztherapie mit Testosteron von Nutzen sein könnte. Der altersbedingte Abfall des Testosteron-Spiegels scheint die Anfälligkeit des alternden Gehirns gegenüber dem Verlust von Neuronen, der mit im Alter häufig auftretenden neurodegenerativen Erkrankungen verbunden ist, zu verstärken. Tirassa et al. (1997) beschrieben einen Abfall des Testosteron-Spiegels im Plasma von älteren depressiven Männern. Eine Verbesserung der Symptome konnte durch eine Behandlung mit Testosteron erreicht werden. Die Untersuchungen von Pike (2001) ergaben, dass Testosteron in hippokampalen Neuronen embryonaler Ratten der Toxizität von β -Amyloid entgegenwirken kann. Hammond et al. (2001) wiesen eine Neuroprotektion von primären humanen Neuronen durch Testosteron im Falle einer Serumdeprivation nach. Beide Autoren kommen zu dem Schluss, dass Androgene von therapeutischem Wert bei der Behandlung der Alzheimer'schen Erkrankung sein könnten. Eine erste, kürzlich durchgeführte, kleine, doppelblinde und Placebo-kontrollierte Studie deutet daraufhin, dass eine Testosteron-Behandlung von älteren Männern sowohl das Wortgedächtnis als auch das räumliche Gedächtnis verbessert (Cherrier et al., 2001). Dies könnte sich bei der Behandlung der mit der Alzheimer'schen Krankheit verbundenen kognitiven Dysfunktionen als nützlich erweisen. Auch die Ergebnisse von Yaffe et al. (2002) unterstützen die Hypothese, dass höhere Spiegel biologisch verfügbaren Testosterons mit besseren kognitiven Funktionen bei älteren Männern verbunden ist. In diesem Zusammenhang wird diskutiert, ob es sich um direkte Effekte des Testosterons handelt oder ob das Testosteron zunächst durch die Aromatase in Östradiol umgewandelt wird. Yaffe et al. konnten jedoch auch zeigen, dass biologisch verfügbares Östradiol bei älteren Männern nicht in Zusammenhang mit den kognitiven Funktionen steht. An Primärkulturen humaner Neurone

konnten auch Hammond et al. (2001) mit Hilfe von nicht aromatisierbaren Androgenen und Aromatase-Inhibitoren demonstrieren, dass Testosteron direkt neuroprotektiv wirkt.

In Versuchen mit Zellkulturen und zum Teil auch in Tierversuchen wurden deutliche protektive Wirkungen von mehreren Steroidhormonen in verschiedenen Schädigungsmodellen an Neuronen und in Tiermodellen unterschiedlicher neurodegenerativer Erkrankungen nachgewiesen. Im Zusammenhang mit den bisher vorliegenden Erkenntnissen über Veränderungen der antioxidativen Systeme wie dem GSH-Stoffwechsel und der Katalase-Aktivität in Verbindung mit verschiedenen neurologischen und psychiatrischen Krankheitsbildern wie der Parkinson'schen und der Alzheimer'schen Erkrankung aber auch der zerebralen Ischämie lässt sich mit ziemlicher Gewissheit sagen, dass die in dieser Arbeit nachgewiesenen hormoninduzierten Modifikationen des GSH-Gehaltes und der Katalase-Aktivität in neuronalen und glialen Zellsystemen eine große Rolle bei den protektiven Mechanismen spielen. Weitere Arbeiten werden ergeben, ob diese Veränderungen mit protektiven Effekten verbunden sind und sich im Tierversuch nachvollziehen lassen,

6. Zusammenfassung

In Zusammenhang mit fast allen neurologischen und psychiatrischen Krankheitsbildern und dem normalen Alterungsprozess existieren heute Untersuchungen über biochemische Veränderungen von Komponenten des antioxidativen Systems. Dieses System ist für die Entgiftung von reaktiven Sauerstoffspezies verantwortlich. Unter diesem Oberbegriff werden freie Radikale und Substanzen wie Wasserstoffperoxid zusammengefasst, die Moleküle wie DNA, Membranlipide und Proteine schädigen können. Wesentliche Bestandteile dieses Stoffwechsel-Systems sind Enzyme wie Superoxid Dismutase, Glutathion Peroxidase und Katalase, sowie Substanzen wie Glutathion und verschiedene Vitamine. Die Superoxid Dismutase-Isoformen wandeln das Superoxidradikal in Wasserstoffperoxid um, das dann von der Katalase und der Glutathion Peroxidase mit Glutathion als Substrat in Wasser umgewandelt wird.

Es existiert eine Vielzahl von Untersuchungen über Effekte von Steroidhormonen und Interleukinen auf das antioxidative System in peripheren Organsystemen wie z. B. Leber oder Niere. Im Zusammenhang mit dem zentralen Nervensystem gibt es bis jetzt nur wenige Studien.

Der pharmakologische Einsatz von Steroiden ist im Falle des 6-Methylprednisolon bei Rückenmarksverletzungen ein Standardtherapieverfahren und wird für Östrogenen in der Therapie neurodegenerativer Erkrankungen wie z. B. der Alzheimerschen Demenz diskutiert. Weiterhin existieren eine Reihe von Studien, die den Einsatz von Östrogenen und Androgenen zur Verbesserung der kognitiven Fähigkeiten im Alter vorschlagen.

Fasst man die bisher geschilderten Erkenntnisse zusammen, so ist es von großem Interesse, Wirkungen von Steroiden und Interleukinen auf das antioxidative System im zentralen Nervensystem zu untersuchen. Ziel der vorliegenden Arbeit war es deshalb, Effekte von Glukortikoiden (Kortikosteron, Dexamethason, 6-Methylprednisolon), gonadalen

Steroiden (17 β -Östradiol, Progesteron, Testosteron) und Interleukinen (Interleukin-6) auf den Glutathion-Gehalt in verschiedenen neuronalen (HT22 Zellen, hippocampale und neokortikale Primärkulturen) und glialen (C₆ Zellen) und von Interleukin-6 in hippocampalen Zellsystemen in verschiedenen Konzentrationen und nach unterschiedlichen Inkubationszeiten zu untersuchen.

Die Steroide und das Interleukin-6 entfalteten eine Vielzahl unterschiedlicher Effekte. Zu den wesentlichsten Effekten zählt der höchste gemessene Anstieg des Glutathion-Gehaltes nach einer Behandlung von HT22 Zellen für 24 Stunden mit 6-Methylprednisolon. In primären hippocampalen Kulturen wurde eine signifikante Erhöhung des Glutathion-Spiegels nach 48 Stunden beobachtet. Die Beteiligung des Glutathion-Systems an der Wirkung von 6-Methylprednisolon in Zusammenhang mit Rückenmarksverletzungen wird in der Literatur diskutiert. Der 6-Methylprednisolon induzierte Anstieg des Glutathion-Gehalts in neuronalen Zellsystemen könnte hierbei eine große Rolle spielen. Eine Inkubation aller verwendeter neuronaler Zellsysteme wie auch der C₆ Zelllinie mit 17 β -Östradiol (10⁻⁷ M) für 24 Stunden führte zu einem signifikanten Anstieg des Glutathion-Spiegels. Eine Beteiligung dieser Wirkung an den vielfach diskutierten neuroprotektiven Effekten dieses Hormons liegt nahe. Auch von Androgenen werden in letzter Zeit protektive Effekte zunehmend diskutiert.

In Zusammenhang mit der Katalase gibt es Arbeiten, die zeigen, dass Testosteron in der Lage ist die Katalase-Aktivität zu erhöhen. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass mit einem durch Testosteron induzierten Anstieg der Katalase-Aktivität in HT22 Zellen eine Neuroprotektion gegenüber der Schädigung durch Wasserstoffperoxid verbunden ist.

Die Ergebnisse dieser Studien haben gezeigt, dass sowohl Steroide wie auch Interleukine in der Lage sind, auf vielfache Weise den Spiegel von antioxidativ wirksamen Substanzen sowie die Aktivität antioxidativer Enzyme zu beeinflussen. Weitere

Untersuchungen werden ergeben müssen, ob auch die Veränderungen des Glutathion-Spiegels mit protektiven Effekten verbunden sind und sich im Tierversuch nachvollziehen lassen.

7. Literatur

- Abdalla, D. S., Monteiro, H. P., Oliveira, J. A., Bechara, E. J., Activities of superoxid-dismutase and glutathione-peroxidase in schizophrenic and manic-depressive patients. *Clin. Chem.* 32, 805-807 (1986).
- Abe, K., Saito, H., Characterization of t-butyl hydroperoxide toxicity in cultured rat cortical neurons and astrocytes. *Pharmacol. Toxicol.* 83, 40-46 (1998).
- Abraham, E. C., Taylor, J. F., Lang, C. A., Influence of mouse age and erythrocyte age on glutathione metabolism. *Biochem. J.* 174, 819-825 (1978).
- Adams, J. D., Klaidman, L. K., Odunze, I. N., Shen, H. C., Miller, C. A., Alzheimer's and Parkinson's disease: brain levels of glutathione, glutathione disulfide, and vitamin E. *Chem. Mol. Neuropathol.* 14, 213-226 (1991).
- Ahlbom, E., Grandison, L., Bonfoco, E., Zhivotovsky, B., Cecatelli, S., Androgen treatment of neonatal rats decreases susceptibility of cerebellar granule neurons to oxidative stress in vitro. *Eur. J. Neurosci.* 11, 1285-1291 (1999).
- Ahlbom, E., Gogvadze, V., Chen, M., Celsi, G., Ceccatelli, S., Prenatal exposure to high levels of glucocorticoids increases the susceptibility of cerebellar granule cells to oxidative stress-induced cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97, 14726-14730 (2000).
- Ahlbom, E., Prins, G. S., Cecatelli, S., Testosterone protects cerebellar granule cells from oxidative stress-induced cell death through a receptor mediated mechanism. *Brain Res.* 892, 255-262 (2001).
- Aidoo, A., Lyn-Cook, L. E., Morris, S. M., Kodell, R. L., Casciano, D. A., Comperative study of intracellular glutathione content in rat lymphocyte cultures treated with 2-mercaptoethanol and interleukin-2. *Cell. Biol. Toxicol.* 7, 215-227 (1991).

- Akaneya, Y., Takahshi, M., Hatanaka, H., Interleukin-1 β enhances survival and Interleukin-6 protects against MPP⁺ neurotoxicity in cultures of fetal rat dopaminergic neurons. *Exp. Neurol.* 136, 44-52 (1995).
- Aksenov, M. Y., Tucker, H. M., Nair, P., Aksenova, M. V., Butterfield, D. A., Estus, S., Markesberry, W. R., The expression of key oxidative stress-handling genes in different brain regions in Alzheimer's disease. *J. Mol. Neurosci.* 11, 151-164 (1999).
- Alkeyed, N. J., Harukumi, I., Kimes, A. S., London, E. D., Traystman, R. J., Hurn, P. D., Gender-linked brain injury in experimental stroke. *Stroke* 29, 159-166 (1998).
- Anderson, M. E., Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. *Methods Enzymol.* 113, 548-555 (1985).
- Andrezza, A. C., Cassini, C., Ribeiro Rosa, A., Concli Leite, M., de Almeida, L. M. V., Nardin, P., Cunha, A. B. N., Cereser, K. M., Santin, A., Gottfried, C., Salvador, M., Kapczinski, F., Goncalves, C. A., Serum S100B and antioxidant enzymes in bipolar patients. *J. Psychiatr. Res.* 41, 523-529 (2007).
- Annundi, I., Hogberg, J., Stead, A., Glutathione depletion in isolated hepatocytes: Its relation to lipid peroxidation and cell damage. *Acta Pharmacol. Toxicol.* 45, 4551 (1979).
- Asayama, K., Hayashibe, H., Dobashi, K., Uchida, N., Kato, K., Effect of dexamethasone on antioxidant enzymes in fetal rat lungs and kidneys. *Biol. Neonate.* 62, 136-144 (1992).
- Atmaca, M., Teczan, E., Kuloglu, M., Ustundag, B., Tunckol, H., Antioxidant enzyme and malondialdehyde values in social phobia before and after citalopram treatment. *Eur. Arch. Clin. Neurosci.* 254, 231-235 (2004).
- Atroshi, F., Paulin, L., Paalanen, T., Westermarck, T., Glutathione level in mice brain after testosterone administration. *Adv. Exp. Med. Biol.* 264, 199-202 (1990).

- Azbill, R. D., Mu, X., Bruce-Keller, A. J., Mattson, M. P., Springer, J. E., Impaired mitochondrial function, oxidative stress and altered antioxidant enzyme activities following traumatic spinal cord injury. *Brain Res.* 765, 283-290 (1997).
- Azevedo R. B., Lacava, Z. G. M., Miyasaka, C. R., Chaves, S. B., Curi, R., Regulation of antioxidant enzyme activities in male and female rat macrophages by sex steroids. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 34, 683-687 (2001).
- Baquer, N. Z., Hothersall, J. S., McLaen, P., Function and regulation of the pentose phosphate pathway in brain. *Curr. Top. Cell. regul.* 29, 265-289 (1998).
- Barks, J. D., Post, M., Tuor, U. I., Dexamethasone prevents hypoxic-ischemic brain damage in the neonatal rat. *Pediatr. Res.* 29, 558-563 (1991).
- Beckmann, K. B., Ames, B. N., The free radical theory of aging matures. *Physiol. Rev.* 78, 547-581 (1998).
- Behl, C., Davis, J. B., Lesley, R., Schubert, D., Hydrogen peroxide mediates amyloid β protein toxicity. *Cell* 77, 817-827 (1994).
- Behl, C., Widmann, M., Trapp, T., Holsboer, F., 17-beta estradiol protects neurons from oxidative stress-induced cell death in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 216, 473-482 (1995).
- Behl, C., Lezoualc'h, F., Trapp, T., Widman, M., Skutella, T., Holsboer, F., Glucocorticoids enhance oxidative stress-induced cell death in hippocampal neurons in vitro. *Endocrinology* 138, 101-106 (1997a).
- Behl, C., Skutella, T., Lezoualc'h, F., Post, A., Widmann, M., Newton, C. J., Holsboer, F., Neuroprotection against oxidative stress by estrogens: structure-activity relationship. *Mol. Pharmacol.* 51, 535-541 (1997b).

- Benveniste, E., Cytokine action in the central nervous system. *Cytokine Growth Factor Rev.* 9, 259-275 (1998).
- Ben-Yoseph, O., Boxer, P. A., Ross, B. D., Oxidative stress in the central nervous system: monitoring the metabolic response using the pentose phosphate pathway. *Dev. Neurosci.* 16, 328-336 (1994).
- Ben-Yoseph, O., Boxer, P. A., Ross, B. D., Assessment of the role of the glutathione and pentose phosphate pathways in the protection of primary cerebrocortical cultures from oxidative stress. *J. Neurochem.* 66, 2329-2337 (1996).
- Benzi, G., Moretti A., Age- and peroxidative stress related modification of the cerebral enzymatic linked to mitochondria and the glutathione system. *Free Radical Biol. Med.* 19, 77-101 (1995).
- Bergendi, L., Benes, I., Durackova, Z., Ferencik, M., Chemistry, physiology and pathology of free radicals. *Life Sci.* 65, 1865-1874 (1999).
- Berlitz, P., *Neurologie*, 2. Auflage, Springer Verlag. 360 (1996).
- Bertorelli, R., Adami, M., Di Santo, E., Ghezzi, P., MK 801 and dexamethasone reduce both tumor necrosis factor levels and infarct volume after focal cerebral ischemia in the rat brain. *Neurosci. Lett.* 246, 41-44 (1998).
- Bickel, H., *Die Epidemiologie der Demenz*. Deutsche Alzheimer Gesellschaft 1999.
- Bilici, M., Efe, H., Koroglu, M. A., Uydu, H. A., Bekaroglu, M., Deger, O., Antioxidative enzyme activities and lipid peroxidation in major depression: alterations by antidepressant treatment. *J. Affect. Disord.* 64, 43-51 (2001).
- Bishop, J., Simpkins, J. W., Estradiol treatment increases viability of glioma and neuroblastoma cells in vitro. *Mol. Cell. Neurosci.* 5, 303-308 (1994).

- Bolanos, J. P., Heales, S. J. R., Land, J. M., Clark, J. B., Effect of peroxynitrite on the mitochondrial respiratory chain: differential susceptibility of neurones and astrocytes in primary culture. *J. Neurochem.* 64, 1965-1972 (1995).
- Bourdel-Marchasson, I., Delmas-Beauvieux, M.-C., Peuchant, E., Richard-Harston, S., Decamps, A., Reignier, B., Emeriau, J.-P., Rainfray, M., Antioxidant defences and oxidative stress markers in erythrocytes and plasma from normally nourished elderly Alzheimer patients. *Age Ageing* 30, 235-241 (2001).
- Bracken, M. B., Shepard, M. J., Holford, T. R., Leo-Summers, L., Aldrich, E. F., Fazl, M., Fehlings, M., Herr, D. L., Hitchon, P. W., Marshall, L. F., Nockels, R. P., Pascale, V., Perot, P. L. Jr., Piepmeier, J., Sonntag, V. K., Wagner, F., Wilberger, J. E., Winn, H. R., Young, W., Administration of methylprednisolone for 24 or 48 hours or tirilazad mesylate for 48 hours in the treatment of acute spinal cord injury. Results of the Third National Acute Spinal Cord Injury Randomized Controlled Trial. *National Acute Spinal Cord Injury Study. JAMA* 277, 1597-1604 (1997).
- Brigelius-Flohe, R., Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. *Free Rad. Biol. Med.* 27, 951-965 (1999).
- Brinton, R. D., Tran, J., Proffitt, P., Montoya, M., 17 β -estradiol enhances the outgrowth and survival of neocortical neurons in culture. *Neurochem. Res.* 22, 1339-1351 (1997).
- Brooke, S. M., Sapolsky, R. M., The effects of steroid hormones in HIV-related neurotoxicity: a mini review. *Biol. Psychiatry* 48, 881-893 (2000).
- Brooke, S. M., McLaughlin, J. R., Cortopassi, K. M., Sapolsky, R. M., Effect of GP120 on glutathione peroxidase activity in cortical cultures and the interaction with steroid hormones. *J. Neurochem.* 81, 277-284 (2002).

- Brown, S. E., Ferrante, R. J., Beal, M. F., Oxidative stress in Huntington's disease. *Brain Pathol.* 9, 147-163 (1999).
- Brugge, K., Nichols, S., Saitoh, T., Trauner, D., Correlations of glutathione peroxidase activity with memory impairment in adults with Down syndrom. *Biol. Psychiatry* 15, 1682-1689 (1999).
- Bulut, M., Selek, S., Gergerlioglu, H. S., Savas, H. A., Yilmaz, H. R., Yuce, M., Ekici, G., Malondialdehyde levels in adult attention-deficit hyperactivity disorder. *J. Psychiatry Neurosci.* 32, 435-438 (2007).
- Busciglio, J., Yankner, B. A., Apoptosis and increased generation of reactive oxygen species in Down's syndrome neurons in vitro. *Nature* 378, 776-779 (1995).
- Bushnell, C. D., Samsa, G. P., Goldstein, L. B., Hormone replacement therapy and ischemic stroke severity in women: a case-control study. *Neurology* 56, 1304-1307 (2001).
- Cassarino, D. S., Fall, C. P., Swerdlow, R. H., Smith, T. S., Halvorsen, E. M., Miller, S. W., Parks, J. P., Parker Jr., W. D., Bennett Jr., J. P., Elevated reactive oxygen species and antioxidant enzyme activities in animal and cellular models of Parkinson's disease. *Biochem. Biophys. Acta* 1362, 77-86 (1997).
- Chance, B., Sies, H., Boveris, A., Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol. Rev.* 59, 527-605 (1979).
- Chauhan, A., Chauhan, V., Brown, W. T., Cohen, I., Oxidative stress in autism: increased lipid peroxidation and reduced serum levels of ceruloplasmin and transferrin-the antioxidant proteins. *Life Sci.* 75, 2539-2549 (2004).
- Chen, J., Chopp, M., Li, Y., Neuroprotective effects of progesterone after transient middle cerebral artery occlusion in rats. *J. Neurol. Sci.* 171, 24-30 (1999).

- Chen, L., Richardson, J. S., Caldwell, J. E., Ang, L. C., Regional brain activity of free radical defense enzyme in autopsy samples from patients with Alzheimer's disease and from non demented controls. *Int. J. Neurosci.* 75, 83-90 (1994).
- Chen, T. S., Richie Jr., J. P., Lang, C. A., Life span profiles of glutathione and acetaminophen detoxification. *Drug Metab. Dis.* 18, 882-887 (1990).
- Cherrier, M. M., Astana, S., Plymate, S., Baker, L., Matsumoto, A. M., Peskind, E., Raskind, . A., Brodtkin, W., Brenner, W., Petrova, A., LaTendresse, S., Craft, S., Testosterone supplementation improves spatial and verbal memory in healthy older man. *Neurology* 57, 80-88 (2001).
- Chi, L., Ke, Y., Luo, C., Gozal, D., Liu, R., Depletion of reduced glutathione enhances motor neuron degeneration in vitro and in vivo. *Neuroscience* 144, 991-1003 (2007).
- Chio, A., Cucatto, A., Terreni, A. A., Schiffer, D., Reduced glutathione in amyotrophic lateral sclerosis: an open, crossover, randomized trial. *Ital. J. Neurol. Sci.* 19, 363-366 (1998).
- Chisu, V., Manca, P., Zedda, M., Lepore, G., Gadau, S., Farina, V., Effects of testosterone on differentiation and oxidative stress resistance in C1300 neuroblastoma cells. *NeuroEndocrinol. Lett.* 27, 807-812 (2006).
- Clark, D. D., Sokoloff, L., Circulation and energy metabolism of the brain. In: Siegel, G. J., Agranoff, B. W., Albers, R. W., Fisher, S. K., Uhler, M. D. (Ed.), *Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects*. Lippincott-Raven, Philadelphia, 637-669 (1999).
- Cookson, M. R., Shaw, P. J., Oxidative stress and motor neuron disease. *Brain Pathol.* 9, 165-186 (1999).

- Cooper, A. J. L., Kristal, B. S., Multiple roles of glutathione in the central nervous system. *Biol. Chem.* 378, 793-802 (1997a).
- Cooper, A. J. L., Glutathione in the brain: disorders of glutathione metabolism. In: Rosenberg, R. N., Prusiner, S. B., DiMauro, S., Barchi, R. L., Kunk, L. M. (Ed.), *The molecular and genetic basis of neurological diseases*. Butterworth-Heinemann, Boston, pp. 1195-1230 (1997b).
- Cotgreave, I. A., Gerdes, R. G., Recent trends in glutathione biochemistry-glutathione-protein interactions: a molecular link between oxidative stress and cell proliferation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 242, 1-9 (1998).
- Culmsee, C., Vedder, H., Ravati, A., Junker, V., Otto, D., Ahlemeyer, B., Krieg, J. C., Krieglstein, J., Neuroprotection by estrogens in a mouse model of focal cerebral ischemia and in cultured neurons: evidence for a receptor-independent antioxidative mechanism. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 19, 1262-1269 (1999).
- Dabrosin, C., Hammar, M., Ollinger, K., Impact of oestradiol and progesterone on antioxidant activity in normal breast epithelial cells in culture. *Free Rad. Res.* 28, 241-249 (1998).
- Dakhale, G., Khanzode, S., Khanzode, S., Saoji, A., Khobragade, L., Turankar, A., Oxidative damage and schizophrenia: The potential benefit by atypical antipsychotics. *Neuropsychobiology* 49, 205-209 (2004).
- Davis, J. B., Maher, P., Protein kinase C activation inhibits glutamate induced cytotoxicity in a neuronal cell line. *Brain Res.* 652, 169-173 (1994).
- de la Torre, M. R., Casado, A., Lopez-Fernandez, M. E., Carrascosa, D., Casado, M. C., Venarucci, V., Human aging brain disorders: role of antioxidant enzymes. *Neurochem Res.* 21, 885-888 (1996).

- De Leo, J. A., Colburn, R. W., Nichols, M., Malkotra, A., Interleukin-6-mediated hyperalgesia/allodynia and increased spinal IL-6 expression in a rat mononeuropathy model. *J. Interferon Cytokine Res.* 16, 695-700 (1996).
- de Marchena, O., Guarnieri, M., McKhann, G., Glutathione peroxidase levels in brain. *J. Neurochem.* 22, 773-776 (1974).
- Desagher, S., Glowinski, J., Premont, J., Astrocytes protect neurons from hydrogen peroxide toxicity. *J. Neurosci.* 16, 2553-2562 (1996).
- Do, K. Q., Trabesinger, A. H., Kirsten-Krüger, M., Lauer, C. J., Dydak, U., Hell, D., Holsboer, F., Boesinger, P., Cuenod, M., Schizophrenia: glutathione deficit in cerebrospinal fluid and prefrontal cortex in vivo. *Eur. J. Neurosci.* 12, 3721-3728 (2000).
- Dringen, R., Hamprecht, B., Involvement of glutathione peroxidase and catalase in the disposal of exogenous hydrogen peroxide by cultured astroglial cells. *Brain Res.* 759, 67-75 (1997).
- Dringen, R., Kranich, O., Hamprecht, B., The γ -glutamyl transpeptidase inhibitor acivicin preserves glutathione released by astroglial in culture. *Neurochem Res.* 22, 727-733 (1997).
- Dringen, R., Kussmaul, L., Hamprecht, B., Rapid clearance of tertiary butyl hydroperoxide by cultured astroglial cells via oxidation of glutathione. *Glia* 23, 139-145 (1998).
- Dringen, R., Kussmaul, L., Gutterer, J. M., Hirrlinger, J., Hamprecht, B., The glutathione system of peroxide detoxification is less efficient in neurons than in astroglial cells. *J. Neurochem.* 72, 2523-2530 (1999b).
- Drukarch, B., Schepens, E., Jongenelen, C. A. M., Stoof, J. C., Langeveld, C. H., Astrocyte-mediated enhancement of neuronal survival is abolished by glutathione deficiency. *Brain Res.* 770, 123-130 (1997).

- Drukarch, B., Schepens, E., Stoof, J. C., Langeveld, C. H., van Muiswinkel, F. L., Astrocyte-enhanced neuronal survival is mediated by scavenging of extracellular reactive oxygen species. *Free Radic. Biol. Med.* 25, 217-220 (1998).
- Ersan, S., Bakir, S., Erdal Ersan, E., Dogan, O., Examination of free radical metabolism and antioxidant defence system elements in patients with obsessive-compulsive disorder. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 30, 1039-1042 (2006).
- Fann, M.-J., Patterson, P. H., Neurotrophic cytokines and activin A differently regulate the phenotype of cultured sympathetic neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 43-47 (1994).
- Fattori, E., Lazzaro, D., Musiani, P., Modesti, A., Alonzi, T., Ciliberto, G., IL-6 expression in neurons of transgenic mice cause reactive astrogliosis and increase in ramified microglial cells but no neuronal damage. *Eur. J. Neurosci.* 7, 2441-2449 (1995).
- Ferrante, R. J., Browne, S. E., Shinobu, L. A., Bowling, A. C., Baik, M. J., MacGarvey, U., Kowall, N. W., Brown, R. H. Jr., Beal, M. F., Evidence of increased oxidative damage in both sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurochem.* 69, 2064-2074 (1997).
- Forlenza, M. J., Miller, G.E., Increased serum levels of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in clinical depression. *Psychosom. Med.* 68, 1-7 (2006).
- Frantseva, M. V., Perez Velazquez, J. L., Hwang, P. A., Carlen, P. L., Free radical production correlates with cell death in an in vitro model of epilepsy. *Eur. J. Neurosci.* 12, 1431-1439 (2000).
- Freeman, B. A., Crapo, J. D., Biology of disease: free radicals and tissue injury. *Lab. Invest.* 47, 412-426 (1982).
- Furukuwa, T., Meydani, S. N., Blumberg, J. B., Reversal of age-associated decline in immune responsiveness in mice. *Mech. Aging Dev.* 38, 107-117 (1987).

- Genovese T., Mazzon E., Esposito, E., Muia, C., Di Paola, R., Di Bella, Bramanti, P., Cuzzocrea, S., Role of endogenous glutathione in the secondary damage in experimental spinal cord injury in mice. *Neurosci. Lett.* 423, 41-46 (2007).
- Gergerlioglu, H. S., Savas, H. A., Bulbul, F., Selek, S., Zu, E., Yumru, M., Changes in nitric oxide level and superoxide dismutase activity during antimanic treatment. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 31, 697-702 (2006).
- Ghibelli, L., Fanelli, C., Rotilio, G., Lafavia, E., Coppola, S., Colussi, C., Civitareale, P., Ciriole, M. R., Rescue of cells from apoptosis by inhibition of active GSH extrusion. *FASEB J.* 12, 479-486 (1998).
- Gilgun-Sherki, Y., Melamed, E., Offen, D., The role of oxidative stress in the pathogenesis of multiple sclerosis: The need for effective antioxidant therapy. *J. Neurol.* 251, 261-268 (2004).
- Gonzalez-Vidal, M. D., Cervera-Gavira, M., Ruelas, R., Escobar, A., Morali, G., Cervantes, M., Progesterone: protective effects on the rat hippocampal neuronal damage due to acute global ischemia. *Arch. Med. Res.* 29, 117-124 (1998).
- Goodman, Y, Bruce, A. J., Cheng, B., Mattson, M. P., Estrogens attenuate and corticosterone exacerbates excitotoxicity, oxidative injury, and amyloid beta-peptide toxicity in hippocampal neurons. *J. Neurochem.* 66, 1836-1844 (1996).
- Gorman, A. H., Hirt, U. A., Orrenius, S., Cecatelli, S., Dexamethason pre-treatment interferes with apoptotic death in glioma cells. *Neuroscience* 96, 417-425 (2000).
- Gouras, G. K., Xu, H., Gross, R. S., Greenfield, J. P., Hai, B., Wang, R., Greengard, P., Testosterone reduces neuronal secretion of Alzheimer's β -amyloid peptides. *Proc. Natl. Sci. USA* 97, 1202-1205 (2000).

- Gradient, R. A., Otten, U., Interleukin-6 (IL-6)-a molecule with both beneficial and destructive potentials. *Prog. Neurobiol.* 52, 379-390 (1997).
- Green, P. S., Gridley, K. E., Simpkins, J. W., Estradiol protects against β -amyloid (25-35)-induced toxicity in SK-N-SH human neuroblastoma cells. *Neurosci. Lett.* 218, 165-168 (1996).
- Green, P. S., Bishop, J., Simpkins, J. W., 17α -estradiol exerts neuroprotective effects on SK-N-SH cells. *J. Neurosci.* 17, 511-515 (1997).
- Grzybowski, A. E., Interleukin- 1β decreases the GSH content and catalase activity in the human peritoneal mesothelial cells in vitro. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* 28, 205-209 (2000).
- Gsell, W., Conrad, R., Hicketheir, M., Sofic, E., Frölich, L., Wichart, I., Jellinger, K., Mool, G., Ransmayr, G., Beckmann, H., Decreased catalase activity but unchanged superoxide dismutase activity in brains of patients with dementia of Alzheimer type. *J. Neurochem.* 64, 1216-1223 (1995).
- Gu, M., Owen, A. D., Toffa, S. E. K., Cooper, J. M., Dexter, D. T., Jenner, P., Marsden, C. D., Schapira, A. H. V., Mitochondrial function, GSH and iron in neurodegeneration and Lewy body diseases. *J. Neurol. Sci.* 158, 24-29 (1998).
- Hack, V., Gross, A., Kinscherf, R., Bockstette, M., Fiers, W., Berke, G., Dröge W., Abnormal glutathione and sulfate levels after interleukin-6 treatment and in tumor-induced cachexia. *FASEB J.* 10, 1219-1226 (1996).
- Hall, A. G., The role of glutathione in the regulation of apoptosis. *Eur. J. Clin. Invest.* 29, 238-245 (1999).
- Hall, E. D., The neuroprotective pharmacology of methylprednisolone. *J. Neurosurg.* 76, 13-22 (1992).

- Hama, T., Miyamoto, M., Tsuku, H., Nishio, C., Hatanaka, H., Interleukin-6 as a neurotrophic factor for promoting the survival of cultured basal forebrain cholinergic neurons from postnatal rats. *Neurosci. Lett.* 104, 340-344 (1989).
- Hama, T., Kushima, Y., Miyamoto, M., Kubota, N., Takei, N., Hatanaka, H., Interleukin-6 improves the survival of mesencephalic catecholaminergic and septal cholinergic neurons from postnatal, two-weeks-old rats in culture. *Neuroscience* 40, 445-452 (1991).
- Hammond, J., Le, Q., Goodyer, C., Gelfand, M., Trifiro, M., LeBlanc, A., Testosterone-mediated neuroprotection through the androgen receptor in human primary neurons. *J. Neurochem.* 77, 1319-1326 (2001).
- Hansen, M. B., Nielsen, S. E., Berg, K., Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell killing. *J. Immunol. Meth.* 199, 203-210 (1989).
- Hawk, T., Zhang, Y. Q., Rajakumar, G., Day, A. L., Simpkins, J. W., Testosterone increases and estradiol decreases middle cerebral artery occlusion lesion size in male rats. *Brain Res.* 796, 296-298 (1998).
- Herken, H., Uz, E., Özyurt, H., Sögüt, S., Virit, O., Akyol, Ö., Evidence that the activities of erythrocyte free radical scavenging enzymes and the products of lipid peroxidation are increased in different forms of schizophrenia. *Mol. Psychiatry* 6, 66-73 (2001).
- Herken, H., Akyol, O., Yilmaz, H. R., Tutkun, H., Savas, H. A., Ozen, M. E., Kalenderoglu, A., Gulec, M., Nitric oxide, adenosine deaminase, xanthine oxidase and superoxide dismutase in patients with panic disorder: Alterations by antidepressant treatment. *Human Psychopharmacol. Clin. Exp.* 21, 53-59 (2006).
- Herken, H., Gurel, A., Selek, S., Armutcu, F., Ozen, M. E., Bulut, M., Kap, O., Yumru, M., Savas, H. A., Akyol, O., Adenosine deaminase, nitric oxide, superoxide dismutase, and

xanthine oxidase in patients with major depression: Impact of antidepressant treatment. *Arch. Med. Res.* 38, 247-252 (2007).

- Hicks, J. J., Silva-Gomez, A. B., Vilar-Rojas, C., Induction of antioxidant enzymes by dexamethasone in the adult rat lung. *Life Sci.* 60, 2059-2067 (1997).
- Honda, K., Komoda, Y., Inoue, S., Oxidized glutathione regulates physiological sleep in unrestrained rats. *Brain Res.* 636, 253-258 (1994).
- Hoyt, K. R., Gallagher, A. J., Hastings, T. G., Reynolds, I. J., Characterization of hydrogen peroxide toxicity in cultured rat forebrain neurons. *Neurochem. Res.* 22, 333-340 (1997).
- Huang, J., Philbert, M. A., Distribution of glutathione and glutathione-related enzyme systems in mitochondria and cytosol of cultured cerebellar astrocytes and granule cells. *Brain Res.* 680, 16-22 (1995).
- Iwata-Ichikawa, E., Kondo, Y., Miyazaki, I., Asanuma, M., Ogawa, N., Glial cells protect neurons against oxidative stress via transcriptional up-regulation of the glutathione-synthesis. *J. Neurochem.* 72, 2334-2344 (1999).
- Jain, R., Martensson, J., Stole, E., Auld, P. A. M., Meister, A., Glutathione deficiency leads to mitochondrial damage in brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 1913-1917 (1991).
- James, S. J., Cutler, P., Melnyk, S., Jernigan, S., Janak, L., Gaylor, J. A., Neubrandner, J. A., Metabolic biomarkers of increased oxidative stress and impaired methylation capacity in children with autism. *Am. J. Clin. Nutr.* 80, 1611-1617 (2004).
- Janaky, R., Ogita, K., Pasqualotto, B. A., Bains, J. S., Oja, S. S., Yoneda, Y., Shaw, C. A., Glutathione and signal transduction in the mammalian CNS. *J. Neurochem.* 73, 889-902 (1999).
- Jellinger, K. A., The role of iron in neurodegeneration-prospects for pharmacotherapy of Parkinson's disease. *Drugs Aging* 14, 115-140 (1999).

- Jenner, P., Oxidative mechanism in nigral cell death in Parkinson's disease. *Mov. Disorders* 13, 24-34 (1998).
- Jiang, N., Chopp, M., Stein D., Feit, H., Progesterone is neuroprotective after transient middle cerebral artery occlusion in male rats. *Brain Res.* 735, 101-107 (1996).
- Johansson, L. H., Borg, L. A. H., A spectrophotometric method for determination of catalase activity in small tissue samples. *Anal. Biochem.* 174 (1988), 331-336.
- Juurlink, B. H. J., Response of glial cells to ischemia: roles of reactive oxygen species and glutathione. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 21, 151-166 (1997).
- Kahraman, S., Düz, B., Kayali, H., Korkmaz, A., Öter, S., Aydin, A., Sayal, A., Effects of methylprednisolone and hyperbaric oxygen on oxidative status after experimental spinal cord injury: A comparative study in rats. *Neurochem. Res.* 32, 1547-1551 (2007).
- Kamencic, H., Griebel, R. W., Lyon, A. W., Paterson, P. G., Juurlink, B. H. J., Promoting glutathione synthesis after spinal cord trauma decreases secondary damage and promotes retention of function. *FASEB J.* 15, 243-250 (2001).
- Kawamura, T., Yoshioka, T., Bills, T., Fogo, A., Ichikawa, I., Glucocorticoids activates antioxidant enzymes and protects glomeruli from antioxidant injuries. *Kidney Int.* 40, 291-301 (1991).
- Khanzode, S. D., Dakhale, G. N., Khanzode, S. S., Saoji, A., Palasodkar, R., Oxidative damage and major depression: the potential antioxidant action of selective serotonin re-uptake inhibitors. *Redox Rep.* 8, 365-370 (2003).
- Kim, Y. D., Farhat, M. Y., Myers, A. K., Kouretas, P., DeGroot, K., Pacquing, A., Ramwell, P. W., Suyderhoud, J. P., Lees, D. E., 17 β -estradiol regulation of myocardial glutathione and its role in protection against myocardial stunning in dogs. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 32, 457-465 (1998).

- Kimura, M., Kapas, L., Krueger, J. M., Oxidized glutathione promotes sleep in rabbits. *Brain Res. Bull.* 45, 545-548 (1998).
- Kujawa, K. A., Kinderman, N. B., Jones, K. J., Testosterone-induced acceleration of recovery from facial paralysis following crush axotomy of the facial nerve in male hamsters. *Exp. Neurol.* 105, 80-85 (1989).
- Kujawa, K. A., Tanzer, L., Jones, K. J., Inhibition of the accelerative effects of testosterone on hamster facial nerve regeneration by antiandrogen flutamide. *Exp. Neurol.* 133, 138-143 (1995).
- Kuloglu, M., Ustundag, B., Atmaca, M., Canatan, H., Tezcan, A. E., Cinkilinc, N., Lipid peroxidation and antioxidant enzyme levels in patients with schizophrenia and bipolar disorder. *Cell Biochem. Funct.* 20, 171-175 (2002a).
- Kuloglu, M., Atmaca, M., Tezcan, E., Gecici, O., Tunckol, H., Ustundag, B., Antioxidant enzyme activities and malondialdehyde levels in patients with obsessive-compulsive disorder. *Neuropsychobiology* 46, 27-32 (2002b).
- Kuloglu, M., Atmaca, M., Tezcan, E., Ustundag, B., Bulut, S., Antioxidant enzyme and malondialdehyde levels in patients with panic disorder. *Neuropsychobiology* 46, 186-189 (2002c).
- Kushima, Y., Hama, T., Hatanaka, H., Interleukin-6 as a neurotrophic factor for promoting the survival of cultured catecholaminergic neurons in a chemically defined medium from fetal and postnatal midbrains. *Neurosci. Res.* 13, 267-280 (1992).
- Kushima, Y., Hatanaka, H., Interleukin-6 and leukemia inhibitory factor promote the survival of acetylcholinesterase-positive neurons in culture from embryonic rat spinal cord. *Neurosci. Lett.* 143, 110-114 (1992).

- Kussmaul, L., Hamprecht, B., Dringen, R., The detoxification of cumene hydroperoxide by the glutathione system of cultured astroglial cells hinges on the hexose availability for the regeneration of NADPH. *J. Neurochem.* 73., 1246-1243 (1999).
- Lang, C. A., Wu, W., Chen, T., Mills, B. J., Blood glutathione: a biochemical index of life span enhancement in the diet restricted Lobund-Wistar rat. *Prog. Clin. Biol. Res.* 287, 241-246 (1989).
- Lang, C. A., Naryshkin, S., Schneider, D. L., Mills, B. J., Lindemann, R. D., Low blood glutathione levels in healthy aging adults. *J. Lab. Clin. Med.* 120, 720-725 (1992).
- Langanieri, S., Yu, B. P., Effect of chronic food restriction in aging rats: II. Liver cytosolic antioxidants and related enzymes. *Mech. Ageing Dev.* 48, 221-230 (1989).
- Lanius, R. A., Krieger, C., Wagey, R., Shaw, C. A., Increased [³⁵S] glutathione binding sites in spinal cords from patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neurosci. Lett.* 163, 89-92 (1993).
- Lee, S. J., McEwen, B. S., Neurotrophic and neuroprotective actions of estrogens and their therapeutic implications. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 41, 569-591 (2001).
- Lemaire, C., Andrau, K., Fraisse, C. S., Adam, A., Souvannavong, V., IL-4 inhibits apoptosis and prevents mitochondrial damage without inducing the switch to necrosis observed with caspase inhibitors. *Cell. Death Differ.* 6, 813-820 (1999).
- Lewen, A., Matz, P., Cahn, P. H., Free radical pathways in CNS injury. *J. Neurotrauma* 17, 871-890 (2000).
- Li, H., Dryhurst, G., Irreversible inhibition of mitochondrial complex I by 7-(2-aminoethyl)-3,4-dihydro-2H-1,4-benzothiazine-3-carboxylic acid (DHBT-1): a putative nigral endotoxin of relevance to Parkinson's disease. *J. Neurochem.* 69, 1530-1541 (1997).

- Liu, D., Sybert, T. E., Quian, H., Liu J., Superoxide production after spinal cord injury detected by microperfusion of cytochrom c. *Free Radic. Biol. Med.* 25, 298-304 (1998).
- Liu, D., Liu J., Wen, J., Elevation of hydrogen peroxide after spinal cord injury detected by using the Fenton reaction. *Free Radic. Biol. Med.* 27, 478-482 (1999).
- Lohr, J. B., Browning, J. A., Free radical involvement in neuropsychiatric illness. *Psychopharmacol. Bull.* 31, 159-165 (1995).
- Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L. and Randell R. J., Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275 (1951).
- Love, S., Oxidative stress in ischemia. *Brain Pathol.* 9, 119-131 (1999).
- Lovell, M. A., Ehmann, W. D., Butler, S. M., Markesberry, W. R., Elevated thiobarbituric acid-reactive substances and antioxidant enzyme activity in Alzheimer's disease. *Neurology* 45, 1594-1601 (1995).
- Loven, D. P., James, J. F., Biggs, L., Little, K. Y., Increased manganese-superoxide dismutase activity in postmortem brain from neuroleptic-treated psychotic patients. *Biol. Psychiatry* 40, 230-232 (1996).
- Lucas, J. H., Wheeler, D. G., Emery, D. G., Mallery, S. R., The endogenous antioxidant glutathione as a factor in the survival of physically injured mammalian spinal cord neurons. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 57, 937-954 (1998).
- Ma, T. C., Zhu, X. Z., Neurotoxic effects of interleukin-6 and sodium nitroprusside on cultured rat hippocampal neurons. *Arzneimittelforschung* 50, 512-514 (2000).
- Machado-Vieira, R., Andreazza, A. C., Viale, C. I., Zanatto, V., Cereser Jr., V., Vargas, R. d. S., Kapczinski, F., Portela, L. V., Souza, D. O., Salvador, M., Gentil, V., Oxidative stress parameters in unmedicated and treated bipolar subjects during initial manic episode: A possible role for lithium antioxidant effects. *Neurosci. Lett.* 421, 33-36 (2007).

- Makar, T. K., Nedergaard, M., Preuss, A., Gelbard, A. S., Perumal, A.S., Cooper, A. J. L., Vitamine 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. *J. Neurochem.* 62, 45-53 (1994).
- Marcus, D. L., Thomas, C., Rodriguez, C., Simberkoff, K., Tsai, J. S., Strafaci, J. A., Freedman, M. L., Increased peroxidation and reduced antioxidant enzyme activity in Alzheimer's disease. *Exp. Neurol.* 150, 40-44 (1998).
- Mark, R. J., Lovell, M. A., Markesberry, W. R., Uchida, K., Mattson M. P., A role for 4-hydroxynonenal, an aldehyd product of lipid peroxidation, in disruption of ion homeostasis and neural death induced by amyloid β -peptide. *J. Neurochem.* 68, 255-264 (1997a).
- Mark, R. J., Pang, Z., Geddes, J. W., Uchida, K., Mattson, M. P., Amyloid β -peptide impairs glucose transport in hippocampal and cortical neurons: involvement of membran lipid peroxidation. *J. Neurosci.* 17, 1046-1054 (1997b).
- Markesbery, W. R., Carney, J. M., Oxidative alterations in Alzheimer's disease. *Brain Pathol.* 9, 133-146, (1999).
- März, P., Herget, T., Lang, E., Otten, U., Rose-John, S., Activation of gp130 by IL-6/soluble IL-6 receptor induces neuronal differentiation. *Eur. J. Neurosci.* 9, 2765-2773 (1997).
- Matsuda, S., Wen, T. C., Morita, F., Otsuka, H., Igase, K., Yoshimura, H., Sakanaka, M., Interleukin-6 prevents ischemia-induced learning disability and neuronal and synaptic loss in gerbils. *Neurosci. Lett.* 204, 109-112 (1996).
- McEwen, B., The molecular und neuroanatomical basis for estrogen effects in the central nervous system. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 24, 1790-1797 (1999).

- McIntosh L. J., Sapolsky R. M., Glucocorticoids may enhance oxygen radical-mediated neurotoxicity. *Neurotoxicology* 17, 873-882 (1996).
- McIntosh, L. J., Hong, K. E., Sapolsky, R. M., Glucocorticoids may alter antioxidant enzyme capacity in the brain: baseline studies. *Brain Res.* 791, 209-214 (1998).
- Michel, T. M., Thome, J., Martin, D., Nara, K., Zwerina, S., Tatschner, T., Weijers, H. G., Koutsilieri, E., Cu, Zn- and Mn-superoxide dismutase levels in brains of patients with schizophrenic psychosis. *J. Neural. Transm.* 111, 1191-1201 (2004).
- Milhavel, O., McMahon, H. E. M., Rachid, W., Nishida, N., Katamine, S., Mange, A., Arlotto, M., Casanova, D., Riondel, J., Favier, A., Lehmann, S., Prion infection impairs the cellular response to oxidative stress. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97, 13937-13942 (2000).
- Mischel, R. E., Kim, Y. S., Sheldon, R. A., Ferriero, D. M., Hydrogen peroxide is selectively toxic to immature murine neurons in vitro. *Neurosci. Lett.* 231, 17-20 (1997).
- Mitchell, J. D., Gatt, J., Philips, T., Houghton, E., Roston, G., Wignall, C., Cu, Zn superoxide dismutase, free radicals and motorneuron disease. *Lancet* 342, 1051-1052 (1993).
- Mizui, T., Kinouchi, H., Chan, P. H., Depletion of brain glutathione by buthionine sulfoximine enhances cerebral ischemic injury in rats. *Am. J. Physiol.* 262, H313-H317 (1992).
- Mo, J. Q., Hom, D. G., Andersen, J. K., Decrease in protective enzymes correlates with increased oxidative damage in the aging mouse brain. *Mech. Ageing Dev.* 81, 73-82 (1995).
- Monk, D., Brodaty, H., Use of estrogens for the prevention and treatment of Alzheimer's disease. *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* 11, 1-10 (2000).

- Moreno, S., Mugnaini, E., Ceru, M. P., Immunocytochemical localization of catalase in the central nervous system of the rat. *J. Histochem. Cytochem.* 43, 1253-1267 (1995).
- Morita, K., Ishimura, K., Tsuruo, Y., Wong, D. L., Dexamethasone enhances serum deprivation-induced necrotic cell death of rat c6 glioma cells through activation of glucocorticoid receptors. *Brain Res.* 816, 309-316 (1999).
- Moumen, R., Nouvelot, A., Duval, D., Lechevalier, B., Viader, F., Plasma superoxide dismutase and glutathione peroxidase activity in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurol. Sci.* 151, 35-39 (1997).
- Müller, S. G., Trabesinger, A. H., Boesinger, P., Wieser, H. G., Brain glutathione levels in patients with epilepsy measured by the in vivo ⁽¹⁾H-MRS. *Neurology* 57, 1422-1427 (2001).
- Murakami, E., Iwata, T., Hiwada, K., Kokubu, T., Brain glutathione and blood pressure control. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 10, S112-S115 (1987).
- Murphy, S. J., Traystman, R. J., Hurn, P. D., Progesterone exacerbates striatal stroke injury in progesterone-deficient female animals. *Stroke* 31, 1173-1178 (2000).
- Nakamura, K., Wang, W., Kang, U. J., The role of glutathione in dopaminergic neuronal survival. *J. Neurochem.* 69, 1850-1858 (1997).
- Nakimizo, T., Urushitani, M., Shinohara, A., Sawada, H., Honda, K., Kihara, T., Akaike, A., Shimohama S., Protection of cultured spinal motor neurons by estradiol. *Neuroreport* 11, 3493-3497 (2000).
- Nilsen, J., Brinton, R. D., Impact of progestins on estrogen-induced neuroprotection: synergy by progesterone and 19-norprogesterone and antagonism by methoxyprogesterone acetate. *Endocrinology* 143, 205-212 (2002).

- Nishioka, N., Arnold, S. E., Evidence for oxidative DNA damage in the hippocampus of elderly patients with chronic schizophrenia. *Am. J. Geriatr. Psychiatry* 12, 167-175 (2004).
- Nordeen, E. J., Nordeen, K. W., Sengelaub, D. R., Arnold, A. P., Androgens prevent normally occurring cell death in a sexually dimorphic spinal nucleus. *Science* 229, 671-673 (1985).
- Öge, A., Sezer, E. D., Özgönül, M., Bayraktar, F., Sözmen, E. Y., The effects of estrogen and raloxifene treatment on antioxidant enzymes and nitrite-nitrate levels in brain cortex of ovariectomized rats. *Neurosci. Lett.* 338, 217-220 (2003).
- Ogita, K., Enomoto, R., Nakahara, F., Ishitsubo, N., Yoneda, Y., A possible role of glutathione as an endogenous agonist at N-methyl-D-aspartat recognition domain in the brain. *J. Neurochem.* 64, 1088-1096 (1995).
- Oka, T., Oka, K., Hosoi, M., Hori, T., Intracerebroventricular injection of interleukin-6 induces thermal hyperalgesia in rats. *Brain Res.* 692, 123-128 (1995).
- Paganini-Hill, A., Hormone replacement therapy and stroke: risk, protection or no effect? *Maturitas* 38, 243-261 (2001).
- Pajovic, S. B., Saicic, Z. S., Spasic, M. B., Petrovic, V. M., Martinovic, J. V., Effects of progesterone and estradiol benzoate on glutathione dependent antioxidant enzyme activities in the brain of female rats. *Gen. Physiol. Biophys.* 18, 35-44 (1999).
- Palomares, T., Alonso-Varona, A., Alvarez, A., Castro, B., Calle, Y., Bilbao, P., Interleukin-2 increases intracellular glutathione levels and reverses the growth inhibiting effects of cyclophosphamide on B16 melanoma cells. *Clin. Exp. Metastasis* 15, 329-337 (1997).

- Patel, R., McIntosh, L., McLaughlin, J., Brooke, S., Nimon, V., Sapolsky, R., Disruptive effects of glucocorticoids on glutathione peroxidase biochemistry in hippocampal cultures. *J. Neurochem.* 82, 118-125 (2002).
- Pearce, R. K. B., Owen, A., Daniel, S., Jenner, P., Marsden, C. D., Alterations in the distribution of glutathione in the substantia nigra in Parkinson's disease. *J. Neural. Transm.* 104, 661-677 (1997).
- Pereira, B., Rosa, L. F., Safi, D. A., Bechara, E. J., Curi R., Hormonal regulation of superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase activities in rat macrophages. *Biochem. Pharmacol.* 50, 2093-2098 (1995).
- Pereira, B., Bechara, E. J. H., Mendona, J. R., Curi, R., Superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase activities in the lymphoid organs and skeletal muscles of rats treated with dexamethasone. *Cell. Biochem. Funct.* 17, 15-19 (1999).
- Perez, J., Kelley, D. B., Trophic effects of androgen: receptor expression and the survival of laryngeal motor neurons after axotomy. *J. Neurosci.* 16, 6625-6633 (1996).
- Perry, T. L., Godin, D. V., Hansen, S., Parkinson's disease: a disorder due to nigral glutathione deficiency? *Neurosci. Lett.* 33, 305-310 (1982).
- Perry, T. L., Yong, V. W., Idiopathic Parkinson's disease, progressive supranuclear palsy and glutathione metabolism in the substantia nigra of patients. *Neurosci. Lett.* 67, 269-274 (1986).
- Perry, T. L., Yong, V. W., Bergeron, C., Hansen, S., Jones, K., Amino acids, glutathione and glutathione transferase activity in the brain of patients with Alzheimer's disease. *Ann. Neurol.* 21, 331-336 (1987).
- Perry, T. L., Hansen, S., Jones, K., Brain amino acids and glutathione in progressive supranuclear palsy. *Neurology* 38, 943-946 (1988).

- Peuchen, S., Bolanos, J. P., Heales, S. J. R., Almeida, A., Duchen, M. R., Clark, J. B., Interrelationships between astrocyte function, oxidative stress and antioxidant status within the central nervous system. *Prog. Neurobiol.* 52, 261-281 (1997).
- Pike, C. J., Testosterone attenuates β -amyloid toxicity in cultured hippocampal neurons. *Brain Res.* 919, 160-165 (2001).
- Pileblad, E., Magnuson, T., Fornstedt, B., Reduction of brain glutathione by L-buthionine sulfoximine potentiates the dopamine-depletion action of 6-hydroxydopamin in rat striatum. *J. Neurochem.* 52, 978- 980 (1989).
- Poot, M., Teubert, H., Rabinovitch, P. S., Kavanagh, T. J., De novo synthesis of glutathione is required for both entry into and progresssion through the cell cycle. *J. Cell. Physiol.* 163, 555-560 (1995).
- Przedborsky, S., Donaldson, D. M., Murphy, P. L., Hirsch, O., Naini, A. B., McKenna-Yasek, D., Brown Jr., R. H., Blood superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase activities in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Neurodegen.* 5, 57-64 (1996a).
- Przedborsky, S., Donaldson, D. M., Jakowec, M., Kish, S. J., Guttman, M., Rosoklija, G., Hays, A. P., Brain superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase activities in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann. Neurol.* 39, 158-65 (1996b).
- Qui, Z., Parsons, K. L., Gruol, D. L., Interleukin-6 selectively enhances the intracellular calcium response to NMDA in developing CNS neurons. *J. Neurosci.* 15, 6688-6699 (1995).
- Qiu, Z., Sweeney, D. D., Netzeband, J. G., Gruol, D. L., Chronic interleukin-6 alters NMDA receptor-mediated membrane responses and enhances neurotoxicity in developing CNS neurons. *J. Neurosci.* 18, 10445-10456 (1998).

- Rahman, I., Bel, A., Mulier, B., Donaldson, K., MacNee, W., Differential regulation of oxidants and dexamethasone in alveolar epithelial cells. *Am J. Physiol.* 275, L80-L86 (1998).
- Rajashree, S., Puvanakrishnan, R., Dexamethasone induced alterations in enzymatic and nonenzymatic antioxidant status in heart and kidney of rats. *Mol. Cell. Biochem.* 181, 77-85 (1998).
- Ranjekar, P. K., Hinge, A., Hegde, M. V., Ghate, M., Kale, A., Sitasawad, S., Wagh, U. V., Debsikdar, V. B., Mahadik, S. P., Decreased antioxidant enzymes and membrane essential polyunsaturated fatty acids in schizophrenic and bipolar mood disorders. *Psychiatr. Res.* 121, 109-122 (2003).
- Raps, S. P., Cai, S. C., Hertz, L., Cooper, A. J., Glutathione is present in high concentrations in cultured astrocytes but not in cultured neurons. *Brain Res.* 493, 398-401 (1989).
- Rathbun, W. B., Murray, D. L., Age-related cysteine uptake as rate-limiting in glutathione synthesis and glutathione half-life in the cultured human lense. *Exp. Eye Res.* 53, 205-212 (1991).
- Reddy, R., Mahadik, S. P., Mukherjee, M., Muethy, J. N., Enzymes of antioxidant system in chronic schizophrenic patients. *Biol. Psychiatry* 30, 409-412 (1991)
- Reddy, R., Yao, J. K., Free radical pathology in schizophrenia: A review. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 55, 33-43 (1996).
- Reiter, R. J., Tan, D. X., Osuna, C., Gitto, E., Actions of melatonin in the reduction of oxidative stress. *J. Biomed. Sci.* 7, 444-458 (2000).
- Retz, W., Gsell, W., Münch, G., Rösler, M., Riederer, P., Free radicals in Alzheimer's disease. *J. Neural Transm.* 54, 221-236 (1998).

- Rice M. E., Ascorbate regulation and its neuroprotective role in the brain. *Trends Neurosci.* 23, 209-216 (2000).
- Richman, P. G., Meister, A., Regulation of γ -glutamylcystein synthetase by nonallosteric feedback inhibition by glutathione. *J. Biol. Chem.* 250, 1422-1426 (1975).
- Robberecht, W., Oxidative stress in amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurol.* 247 (Suppl. 1), I/1-I/6 (2000).
- Roof, R. L., Duvdevani, R., Stein, D. G., Gender influences outcome after brain injury: progesterone plays a protective role. *Brain Res.* 607, 333-336 (1993).
- Rothwell, N. J., Busbridge, N. J., Lefevre, R. A., Hardwick, A. J., IL-6 is a centrally acting endogenous pyrogen in the rat. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 69, 1465-1469 (1991).
- Rusa, R., Alkayed, N. J., Crain, B. J., Traystman, R. J., Kimes, A. S., London, E. D., Klaus, J. S., Hurn, P. D., 17β -Estradiol reduces stroke injury in estrogen-deficient female animals. *Stroke* 30, 1665-1670 (1999).
- Saez, G.T., Bannister, W. H., Bannister, J. Y., Free radicals and thiol compounds-the role of glutathione against free radical toxicity. In: Vina, J. (Ed.), *Glutathione: Metabolism and Physiological Functions*. CRC Press, Boca Raton, FL, USA, pp. 237-254 (1990).
- Sahoo, A., Chainy, G. B. N., Alterations in the activities of cerebral antioxidant enzymes of rat are related to aging. *Int. J. Devl. Neuroscience* 15, 939-948 (1997).
- Sapolsky, R. M., Pulsinelli, W. A., Glucocorticoids potentiate ischemic injury to neurons: therapeutic implications. *Science* 229, 11397-14000 (1985).
- Sapolsky, R. M., Packan, D. R., Vale, W. W., Glucocorticoid toxicity in the hippocampus: in vitro demonstration. *Brain Res.* 453, 367-371 (1988).

- Sarandol, A., Sarandol, E., Eker, S. S., Erdinc, S., Vatansever, E., Kirli, S., Major depressive disorder is accompanied with oxidative stress: short-term antidepressant treatment does not alter oxidative-antioxidative systems. *Human Psychopharmacol.* 22, 67-73 (2007).
- Saunders-Pullman, R., Gordon-Elliott, J., Parides, M., Fahn, S., Saunders, H. R., Bressman, S., The effect of estrogen replacement on early Parkinson's disease. *Neurology* 52, 1417-1421 (1999).
- Savas, H. A., Gergerlioglu, H. S., Armutcu, F., Herken, H., Yilmaz, H. R., Kogoglu, E., Selek, S., Tutkun, H., Zoroglu, S. S., Akyol, O., Elevated serum nitric oxide and superoxide dismutase in euthymic bipolar disorder: Impact of past episodes. *World J. Biol. Psychiatry* 7, 51-555 (2006).
- Sawada, H., Ibi, M., Kihara, T., Urushitani, M., Akaike, A., Shimohama, S., Estradiol protects mesencephalic dopaminergic neurons from oxidative stress-induced neuronal cell death. *J. Neurosci. Res.* 54, 707-719 (1998).
- Schöbitz, B., Holsboer, F., Sutano, W., Gross, G., Schönbaum, E., de Kloet, E. R., Corticosterone modulates interleukin-evoked fever in rat. *Neuroendocrinology* 59, 387-395 (1994).
- Schuchmann, S., Heinemann, U., Diminished glutathione levels cause spontaneous mitochondria-mediated cell death in neurons from trisomy 16 mice: a model of Down's syndrome. *J. Neurochem.* 74, 1205-1214 (2000).
- Schulz, J. B., Lindenau, J., Seyfried, J., Dichgans, J., Glutathione, oxidative stress and neurodegeneration. *Eur. J. Biochem.* 267, 4904-4911 (2000).

- Sechi, G., Deledda, M. G., Bua, G., Satta, W. M., Deiana, G. A., Pes, G. M., Rosati, G., Reduced intravenous glutathione in the treatment of early Parkinson's disease. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 20, 1159-1170 (1996).
- Selek, S., Herken, H., Bulut, M., Ceylan, M. F., Celik, H., Savas H. A., Erel, O., Oxidative imbalance in obsessive compulsive disorder patients: A total evaluation of oxidant-antioxidant status. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 32, 487-491 (2008).
- Selek, S., Savas, H. A., Gergerlioglu, H. S., Bulbul, F., Zu, E., Yumru, M., The course of nitric oxide and superoxide dismutase during treatment of bipolar depressive episode. *J. Affect. Disord.* 107, 89-94 (2008).
- Selley, M. L., Increased (E)-4-hydroxy-2-nonenal and asymmetric dimethylarginine concentrations and decreased nitric oxide concentrations in the plasma of patients with major depression. *J. Affect. Disord.* 80, 249-256 (2004).
- Shen, X. M., Dryhurst, G., Further insights of L-cysteine on the oxidation chemistry of dopamine: reaction pathways of potential relevance to Parkinson's disease. *Chem. Res. Toxicol.* 9, 751-763 (1996).
- Shy, H., Malaiyandi, L., Timiras, P. S., Protective action of 17 β -estradiol and tamoxifen on glutamate toxicity in glial cells. *Int. J. Devl. Neuroscience* 18, 289-297 (2000).
- Sian, J., Dexter, D. T., Lees, A. J., Daniel, S., Agid, Y., Javoy-Agid, F., Jenner, P., Marsden, C. D., Alterations in glutathione levels in Parkinson's disease and other neurodegenerative disorders affecting basal ganglia. *Ann. Neurol.* 36, 348-355 (1994a).
- Sian, J., Dexter, D. T., Lees, A. J., Daniel, S., Jenner, P., Marsden, C. D., Glutathione-related enzymes in brain in Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* 36, 356-361 (1994b).
- Singer, C. A., Rogers, K. L., Strickland, T. M., Dorsa, D. M., Estrogen protects primary cortical neurons from glutamate toxicity. *Neurosci. Lett.* 212, 13-16 (1996).

- Skinner, A. O., Mahadik, S. P., Garver, D. L., Thiobarbituric acid reactive substances in the cerebrospinal fluid in schizophrenia. *Schizophr. Res.* 76, 83-87 (2005).
- Slivka, A., Spina, M. B., Cohen, G., Reduced and oxidized glutathione in human and monkey brain. *Neurosci. Lett.* 74, 112-118 (1987).
- Smythies, J. R., Oxidative reactions and Schizophrenia: a review-discussion. *Schizophrenia Res.* 24, 357-364 (1997).
- Sofic, E., Lange, K. W., Jellinger, K., Riederer, P., Reduced and oxidized glutathione in the substantia nigra of patients with Parkinson's disease. *Neurosci. Lett.* 142, 128-130 (1992).
- Sögüt, S., Zoroglu, S. S., Özyurt, H., Yilmaz, H. R., Ögurlu, F., Sivash, E., Yetkin, Ö., Yanik, M., Tutkun, H., Savas, H. A., Tarakcioglu, M., Akyol, Ö., Changes in nitric oxide levels and antioxidant enzyme activities may have a role in the pathophysiological mechanism involved in autism. *Clin. Chim. Acta* 331, 111-117 (2003).
- Spencer, J. P., Jenner, P., Daniel, S. E., Lees, A. J., Marsden, D. C., Halliwell, B., Conjugates of catecholamines with cysteine and GSH in Parkinson's disease. Possible mechanism of formation involving reactive oxygen species. *J. Neurochem.* 71, 2112-2122 (1998).
- Stabel-Burow, J., Kleu, A., Schuchmann, S., Heinemann, U., Glutathione levels and nerve cell loss in hippocampal cultures from trisomy 16 mouse-a model of Down syndrom. *Brain Res.* 765, 313-318 (1997).
- Suojanen, J. N., Gay, R. J., Hilf, R., Influence of estrogen on glutathione levels and glutathione-metabolizing enzymes in uteri and r3230AC mammary tumors of the rat. *Biochem. Biophys. Acta* 630, 485-496 (1980).

- Thomas, A. J., Nockels, R. P., Pan, H. Q., Shaffrey, C. I., Chopp M., Progesterone is neuroprotective after acute experimental spinal cord trauma in rats. *Spine* 24, 2134-2138 (1999).
- Tirassa, P., Thiblin, I., Agren, G., Vigneti, E., Aloe, L., Stenfors, C., High-dose anabolic androgenic steroids modulate concentration of nerve growth factor and expression of its low affinity receptor (p75-NGFr) in male rat brain. *J. Neurosci. Res.* 47, 198-207 (1997).
- Toffa, S., Kunikowska, G. M., Zeng, B. Y., Jenner, P., Marsden, C. D., Glutathione depletion in rat brain does not cause nigrostriatal pathway degeneration. *J. Neural. Transmission* 104, 67-75 (1997).
- Toung, T. J. K., Traystman, R. J., Hurn, P. D., Estrogen-mediated neuroprotection after experimental stroke in male rats. *Stroke* 29, 1666-1670 (1998).
- Tsang, K. L., Ho, S. L., Lo, S. K., Estrogen improves motor disability in parkinsonian postmenopausal women with motor fluctuations. *Neurology* 54, 2292-2298 (2000).
- Tuor, U. I., Simone, C. S., Barks, J. D., Post, M., Dexamethasone prevents cerebral infarction without affecting cerebral blood flow in neonatal rats. *Stroke* 24, 452-457 (1993a).
- Tuor, U. I., Simone, C. S., Arenello, R., Tanswell, K., Post, M., Glucocorticoid prevention of neonatal hypoxic-ischemic damage: role of hyperglycemia and antioxidant enzymes. *Brain Res.* 604, 165-172 (1993b).
- Tour, U. I., Chumas, P. D., Del Bigio, M. R., Prevention of hypoxic-ischemic damage with dexamethasone is dependent on age and not influenced by fasting. *Exp. Neurol.* 132, 116-122 (1995).

- Tuor, U. I., Del Biggio, M. R., Protection against hypoxic-ischemic damage with corticosterone and dexamethasone: inhibition of effect by a glucocorticoid antagonist RU38486. *Brain Res.* 743, 258-262 (1996).
- Tuor, U. I., Glucocorticoids and the prevention of hypoxic-ischemic brain damage. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 21, 175-179 (1997).
- van den Dobbelaen, D. J., Nobel, C. S. J., Schlegel, J., Cotgreave, I. A., Orrenius, S., Slater, A. F., Rapid and specific efflux of reduced glutathione during apoptosis induced by anti-FAS/APO-1 antibody. *J. Biol. Chem.* 271, 15420-15427 (1996).
- Vatassery, G. T., Vitamin E and other endogenous antioxidants in the central nervous system. *Geriatrics* 53, S25-S27 (1998).
- Vedder, H., Weiß, I., Holsboer, F., Reul, J. M. H. M., Glucocorticoid and mineralocorticoid receptors in rat neocortical and hippocampal brain cells in culture: characterization and regulatory studies. *Brain Res.* 605, 18-24 (1993).
- Vedder, H., Anthes, N., Stumm, G., Würz, C., Behl, C., Krieg, J. C., Estrogen hormones reduce lipid peroxidation in cells and tissues of the central nervous system. *J. Neurochem.* 72, 2531-2538 (1999).
- Vedder, H., Teepker, M., Fischer, S., Krieg, J. C., Characterization of the neuroprotective effects of estrogens on hydrogen peroxide-induced cell death in hippocampal HT22 cells: time and dose-dependency. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* 108, 120-127 (2000).
- Vergouwen. M. D., Anderson, R. E., Meyer, F. B., Gender differences and the effect of synthetic exogenous and non-synthetic estrogens in focal cerebral ischemia. *Brain Res.* 878, 88-97 (2000).

- Wallin, C., Puka-Sundwall, M., Hagberg, H., Weber, S. G., Sandberg, M., Alterations in glutathione and amino acid concentrations after hypoxia-ischemia in the immature rat. *Dev. Brain Res.* 125, 51-60 (2000).
- Weisbrot-Lewkowitz, M., Reuhl, K., Perry, B., Chan, P. H., Inouye, M., Mirochnitchenko, O., Overexpression of human glutathione peroxidase protects transgenic mice against focal cerebral ischemia/reperfusion damage. *Mol. Brain. Res.* 53, 333-338 (1998).
- Whittemore, E. R., Loo, D. T., Watt, J. A., Cotman, C. W., A detailed analysis of hydrogen peroxide-induced cell death in primary neuronal cultures. *Neuroscience* 67, 921-932 (1995).
- Wilson, M. E., Dubal, D. B., Wise, P. M., Estradiol protects against injury-induced cell death in cortical explant cultures: a role for estrogen receptors. *Brain Res.* 873, 235-242 (2000).
- Wilson, J. X., Antioxidant defense of the brain: a role for astrocytes. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 75, 1149-1163 (1997).
- Winterbourn, C. C., Metodiewa, D., The reaction of superoxide with reduced glutathione. *Arch. Biochem. Biophys.* 314, 284-290 (1994).
- Woolley, C. S., Effects of estrogens in the CNS. *Curr. Opin. Neurobiol.* 9, 349-354 (1999).
- Wüllner, U., Löschmann, P. A., Schulz, J. B., Schmid, A., Dringen, R., Eblen, F., Turski, L., Klockgether, T., Glutathione depletion potentiates MPTP and MPP+ toxicity in nigral dopaminergic neurons. *Neuroreport* 7, 921-923 (1996).
- Yaffe, K., Lui, L.-Y., Zmuda, J., Cauley, J., Sex hormones and cognitive function in older men. *J. Am. Geriatr. Soc.* 50, 707-712 (2002).
- Yamada, M., Hatanaka, H., Interleukin-6 protects cultured hippocampal neurons against glutamate-induced cell death. *Brain Res.* 643, 173-180 (1994).

- Yan, P., Xu, J., Li, Q., Chen, S., Kim, G.-M., Hsu, C. Y., Xu, X. M., Glucocorticoid receptor expression in the spinal cord after traumatic injury in adult rats. *J. Neurosci.* 19, 9355-9363 (1999).
- Yang, S.-H., Shi, J., Day, A. L., Simpkins, J. W., Estradiol exerts neuroprotective effects when administered after ischemic insult. *Stroke* 31, 745-750 (2000).
- Yao, J. K., Reddy, R. D., van Kammen, D. P., Human plasma glutathione peroxidase and symptom severity in schizophrenia. *Biol. Psychiatry* 45, 1512-1515 (1999).
- Yao, J. K., Leonard, S., Reddy, R., Altered glutathione redox state in schizophrenia. *Dis. Markers* 22, 83-93 (2006).
- Yorbik, O., Sayal, A., Akay, C., Akbiyik, D. I., Sohmen, T., Investigation of antioxidant enzymes in children with autistic disorder. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 67, 341-343 (2002).
- Yoshioka, T., Bills, T., Moore-Jarrett, T., Greene, H. L., Burr, I. M., Ichikawa, I., Role of intrinsic antioxidant enzymes in renal oxidant injury. *Kidney Int.* 38, 282-288 (1990).
- Younes, M., Siegers, C.-P., Mechanistic aspects of enhanced lipid peroxidation following glutathione depletion in vivo. *Chem. Biol. Interact.* 34, 257-266 (1981).
- Young, J., McKinney, S. B., Ross, B. M., Wahle, K. W. J., Boyle, S. P., Biomarkers of oxidative stress in schizophrenic and control patients. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 76, 73-85 (2007).
- Zhang, F., Dryhurst, G., Effects of L-cysteine on the oxidation chemistry of dopamine: new reaction pathways of potential relevance to idiopathic Parkinson's disease. *J. Med. Chem.* 37, 1084-1098 (1994).
- Zhang, W., Yamada, H., Sakei, N., Niikawa, S., Nozawa, Y., Enhancement of radiosensitivity by tamoxifen in C6 glioma cells. *Neurosurgery* 31, 725-729 (1992).

- Zhang, Y.-Q., Shi, J., Rajakumar, G., Day, A., Simpkins, J. W., Effects of gender and estradiol on focal brain ischemia. *Brain Res.* 784, 321-324 (1998).
- Zoroglu, S. S., Armutcu, F., Ozen, S.W., Gurel, A., Sivasli, E., Yetkin, O., Meram, I., Increased oxidative stress and altered activities of erythrocyte free radical scavenging enzymes in autism. *Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci.* 254, 143-147 (2004).

8. Anhang

8.1. Abkürzungen

ADHS: Aufmerksamkeitsdefizit-Hyperaktivitäts-Syndrom

ALS: amyotrophe laterale Sklerose

BSO: Buthionin-Sulfoximin

γ -GCS: γ -Glutamyl-Cystein-Synthetase

GPx: Glutathion Peroxidase

GR: Glutathion Reduktase

GSH: reduziertes Glutathion

GSSG: oxidiertes Glutathion

γ -GT: γ -Glutamyltranspeptidase

4-HNE: 4-Hydroxynonenal

LPO: Lipidperoxidation

MDA: Malondialdehyd

6-MP: 6-Methylprednisolon

NADPH: Nicotinamid-adenin-dinucleotidphosphat

ROS: reaktive Sauerstoffspezies

SOD: Superoxid Dismutase

8.2. Danksagung

Herzlich danken möchte ich an erster Stelle Herrn Prof. Dr. Jürgen-Christian Krieg, Direktor der Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie, für die wissenschaftliche Betreuung meiner Arbeit und das Schaffen der Voraussetzungen zur Durchführung der Untersuchungen. Durch seine konstruktive Diskussion der Untersuchungsergebnisse und Hilfe bei der

Erstellung von Manuskripten hat er wesentlich für das erreichte wissenschaftliche Niveau der Arbeiten gesorgt.

Weiterhin gilt mein besonderer Dank Herrn Prof. Dr. Gerhard Heldmaier für die wissenschaftliche Betreuung der Arbeit und der Unterstützung einschließlich der Diplomarbeit sowie die Vertretung der Arbeit vor dem Fachbereich Biologie.

Ebenfalls ganz herzlich bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Helmut Vedder bedanken. Er hat mich begeistert für biologisch-psychiatrische Grundlagenforschung und mit seiner wissenschaftlichen Kompetenz wesentlich zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen.

Bei Herrn Prof Dr. Philip Heiser möchte ich mich ganz herzlich für die berufliche Zusammenarbeit und den privaten Kontakt in den letzten Jahren bedanken.

Abschließend möchte ich mich bei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des neurobiologischen Labors für die Einarbeitung im Labor und die ständige Hilfs- und Diskussionsbereitschaft sowie die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre bedanken.

8.3. Lebenslauf

Geburtstag: 17.09.1963

Geburtsort: Hamburg

Familienstand: ledig

Eltern: Dr. med. vet. Johannes Schmidt, Tierarzt
Gisela Schmidt, Bankkauffrau

Schulausbildung: 1970-1974 Grundschule Klosterbergen, Reinbek
1974-1983 Sachsenwaldgymnasium, Reinbek
1983 Abitur

Universität: 1983-1990 Studium der Chemie (Diplom) und der Biologie (Diplom)
an der Philipps-Universität Marburg
1990 Diplomprüfung im Fach Biologie [Hauptfach: Zoologie
(Schwerpunkt: Stoffwechselphysiologie), Nebenfächer: Mikrobiologie,
Biochemie und Neurochemie]

1990-1991: Diplomarbeit in der Abteilung für Neurochemie des Physiologisch-
Chemischen-Institutes des Fachbereiches Medizin der Philipps-
Universität Marburg (Thema: Die Aktivierung der Adenylat-Cyclase
durch aminerge Transmitter im Gehirn von Kleinsäugetern) unter der
Betreuung von Prof. Dr. W. Wesemann (Betreuung im Fachbereich
Biologie durch Prof. Dr. G. Heldmaier)

1991-1992: Wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Abteilung für Neurochemie des
Physiologisch-Chemischen-Institutes des Fachbereiches Medizin der
Philipps-Universität Marburg

- 1993-1994: Wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Klinik für Unfallchirurgie (Leiter: Prof. Dr. L. Gotzen) der Philipps-Universität Marburg
- seit Nov. 1997: Anfertigung der Doktorarbeit („Effekte von Glukokortikoiden, gonadalen Steroiden und Interleukinen auf antioxidativ wirksame Substanzen und Enzymsysteme in neuronalen und glialen Zellsystemen“) und wissenschaftliche Mitarbeit an der Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie (Leiter: Prof. Dr. J.-C. Krieg) der Philipps-Universität Marburg