

Seite 1

Aus der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Gastroenterologie,  
Hepatologie und Endokrinologie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Oxidativer Stress als Mechanismus der Neurotoxizität  
durch Ethanol und halluzinogene Amphetamine

Zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité - Universitätsmedizin Berlin

von

Karoline Kiok  
aus Kyritz

Gutachter:           1. Prof. Dr. med. M. Pirlich  
                          2. Prof. Dr. med. J. Priller  
                          3. Prof. Dr. med. T. Grune

Datum der Promotion: 19.11.2010

# Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis .....	3
Zusammenfassung .....	6
Abstract .....	8
Abkürzungsverzeichnis.....	10
1 Einleitung.....	11
1.1 Alkohol .....	11
1.1.1 Hintergrund .....	11
1.1.2 Pharmakologie und Wirkung .....	12
1.1.3 Klinik .....	13
1.2 Amphetamin und Amphetaminderivate .....	14
1.2.1 Hintergrund .....	14
1.2.2 Pharmakologie und Wirkung .....	18
1.2.3 Klinik .....	20
1.3 Mischkonsum .....	21
1.4 Oxidativer Stress .....	21
1.4.1 Reaktive Sauerstoffspezies.....	21
1.4.2 Proteinoxidation .....	23
1.4.3 Lipidperoxidation .....	23
1.4.4 Antioxidative Schutzsysteme.....	23
1.4.4.1 Liponsäure .....	24
1.4.4.2 Vitamin C .....	24
1.4.4.3 N-Acetylcystein .....	25
1.4.5 Neuronale Schädigung.....	26
1.5 Fragestellung.....	27
2 Material und Methoden.....	29
2.1 Material .....	29
2.1.1 Geräte .....	29
2.1.2 Verbrauchsmaterial .....	30
2.1.3 Zelllinie.....	30
2.1.4 Alkohol .....	31
2.1.5 Amphetamine .....	31

2.2	Methoden .....	32
2.2.1	Versuchsablauf .....	32
2.2.2	Zellkultur.....	33
2.2.2.1	Kryokonservierung von Zellen.....	34
2.2.2.2	Mykoplasmentest .....	34
2.2.3	Belastung der Zellen .....	35
2.2.3.1	Einfachbelastungen .....	35
2.2.3.2	Kombinationsbelastungen.....	36
2.2.3.3	Antioxidantien .....	36
2.2.4	Vitalitätstest.....	37
2.2.5	Proteincarbonyle .....	38
2.2.5.1	Messung des Gesamtproteins .....	39
2.2.5.2	Messung der Proteincarbonyle (ELISA).....	40
2.2.6	Malondialdehydbestimmung.....	43
2.3	Graphische Darstellung und statistische Auswertung .....	46
3	Ergebnisse .....	47
3.1	Ethanol.....	47
3.1.1	Zytotoxische Effekte von Ethanol auf HT22 Zellen.....	47
3.1.2	Proteinoxidation durch Ethanolbelastung.....	48
3.1.3	Lipidperoxidation durch Ethanolbelastung .....	49
3.1.4	Ko-Inkubation mit Ethanol und Antioxidantien.....	51
3.1.4.1	Zytotoxische Effekte der Antioxidantien .....	51
3.1.4.2	Effekte von Antioxidantien auf Zytotoxizität und oxidativen Stress durch Ethanol.....	55
3.2	Amphetaminderivate .....	62
3.2.1	Zytotoxizität von MDMA, MDA und MDE .....	62
3.2.2	Proteinoxidation durch MDMA, MDA und MDE.....	64
3.2.3	Lipidperoxidation durch MDMA, MDA und MDE .....	66
3.2.4	Ko-Inkubation von MDMA, MDA bzw. MDE und Antioxidantien.....	68
3.2.4.1	Zytotoxizität von MDMA, MDA bzw. MDE und Protektion durch Antioxidantien .....	68
3.2.4.2	Proteinoxidation durch MDMA, MDA bzw. MDE und Protektion durch Antioxidantien .....	74

3.2.4.3	Lipidperoxidation durch MDMA, MDA bzw. MDE und Protektion durch Antioxidantien .....	76
3.3	Kombinationsbelastungen mit Ethanol und MDMA .....	78
3.3.1	Zytotoxizität durch Ethanol und MDMA auf HT22 Zellen.....	78
3.3.2	Ko-Inkubation mit Antioxidantien bei Kombinationsbelastungen .....	79
3.3.2.1	Zytotoxizität durch Ethanol und MDMA und Protektion durch Antioxidantien .....	79
4	Diskussion .....	82
4.1	Wesentliche Ergebnisse der vorliegenden Arbeit .....	82
4.2	Zytotoxische Effekte von Ethanol .....	85
4.3	Zytotoxische Effekte von Amphetaminderivaten.....	88
4.4	Kombinationsbelastung von Ethanol und MDMA .....	89
4.5	Limitationen der Arbeit .....	90
4.6	Mögliche klinische Bedeutung und Ausblick.....	93
5	Schlussfolgerung .....	95
6	Referenzen .....	96
7	Abbildungsverzeichnis.....	110
8	Anhang .....	111
	Lebenslauf .....	111
	Publikation .....	113
	Erklärung.....	114
	Danksagung .....	115

## Zusammenfassung

Der Konsum von halluzinogenen Amphetaminen wie MDMA („Ecstasy“), MDA („Love“) und MDE („Eve“) ist unter Jugendlichen, insbesondere in der „Clubscene“ weit verbreitet. Hierbei werden die so genannten „Partydrogen“ vor allem in Verbindung mit Alkohol eingenommen. Die Amphetaminderivate können schwere neurologische Symptome verursachen und führen zur irreversiblen Schädigung des Zentralnervensystems. Die Pathophysiologie dieser Nervenzellschädigung ist bislang nicht vollständig geklärt. Bisherige Studien an Zellkulturen und im Tierexperiment legten den Schluss nahe, dass ein Mechanismus der neurotoxischen Effekte von halluzinogenen Amphetaminen ähnlich wie bei Alkohol über oxidativen Stress erfolgt. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die unmittelbaren Auswirkungen einer Belastung mit den psychotropen Substanzen Ethanol und halluzinogenen Amphetaminen auf Zellen des Zentralnervensystems zu untersuchen. Ein Schwerpunkt lag hierbei auf den Nachweis von oxidativem Stress. Zudem wurde die Beeinflussung der zellulären Belastung durch Zugabe verschiedener antioxidativer Substanzen untersucht.

Die Experimente wurden *in vitro* an der neuronalen Zelllinie HT22 durchgeführt. Hierbei handelt es sich um immortalisierte Zellen aus dem Hippokampus der Maus. Die Zellen wurden als präkonfluenter Zellrasen mit Ethanol bzw. den Amphetaminderivaten MDMA, MDA und MDE belastet, indem die Substanz dem Zellkulturmedium beigemischt wurde. Hierbei wurden Konzentrationen von 0 bis 600 mM Ethanol und 0 bis 5 mM MDMA, MDA bzw. MDE verwendet. Liponsäure, Vitamin C, Vitamin E, Katalase, N-Acetylcystein und Desferal wurden als Antioxidantien zugesetzt. Nach einer Inkubation von 24 Stunden wurde die Vitalität der HT22 Zellen mittels der Trypanblau-Methode bestimmt. Zum Nachweis von oxidativem Stress wurden Proteincarbonyle (Proteinoxidation) mittels ELISA und Malondialdehyd (Lipidperoxidation) mittels Fluometrie gemessen.

Bei der Belastung der HT22 Zellen mit Ethanol zeigte sich ein linearer Abfall vitaler Zellen auf 10,2% (600 mM Ethanol) der Negativkontrolle (0 mM Ethanol). Es kam zu einem Anstieg der Proteincarbonyle auf 190,3% (400 mM Ethanol) und des Malondialdehyd auf 129,7% (400 mM Ethanol) des jeweiligen Ausgangswertes (0 mM Ethanol). Bei Zusatz von Liponsäure in niedriger Dosierung wurde eine signifikante Abschwächung dieses Effektes deutlich. Auch bei Zusatz von Vitamin C,

Vitamin E, Katalase und N-Acetylcystein konnte die zytotoxische Wirkung von Ethanol reduziert werden. Hierbei kam es zu einem signifikanten Anstieg der vitalen Zellen unter Belastung mit Ethanol. Auch das Niveau der Proteincarbonyle wurde, wenngleich nicht signifikant, durch Zusatz antioxidativer Substanzen reduziert. Die Ergebnisse des Malondialdehyd waren uneinheitlich.

Bei der Belastung der HT22 Zellen mit den Amphetaminderivaten MDMA, MDA und MDE kam es analog dazu zu einem Abfall der vitalen Zellen. Die Proteincarbonyle stiegen dosisabhängig signifikant um den Faktor 2 bereits bei niedriger Dosis von 0,5 mM MDA. Auch der Marker für die Lipidperoxidation stieg, wenngleich nicht signifikant. Durch den Zusatz antioxidativer Substanzen (Liponsäure, Vitamin C und N-Acetylcystein) konnte dieser Effekt reduziert werden. Insbesondere durch die Kombination mit N-Acetylcystein kam es nach Belastung mit den Amphetaminderivaten zu einem deutlichen Anstieg der vitalen Zellen im Vergleich zur isolierten Belastung. Durch Zusatz von Liponsäure oder N-Acetylcystein ließ sich das Niveau der Proteincarbonyle signifikant senken. Auch das Malondialdehyd konnte durch Zusatz antioxidativer Substanzen reduziert werden.

Bei der Kombinationsbelastung der HT22 Zellen mit Ethanol und dem exemplarisch verwendeten Amphetaminderivat MDMA kam es zu einer Verstärkung der zytotoxischen Effekte der Einzelbelastung. Es zeigte sich ein Abfall der vitalen Zellen teilweise um weitere 20 %, beispielsweise auf ein Niveau von 37,5% (400 mM Ethanol, 0,5 mM MDMA) im Vergleich zur Kontrolle. Auch hierbei konnte durch Zugabe antioxidativer Substanzen eine Reduktion der zytotoxischen Effekte erreicht werden, besonders deutlich wiederum durch N-Acetylcystein.

Zusammengefasst zeigt die vorliegende Arbeit, dass die halluzinogenen Amphetamine MDMA, MDA und MDE dosisabhängig toxische Effekte auf neuronale HT22 Zellen haben. Diese Effekte werden zumindest partiell durch oxidativen Stress vermittelt und werden durch kombinierte Belastung mit Ethanol noch verstärkt. Die gleichzeitige Gabe von Antioxidantien kann diesen toxischen Effekten entgegenwirken. Die protektive Wirkung von Antioxidantien auf neuronale Zellen kann sich bei der Entwicklung neuer Therapien von Patienten mit Drogenintoxikationen als wichtig erweisen und sollte in weiteren Studien verifiziert werden. Wünschenswert wäre die Übertragung dieser Ergebnisse auf ein geeignetes Tiermodell, schließlich auch auf den Menschen im Rahmen von klinischen Studien.

## Abstract

The consumption of hallucinogenic amphetamines such as MDMA (“ecstasy”), MDA (“love”) and MDE (“eve”) is still popular among adolescents, in particular in the “club scene”. These so-called party drugs are often taken in combination with alcohol. The amphetamine derivatives can cause serious neurologic symptoms and result in irreversible damage to the central nervous system. The pathophysiology of this nervous cellular damage is not yet entirely understood. Previous experiments on cell cultures and animal studies give rise to the conclusion that oxidative stress is one of the mechanisms of these neurotoxic effects of hallucinogenic amphetamines.

The intention of this work was to analyze the immediate effects of the psychotropic substances ethanol and hallucinogenic amphetamines on cells of the central nervous system. The experiments were focused on the detection of oxidative stress and modification of the toxic load by the addition of various antioxidative substances.

For the *in vitro* experiments we used HT22 cells. HT22 is a murine cell line of immortalized neural cells of the hippocampus. The cells were incubated in a preconfluent state with ethanol and the amphetamine derivatives MDMA, MDA and MDE respectively by adding the substances to the cell culture medium. Ethanol was used in concentrations of 0 mM to 600 mM and MDMA, MDA and MDE in 0 mM to 5 mM. Lipoic acid, vitamin C, vitamin E, catalase, N-acetylcysteine and desferal were added as antioxidants. After 24-hour incubation the vitality of the HT22 cells was evaluated using trypan blue staining. Oxidative stress was verified by protein carbonyl content (protein oxidation) using ELISA and malondialdehyde content (lipid peroxidation) using fluorometry.

Incubation of the HT22 cells with ethanol caused a linear decline of vital cells to 10.2% (600 mM ethanol) of the controls (0 mM ethanol). The protein carbonyl content increased to 190.3% (400mM ethanol) and the malondialdehyde content to 129.7% (400 mM ethanol) of the respective reference value (0 mM ethanol). By adding lipoic acid this effect was attenuated significantly, even in low lipoic acid concentrations. The addition of vitamin C, vitamin E, catalase and N-acetylcysteine also reduced the cytotoxic effects of ethanol. It caused a distinct increase in the number of vital HT22 cells under incubation with ethanol. The protein carbonyl content was reduced –



although not significantly – by the addition of antioxidative substances. Measurements of malondialdehyde showed inconclusive results in this respect.

An analog decline of vital cells was caused by incubation of HT22 cells with the amphetamine derivatives MDMA, MDA and MDE. The protein carbonyl content increased significantly in a dose-dependent manner by a factor of 2, even at concentrations as low as 0.5 mM MDA. The marker for lipid peroxidation also rose, but not significantly. By the addition of antioxidative substances (lipoic acid, vitamin C and N-acetylcysteine) this cytotoxic effect could be reduced. In particular N-acetylcysteine caused a distinct increase in vital cells in HT22 cells incubated with amphetamine derivatives compared to the controls without antioxidants. By the addition of lipoic acid and N-acetylcysteine the protein carbonyl content could be reduced significantly. The level of malondialdehyde could likewise be reduced by the addition of antioxidant substances.

Co-incubation of HT22 cells with ethanol and the amphetamine derivative MDMA increased the cytotoxic effects of the isolated substances and caused a decline of vital cells by additional 20%, e. g. on a level of 37.5 % (400 mM ethanol, 0,5 mM MDMA) of the negative control. These cytotoxic effects could be reduced by the addition of antioxidative substances as well, again in particular by N-acetylcysteine.

In conclusion, the present experiments show that the hallucinogenic amphetamines MDMA, MDA and MDE have dose-dependent toxic effects on neuronal HT22 cells. These effects are mediated by oxidative stress and can be intensified by co-incubation with ethanol. By the addition of antioxidants these toxic effects can be partially antagonized. This protective effect of antioxidants on neuronal cells may prove to be important for the development of new therapeutic substances for the treatment of patients with drug poisoning and should be verified in further studies. The transfer of these findings to an appropriate animal model and eventually to clinical trials in humans should be the aim.

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
BCA	Bicinchoninsäure
BHT	Butyl-Hydroxy-Toluol
bidest.	zweifach destilliert
BSA	Bovines Serum Albumin
BTMG	Betäubungsmittelgesetz
bzw.	beziehungsweise
DAPI	Diamidino-Phenylindol
DMEM	Dulbecco's modified Eagle medium
DMSO	Dimethyl-Sulfon-Oxid
DNP	Dinitrophenylhydrazon
DNPH	Dinitrophenylhydrazin
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
FBS	Fötales Bovines Serum
GSH	Glutathion
HPLC	Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie
Kap.	Kapitel
MDA	3,4-Methylenedioxyamphetamin
MDE	3,4-Methylenedioxyethylamphetamin
MDMA	3,4-Methylenedioxymethamphetamin
MEOS	mitochondrial ethanol oxidizing system
N-Ac	N-Acetylcystein
PBS	Phosphate Buffered Saline
POD	Peroxidase
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
TBA	Thiobarbitursäure
TBA-RS	thiobarbitursäurereaktive Substanzen
USA	United States of Amerika
ZNS	zentrales Nervensystem

# 1 Einleitung

## 1.1 Alkohol

### 1.1.1 Hintergrund

Alkohol zählt zu den meistkonsumierten Drogen der Welt. Schon seit Jahrtausenden übt der Genuss von Alkohol seine Faszination auf den Menschen aus, wobei ein ausgeprägter Konsum erst seit dem Mittelalter bekannt ist<sup>1,2</sup>. Grund hierfür scheint jedoch weniger eine vor dieser Zeit kritischere Haltung dem Genussmittel gegenüber als vielmehr die relative Knappheit der zur Herstellung benötigten Inhaltsstoffe zu sein, so dass der Alkoholgenuss der reichen Bevölkerung vorbehalten war. Heute ist der Konsum dieser sogenannten „Alltagsdroge“ weltweit und in allen gesellschaftlichen Schichten weit verbreitet und allgemein hin akzeptiert. Auch in Deutschland ist die Zahl derer, die regelmäßig Alkohol konsumieren laut Bundeszentralregister für gesundheitliche Aufklärung seit Jahren nahezu unverändert hoch. Die deutsche Hauptstelle für Suchtfragen veröffentlichte dazu im Jahre 2008 eine Statistik, die unter anderem den Alkoholkonsum je Einwohner an reinem Alkohol darstellt. Im Jahr 1998 lag dieser Pro-Kopf-Konsum bei 10,6 Liter, im Jahr 2006 bei 10,1 Liter<sup>3</sup>. In Deutschland gelten 1,3 Mio. Einwohner (2,4 %) als alkoholabhängig, bei 2,0 Mio. (5 %) geht man von schädlichem Alkoholmissbrauch aus. Insgesamt sind Männer dreimal so häufig betroffen wie Frauen<sup>4</sup>. Über 25% der Todesfälle bei Männern zwischen 35 und 65 Jahren sind direkt oder indirekt durch den Konsum von Alkohol bedingt<sup>5</sup>. Alkoholassoziierte Erkrankungen verursachten in Deutschland im Jahre 2002 volkswirtschaftliche Kosten in Höhe von 24,4 Mrd. €<sup>6</sup>. In den USA liegt die Quote der Erwachsenen mit chronischem Alkoholmissbrauch bei etwa 7,4 %. Im Jahre 1998 wurden durch Alkoholmissbrauch in den USA Kosten in Höhe von etwa 185 Milliarden Dollar verursacht<sup>7</sup>.

Im Bericht des Bundeszentralregisters für gesundheitliche Aufklärung vom November 2004 zeigt sich erstmals seit den 1970er Jahren wieder ein deutlicher Anstieg des Konsums bestimmter Alkoholika. So ist im Vergleich von 2001 zu 2004 der Konsum von alkoholischen Mischgetränken, sog. Alcopops, von 8% auf 16 % gestiegen.

Hierbei hat insbesondere der Verbrauch in der Gruppe der Jugendlichen und jungen Erwachsenen zugenommen <sup>8</sup>. Aufgrund bekannter Risiken ist die Ausgabe alkoholischer Getränke an unter 18jährige nach Jugendschutzgesetz nur eingeschränkt erlaubt <sup>9</sup>.

### 1.1.2 Pharmakologie und Wirkung

Als Alkohol wird umgangssprachlich das bei der Vergärung von Zucker entstehende Ethanol bezeichnet. Dieser Vorgang findet als stark exogene und somit energiebringende Reaktion in der Hefe statt und wird als alkoholische Gärung bezeichnet <sup>10</sup>. Traditionell nutzt man für die Herstellung zuckerhaltige Lebensmittel wie Weintrauben oder andere Früchte, Getreide oder Kartoffeln. Der Alkoholgehalt der Gärungsprodukte liegt bei etwa 4 – 13 Vol. % und kann durch Destillation noch deutlich gesteigert werden. Chemisch handelt es sich bei Ethanol (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH) und anderen Alkoholen um organische Verbindungen, die durch die Hydroxylgruppe als funktionelle Gruppe gekennzeichnet sind. Ethanol wird hepatozytär unter Bildung der Zwischenprodukte Acetaldehyd und Acetat abgebaut. Bei Gesunden geht man hierbei von einer Abbaugeschwindigkeit von etwa 1 g Alkohol pro 10 kg Körpergewicht und Stunde aus. Prinzipiell stehen dem Körper für die Elimination drei Wege zur Verfügung, wobei der Abbau über die cytosolische Alkoholdehydrogenase mit bis zu 90 % bei weitem überwiegt <sup>11</sup>. Bei starkem und regelmäßigem Alkoholkonsum kommt durch verstärkte Induktion des Cytochrom P450 2E1 auch der Elimination über das sogenannte mitochondriale Ethanoloxidierungssystem (MEOS) eine größere Rolle zu <sup>12,13</sup>. Der Metabolismus über Katalase scheint relativ unbedeutend <sup>14</sup>.

Ursächlich für die toxische Wirkung des Ethanols scheint insbesondere das beim Abbau entstehende Acetaldehyd und die Aktivierung des Cytochrom P450 2E1 zu sein. Beides kann die Entstehung von oxidativem Stress begünstigen. Acetaldehyd ist in der Lage, als äußerst reaktive Substanz mit diversen Proteinen wie beispielsweise dem Antioxidans Glutathion (GSH) zu interagieren und somit deren Funktion zu beeinträchtigen. Die Oxidation von Ethanol im MEOS über das Cytochrom P450 2E1 führt zu einer vermehrten Bildung freier Radikale, was ebenfalls die Entstehung von oxidativem Stress begünstigt.

Neben den Genannten löst Ethanol im Organismus auch eine Vielzahl weiterer Effekte aus. So werden durch Interaktion von Acetaldehyd mit biogenen Aminen wie Tryptophan und Dopamin halluzinatorische Stoffe gebildet. Diese spielen möglicherweise bei der Entstehung der Alkoholabhängigkeit eine Rolle<sup>15</sup>. Weiterhin kommt es zu Störungen der mitochondrialen Funktion und zu Effekten auf das Immunsystem oder den Eicosanoidstoffwechsel. Ethanol kann durch sein Vermögen, in biochemische Prozesse einzugreifen, nahezu jedes Organ schädigen. Zahlreiche Experimente haben gezeigt, dass auch für die neuronalen Schädigungen durch Ethanol die Auslösung von oxidativem Stress eine wichtige Rolle spielt, wobei die Hippokampus-Region besonders betroffen zu sein scheint<sup>16-18</sup>. Eine Ursache hierfür könnte die ethanolvermittelte Dopaminfreisetzung sein, die in verschiedenen Studien belegt wurde<sup>19</sup>.

### 1.1.3 Klinik

Alkohol hat eine Vielzahl klinischer Auswirkungen. Die wohl für die große Beliebtheit von Alkohol verantwortliche Wirkung wird in erster Linie über cerebrale Effekte vermittelt und ist stark dosisabhängig. Die Konzentration des Alkohols im Blut (gemessen in Promille oder g/dl) sind hierbei nur als grobe Orientierung anzusehen und variieren je nach Konstitution, Geschlecht, „Training“, Umweltfaktoren und vielem anderen. Mäßiger Alkoholkonsum entsprechend etwa einer Blutalkoholkonzentration von 0,2 ‰ wirkt zunächst euphorisierend und stimmungssteigernd. Die Kommunikationsbereitschaft wird erhöht und die Aufnahme sozialer Kontakte erleichtert. Diese Effekte treten in höheren Konzentrationen ab ca. 1,0 ‰ allerdings in den Hintergrund. Die vormals gelöste Stimmung kann in Unzugänglichkeit oder sogar Aggression umschlagen, es kommt zu Störungen des Reaktions-, Sprach- und Gleichgewichtsvermögens. Ab ca. 2,0 ‰ werden schwerwiegendere Auswirkungen auf cerebrale Funktionen, wie Orientierungs- und Gedächtnisschwierigkeiten und Vigilanzminderung beobachtet. Starke Intoxikationen können zu Koma und Tod führen. Außerdem werden vegetative Effekte wie Störungen der Thermoregulation beobachtet<sup>20</sup>.

Chronischer Alkoholkonsum führt zu einer Reihe weiterer somatischer und psychischer Veränderungen. Hierzu zählen Organschäden wie Leberzirrhose, Pankreatitis, Herzerkrankungen und eine erhöhte Inzidenz von Tumorerkrankungen.

Es treten psychische Erkrankungen wie Schizophrenie, Psychosen, Angststörungen und Depression auf. Neben polyneuropathischen Veränderungen kommt es auch zur Hirnatrophie, zum vermehrten Auftreten epileptischer Krampfanfälle, demenzieller Erkrankungen und des Wernicke-Korsakoff-Syndroms. Hinzu kommen psychosoziale Folgen des Alkoholismus wie Konflikte mit der Familie, mit Freunden und den Behörden, sowie zu einer erhöhten Inzidenz von Unfällen <sup>21</sup>.

## 1.2 Amphetamin und Amphetaminderivate

### 1.2.1 Hintergrund

Der Konsum von Ecstasy und verwandten Substanzen ist in den USA und Europa weit verbreitet <sup>22</sup>. Seit Mitte 1980er Jahre sind insbesondere in der Gruppe der Jugendlichen und Heranwachsenden diese Amphetaminderivate neben Alkohol häufig konsumierte „Partydrogen“. Die Deutsche Hauptstelle gegen die Suchtgefahren e. V. (DHS) veröffentlichte hierzu eine Statistik, die unter anderem die Entwicklung der polizeilichen Rauschgiftsicherstellungen dokumentiert. Die Zahl der eingezogenen Konsumeinheiten von Ecstasy stieg dabei von 419.329 im Jahre 1998 auf 3.200.000 im Jahre 2001 an und hat sich damit in dieser Zeit auf mehr als das 7,6fache erhöht <sup>23</sup>. Seither sind die Mengen sichergestellter Amphetaminderivate in Deutschland wieder rückläufig und betragen knapp 1.000.000 Konsumeinheiten im Jahr 2007 <sup>3, 24</sup>. Nach wie vor ist Ecstasy jedoch die am zweithäufigsten konsumierte illegale Droge nach Cannabis in Deutschland <sup>25</sup>. Bemerkenswert ist die Tatsache, dass Ecstasy sich gerade bei Erstkonsumenten illegaler Drogen großer Beliebtheit erfreut. So veröffentlichte Rolf Hasler einen Artikel über die Rauschgiftlage 1997, in der der Anteil von Amphetaminen oder Ecstasy an den konsumierten Erstdrogen mit mehr als einem Drittel beziffert wurde <sup>26</sup>.

Die Vereinten Nationen verzeichneten in ihrem World Drug Report 2008 weltweit etwa 9,0 Millionen Ecstasykonsumenten pro Jahr, entsprechend 0,2 % der Weltbevölkerung. In den Entwicklungsländern Asiens und Südamerikas zeichnet sich weiterhin ein zunehmender Konsum von Amphetaminderivaten und insbesondere Ecstasy ab <sup>27</sup>. Noch im Jahre 2004 musste auch in den USA von einem weiter steigenden Konsum ausgegangen werden <sup>28</sup>. In einer landesweiten Befragung von 2007 unter Jugendlichen zwischen 18 und 25 Jahren wurde eine 12-Monats-Prävalenz für den Konsum von Ecstasy von 3,5 % ermittelt, und damit ein Rückgang

von 2,3 % im Vergleich zu 2002. Allerdings liegt die Lebenszeit-Prävalenz in dieser Altersgruppe nach wie vor bei 12,8 %<sup>29</sup>. Eine Querschnittsstudie des amerikanischen Gesundheitsministeriums kommt 2007 zu einem ähnlichen Ergebnis und beziffert die 12-Monats-Prävalenz für den Konsum von Ecstasy in der Altersgruppe 19 bis 24 Jahre mit 2,8 %<sup>30</sup>. In Europa haben 2007 2,6 Millionen Menschen Ecstasy eingenommen. In der Altersgruppe der 15- bis 34-Jährigen betrug die 12-Monats-Prävalenz für 2007 1,8 % und untermauert damit Berichte über die Stabilisierung oder sogar rückläufige Tendenz beim Ecstasykonsum in Europa. Allerdings zeigen Studien zum Drogenkonsum in ausgewählten Freizeitmilieus mit vornehmlich jungem Publikum alarmierende Ergebnisse: Bei jungen Erwachsenen (15 – 30 Jahre), die regelmäßig Nachtlokale besuchen, lag 2006 die Lebenszeit-Prävalenz für Ecstasykonsum bei 27 % gegenüber 5,6% in der Gesamtbevölkerung der selben Altersgruppe<sup>31</sup>. In der Bundesrepublik Deutschland wurden in den vergangenen Jahren weitgehend stabile Tendenzen beobachtet. Im Jahre 2006 lag die 12-Monats-Prävalenz in der Altersgruppe von 18 bis 24 Jahre bei 1,9 % und damit etwa im europäischen Mittel. Die Lebenszeit-Prävalenz in der selben Altersgruppe liegt mit 5,4 % nur unwesentlich unter dem Wert von 5,6 % der europäischen Vergleichsgruppe<sup>32</sup>. In Ballungszentren wie Berlin sind die Zahlen erwartungsgemäß höher. Im Epidemiologischen Suchtsurvey von 2006 wird die 12-Monats-Prävalenz des Ecstasykonsums in der Altersgruppe der 15- bis 39-Jährigen mit 2,8 % angegeben. Während hier bei der 12-Monats-Prävalenz nahezu eine Halbierung seit 1995 eingetreten ist, steigt die Lebenszeit-Prävalenz weiter an und liegt mit 9,9 % deutlich über dem europäischen Mittel<sup>33</sup>.

Die Grundsubstanz Amphetamin wurde erstmalig 1887 im Rahmen seiner Doktorarbeit vom rumänischen Chemiker Lazăr Edeleanu synthetisiert<sup>34</sup>. Es wurde 1932 unter dem Namen Benzedrine® als Asthmamittel zur Inhalation kommerziell erhältlich. Es folgten Anwendungen als Mittel gegen Heuschnupfen und Erkältung, aber auch als Appetitzügler und Psychostimulanz zur Therapie von Depressionen, Morbus Parkinson und Narkolepsie. Während des 2. Weltkrieges wurde Amphetamin eingesetzt, um die Kampfkraft der Soldaten zu stärken. 1948 wurde es in den USA als Dexedrine® zur Behandlung von ADS bei Kindern auf den Markt gebracht<sup>35</sup>. 1914 patentierte die Firma Merck den Syntheseweg des dem Amphetamin verwandten Methylsafrylamin<sup>36</sup>. Methylsafrylamin, später als 3,4-Methylenedioxy-methamphetamin (im Folgenden MDMA) bezeichnet, hat eine stärkere

psychostimulierende Wirkung, als Amphetamin, und wurde daher bis in die 1980er Jahre in der Psychotherapie eingesetzt <sup>37</sup>. Aufgrund der suchterzeugenden und psychoaktivierenden Wirkung wurde der Einsatz von MDMA als Medikament allerdings stark beschränkt. Erste Studien über eine eventuell neurotoxische Wirkung von MDMA brachten der Substanz 1985 zunächst ein Verbot in den USA ein <sup>38, 39</sup>. Seit 1986 ist MDMA auch in Deutschland nach Betäubungsmittelgesetz (im Folgenden BTMG) gelistet <sup>40</sup>. Neuere Studien rücken die therapeutischen Wirkungen von MDMA wieder in den Vordergrund. So wird unter anderem der medikamentöse Einsatz gegen die posttraumatische Anpassungsstörung diskutiert <sup>41, 42</sup>.

Zwei weitere Amphetaminderivate gehören zu den sogenannten Designerdrogen. 3,4-Methylenedioxyamphetamin (im Folgenden MDA) und 3,4-Methylenedioxyethylamphetamin (im Folgenden MDE) sind dem MDMA strukturell sehr ähnlich und unterscheiden sich nur durch eine Aminogruppe an der Seitenkette. MDA entsteht unter anderem beim Abbau von MDMA und wirkt im Vergleich zu MDMA nicht so stark halluzinogen, was der Substanz auch den Namen „Americas weiche Droge“ (Mellow Drug of America), oder „Love“ einbrachte. Der Name „Love“ entstand ursprünglich aufgrund der die Feinfühligkeit und Empathie steigernden Wirkung des MDA <sup>43, 44</sup>. Nach dem Verbot von MDMA wurde als Ersatzstoff zunächst vermehrt MDE verwendet. Seit Beginn der 1990er Jahre ist dieses Verbot allerdings auch auf die verwandten Substanzen MDA und MDE ausgedehnt <sup>45</sup>. Trotz dessen hat der Konsum der sogenannten Modedrogen MDMA, MDA und MDE besonders in den 90er Jahren stark zugenommen <sup>46</sup>.

## Ecstasy

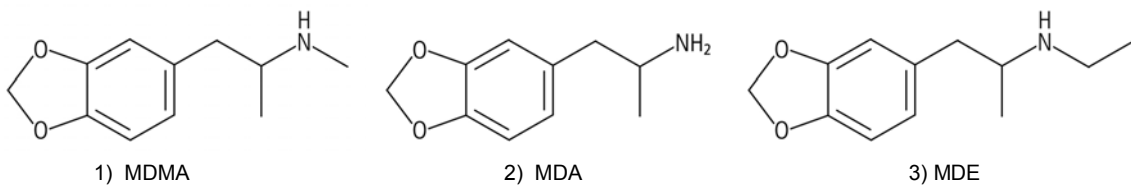
Umgangssprache	Chemische Bezeichnung	Abkürzung
Ecstasy	3,4-Methylen <u>d</u> ioxy <u>m</u> eth <u>a</u> mphetamin	MDMA
Love	3,4-Methylen <u>d</u> ioxy <u>a</u> mphetamin	MDA
Eve	3,4-Methylen <u>d</u> ioxy <u>e</u> thylamphetamin	MDE

Ecstasy ist heute eine Sammelbezeichnung für eine Vielzahl von Amphetaminderivaten. Neben MDMA enthält es häufig auch MDA und MDE in unterschiedlichen Konzentrationen <sup>32</sup>. Die ehemals übliche Unterscheidung in „Ecstasy“ (MDMA), „Love“ (MDA) und „Eve“ (MDE) ist so heute nicht mehr



gebräuchlich. Die Abbildung 1 zeigt die chemischen Strukturformeln von MDMA, MDA und MDE.

**Abbildung 1**



**Abbildung 1: Strukturformeln**

Abgebildet sind die chemischen Strukturformeln von MDMA, MDA und MDE. Auffallend ist die strukturelle Verwandtschaft der Substanzen, die sich nur in einer Aminogruppe unterscheiden.

Die Substanzen sind mit einem Trägermittel vermischt und meist in Tablettenform oder zu Kapseln mit unterschiedlichen Motiven gepresst (Abbildung 2).

**Abbildung 2**



**Abbildung 2: Ecstasytabletten**

Abgebildet sind Ecstasytabletten in verschiedenen Farben, Formen und mit unterschiedlichen Motiven. Mit freundlicher Genehmigung der Polizeilichen Kriminalprävention der Länder und des Bundes.  
[www.polizei-beratung.de](http://www.polizei-beratung.de)

## 1.2.2 Pharmakologie und Wirkung

Pharmakologisch sind Amphetamine Derivate des Phenylethylamins. Durch einmalige Substitution mit einer  $\text{CH}_3$ -Gruppe an der Seitenkette des Phenylethylamins entsteht das Amphetamin. Eine zweite Substitution mit einer  $\text{CH}_3$ -Gruppe ebenfalls an der Seitenkette kennzeichnet das Metamphetamin. Diese beiden klassischen Psychostimulantien sind dann Ausgangsstoffe für die Synthese der Weckamine bzw. der halluzinogenen Amphetamine. Erfolgen weitere Substitutionen an der Seitenkette des Amphetamins bzw. Metamphetamins werden die vigilanzsteigernden Weckamine bzw. Appetitzügler gebildet. Die halluzinogenen Amphetaminderivate, zu denen definitionsgemäß auch die Designerdrogen MDMA, MDA und MDE gehören, entstehen durch Substitution am aromatischen Ring des Amphetamins bzw. Metamphetamins.

Die nach ihrer chemischen Struktur den halluzinogenen Amphetaminen zugeordneten „Designerdrogen“ werden nach ihrer Wirkungsweise häufig auch als eigene Substanzgruppe unter dem Begriff Entaktogene zusammengefasst. So haben sie nicht nur eine den halluzinogenen Amphetaminen eigene serotonerge Wirkung, sondern auch die dopaminergen Eigenschaften der klassischen Psychostimulantien Amphetamin und Metamphetamin <sup>47-49</sup>. Die serotonerge Wirkung wird über gesteigerte präsynaptische Serotoninfreisetzung, eine Reuptakehemmung von Serotonin sowie einen direkten Agonismus am  $5\text{HT}_1$ - und  $5\text{HT}_2$ -Rezeptor vermittelt und ist für die psychostimulierende Wirkung der halluzinogenen Amphetamine verantwortlich <sup>50, 51</sup>. In Zellkultur- und tierexperimentellen Studien konnte gezeigt werden, dass es durch MDMA hierzu vor allem in Zellen des Neokortex, Striatum und Hippokampus kommt. So konnten u. a. Schmidt et al. eine erhöhte Serotoninfreisetzung durch Demethylierung von MDMA über das Cytochrom P450 2D6 bei Ratten nach Belastung mit Amphetaminderivaten zeigen <sup>52</sup>. Die Depletion des serotonergen Systems wird möglicherweise durch die Inhibition der neuronalen Monoaminoxidase verstärkt <sup>53</sup>. Die indirekte dopaminerge und noradrenerge Wirkung entsteht über eine vermehrte Freisetzung und Reuptakehemmung dieser Stoffe und anderer biogener Amine und äußert sich als indirekte sympathomimetische Wirkung in einer Stimulation des Herz-Kreislauf- und zentralen Nervensystems <sup>54</sup>.

Infolgedessen kommt es im weiteren zu einer Degeneration der serotonergen <sup>55</sup> und dopaminergen Neurone <sup>56</sup>, was sich in erniedrigten 5HT-Spiegeln und

Tryptophanhydroxylase-Aktivität zeigt<sup>57, 58</sup>. Dies führt zu Symptomen, die denen der Parkinson-Krankheit ähnlich sind<sup>56</sup>. Der Mechanismus dieser Degeneration ist nicht gänzlich geklärt, wobei eine mögliche Rolle einiger Metabolite der Amphetaminderivate diskutiert wird<sup>59</sup>.

Insbesondere oxidativer Stress als Mechanismus der Neurotoxizität durch Amphetaminderivate ist mittlerweile Gegenstand der Forschung<sup>60, 61</sup>. Colado und Green beschrieben 1995 die Bildung freier Radikale in serotonergen Nervenendigungen nach MDMA-Injektion als eine mögliche Ursache für die Neuronendegeneration<sup>62</sup>. Oxidativer Stress nach vermehrter Dopaminfreisetzung wird vor allem durch die Autooxidation von Dopamin verursacht, was zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies und zytotoxischer Chinone führen kann<sup>52</sup>. Ursächlich für die Degeneration der dopaminergen Neurone scheint nach Colado zusätzlich die vermehrte Dopaminfreisetzung durch Dopamin als eine direkte Interaktion mit dem Dopaminrezeptor zu sein<sup>63</sup>. Beim Dopaminabbau über die Monoaminoxidase-B entsteht  $H_2O_2$  als ein Zwischenprodukt.  $H_2O_2$  wird aufgrund seiner Fähigkeit, hochaktive Hydroxylradikale zu bilden, zur Gruppe der reaktiven Sauerstoffspezies (im Folgenden ROS) gezählt. In der Folge kann es in den betroffenen Geweben zu vermehrtem oxidativem Stress und Lipidperoxidation kommen<sup>64</sup>. Ein durch die vermehrte Dopaminfreisetzung vermittelter Anstieg der Körpertemperatur verstärkt zusätzlich die Neurotoxizität<sup>65, 66</sup>. Burrows et al. lieferten Hinweise, dass MDMA auch eine Störung der mitochondrialen Atmungskette bewirken kann<sup>67</sup>. Hierbei scheinen wiederum reaktive Sauerstoffspezies eine wichtige Rolle zu spielen. Durch Messung erhöhter Spiegel proinflammatorischer Zytokine, wie Interleukin I $\beta$ , nach Einfluss von MDMA konnten Orio et al. zeigen, dass auch eine Entzündungsreaktion an der Neurotoxizität halluzinogener Amphetamine beteiligt ist<sup>68</sup>.

Der Abbau von MDMA erfolgt in der Leber über das Cytochrom P 450 2D6<sup>69, 70</sup>. Cole und Sumnall beschreiben in ihrem umfassenden Review toxische Metabolite des MDMA, die bei der Oxidation von MDMA über Cytochrom P 450 2D6 entstehen. So ist 3,4-Dihydroxymethamphetamin (DHMA) das direkte Produkt bei der Metabolisierung von MDMA und ein toxischer Metabolit der MDMA-vermittelten Neurotoxizität<sup>43</sup>.

### 1.2.3 Klinik

Ursache für die weite Verbreitung der Amphetaminderivate ist wohl hauptsächlich ihre empathogene und entaktogene Wirkung<sup>71</sup>. Dem Konsumenten wird das Gefühl vermittelt, die eigene innere Psyche berühren zu können<sup>72</sup>. Es wird ein inneres Glücksgefühl, Euphorie und friedliche Selbstakzeptanz ausgelöst. Das Selbstvertrauen wird gesteigert und Ängste abgebaut. Kontakt- und Kommunikationsfähigkeit wird erhöht, die Konsumenten verlieren ihre Ängste im sozialen Kontakt. Die Wahrnehmung visueller und akustischer Reize wird intensiviert<sup>73</sup>. Nach Abklingen der stimulierenden Wirkung kommt es im Verlauf zu Erschöpfungszuständen. Auch Schlaf- und Konzentrationsstörungen sowie Depressionen und Angststörungen sind beschrieben.

Zu den physischen Symptomen nach Einnahme von Ecstasy zählen unter anderen Appetitlosigkeit, Schlaflosigkeit, Schwitzen, Übelkeit, Muskelschmerzen und Ataxie<sup>74</sup>.<sup>75</sup> Bereits bei niedriger Dosierung können Bewusstseinsstörungen bis hin zu Bewusstseinsverlust, Tachypnoe und tachykarde Herzrhythmusstörungen auftreten<sup>76</sup>. Seltener kommt es zu hypertensiven Krisen und Krampfanfällen<sup>77</sup>. Des Weiteren führen Amphetamine aufgrund der vermehrten Dopaminfreisetzung zu einem Anstieg der Körpertemperatur<sup>78</sup>. Bei einer Intoxikation mit halluzinogenen Amphetaminen kann es zu der vital bedrohlichen Hyperthermie kommen. MDMA bewirkt eine Dehydratation und kann eine Steigerung der Körperkerntemperatur auf bis zu 42 °C verursachen. Erhöhte Umgebungstemperaturen in Diskotheken und eine vermehrte Wärmeproduktion des Körpers bei exzessivem Tanzen verstärken diese Hyperthermie zusätzlich<sup>79</sup>. Warnsignale können vom Konsumenten nicht mehr richtig gedeutet werden, was zu einer Verstärkung der Symptomatik mit Organversagen, Koma und Tod führen kann. Exzessive serotonerge Stimulation kann im sogenannten „Serotonin-Syndrom“ gipfeln, welches durch Störungen im neuromuskulären Bereich, Bewusstseins- und vegetative Störungen gekennzeichnet ist und lebensbedrohliche Krisen auslösen kann<sup>80-82</sup>.

Bemerkenswert ist die Tatsache, dass die Wirkung der „Designerdrogen“ nicht allein durch die aufgenommene Menge, sondern vielmehr auch durch die Umgebungsbedingungen bestimmt wird. So kommt es zur Wirkungsverstärkung bei lauter Umgebung, flimmernden Lichteffekten und Dehydratation, wie sie bei Diskothekbesuchen typisch sind<sup>83</sup>.

Erste Effekte treten etwa 15 Minuten nach Einnahme auf, wobei die maximale Wirkung nach etwa 2 Stunden zu erwarten ist. Nach 4-7 Stunden klingt die Wirkung langsam ab, zum Teil kann sie aber auch deutlich länger anhalten<sup>49, 84</sup>.

### **1.3 Mischkonsum**

Der isolierte Konsum einer psychotropen Substanz kann, wie beschrieben, bereits eine Vielzahl von gesundheitsschädlichen Folgen haben, ist allerdings die Ausnahme. Ein Mischkonsum verschiedener Substanzen und Substanzgruppen verstärkt nicht nur die erhoffte Wirkung der einzelnen Substanzen, sondern führt auch zur Potenzierung der schädlichen Nebenwirkungen und Gefahren. Gerade unter Jugendlichen und im Rahmen von Diskothekbesuchen ist ein solcher Mischkonsum weit verbreitet<sup>22</sup>. Hier ist besonders die durchaus übliche gleichzeitige Einnahme von Alkohol und Amphetaminderivaten hervorzuheben. Wie oben beschrieben, hat in der Gruppe der Jugendlichen und jungen Erwachsenen in den letzten Jahren der Konsum beider Substanzgruppen als sogenannte „Partydrogen“ deutlich zugenommen. Welche Auswirkungen dieser Mischkonsum hat und inwieweit hierdurch die schädlichen Wirkungen der Einzelsubstanzen verstärkt werden, ist weitgehend unbekannt.

### **1.4 Oxidativer Stress**

#### **1.4.1 Reaktive Sauerstoffspezies**

Bei physiologischen Stoffwechselfvorgängen werden im Organismus ständig reaktive Sauerstoffspezies (ROS) gebildet. Eine Quelle ist die mitochondriale Atmungskette der Zelle. Diese stellt eine wichtige Energiequelle für den Organismus dar. Bei der Reduktion von Sauerstoff wird Energie frei, die zur Phosphorylierung von Adenosindiphosphat (ADP) zu Adenosintriphosphat (ATP) genutzt wird. Hierbei kommt es in einem geringen Ausmaß zu Elektronenverlusten. Dies führt dazu, dass bei der Reduktion dieses Sauerstoffmoleküls kein Wasser, sondern ROS entstehen. Hierzu zählen freie Radikale wie das Hydroperoxydion ( $O_2^{\cdot-}$ ) und das Hydroxyl-Radikal

(HO·)<sup>85</sup>. Ein weiterer wichtiger Ausgangspunkt für die Entstehung freier Radikale im Organismus ist das Enzymsystem Cytochrom P450, welches eine Vielzahl von Aufgaben im Stoffwechsel erfüllt<sup>86</sup>. Auch physikalische Einflüsse wie mechanische Reizungen oder Strahlungen spielen bei der Bildung freier Radikale eine große Rolle. ROS sind durch das Auftreten eines freien Elektrons gekennzeichnet und sehr reaktionsfreudig. In physiologischen Konzentrationen haben sie wichtige Aufgaben. So regulieren sie beispielsweise die Induktion der Apoptose, aktivieren immunmodulierende Transkriptionsfaktoren und wirken chemotaktisch auf Entzündungszellen<sup>87, 88</sup>.

Kommt es zu einem Missverhältnis zwischen ROS und antioxidativen Schutzsystemen, spricht man von oxidativem Stress<sup>89</sup>. Diese Situation entsteht durch vermehrtes Anfallen ROS oder durch eine Verminderung antioxidativer Schutzsysteme. Hierdurch kommt es zur Akkumulation zellulärer Oxidationsprodukte, was Zellschädigungen bis hin zum Zelltod zur Folge haben kann. Zum einen wird dies über eine Aktivierung intrazellulärer Signalwege vermittelt, welches auch bei gesunden Zellen nach Erschöpfung zellulärer Reparatursmechanismen zur Apoptose, dem programmierten Zelltod, führen kann. Zum anderen kommt es zur Oxidation zellulärer Bestandteile wie DNA, Proteinen oder Fettsäuren in Membranphospholipiden. Dies zieht zelluläre Schädigungen wie den unprogrammierten nekrotischen Zelltod nach sich.

Untersuchungen zeigen, dass insbesondere die mitochondriale DNA durch oxidativen Stress geschädigt wird<sup>90</sup>. Grund hierfür scheint unter anderem die hohe Bildungsrate von ROS durch die mitochondriale Atmungskette zu sein. Die hierdurch verminderte Mitochondrienleistung wird mit dem zellulären Alterungsprozess in Verbindung gebracht<sup>91</sup>.

Wichtige bekannte Ursachen für die Entstehung von Situationen, in denen die Produktion ROS die Kapazität der antioxidativen Schutzsysteme übersteigt, sind Tabakrauchen, Infektionen, UV-Strahlungsexposition und übermäßiger Alkoholkonsum. Auch die zu geringe Zufuhr antioxidativer Substanzen durch Fehlernährung kann zu oxidativem Stress führen.

### 1.4.2 Proteinoxidation

Proteine sind Grundbaustein aller Zellen und haben mannigfaltige Funktionen im Organismus. Durch oxidativen Stress kommt es zu einer Vielzahl oxidativer Modifikationen an Proteinen wie Oxidation von Sulfhydrylgruppen, Bildung von Proteindisulfiden oder – durch Einwirkung von Hydroxylradikalen – Entstehung von Carbonylen an Lysin, Arginin, Threonin und Prolin<sup>92, 93</sup>. Diese Proteincarbonyle können nach Levine et al 1990 zur Bestimmung des Grades der oxidativen Belastung einer Zelle herangezogen werden<sup>94</sup>. Der Grad dieser Schädigung beruht auf zahlreichen Faktoren wie z. B. Art und Wirkungsort der oxidativen Schädigung<sup>95</sup>.

### 1.4.3 Lipidperoxidation

Als ein weiterer aussagekräftiger Indikator für die Folgen des oxidativen Stresses auf eine Zelle gilt die Lipidperoxidation<sup>96</sup>. Vor allem vielfach ungesättigte Fettsäuren werden oxidiert. Deren besonders langlebige aldehydische Lipidperoxidationsprodukte (z. Bsp. Malondialdehyd) können durch Diffusion mit Substraten reagieren, die von ihrem Entstehungsort entfernt liegen und in Zellen unter anderem Makrophagen und Enzyme inhibieren.

### 1.4.4 Antioxidative Schutzsysteme

Antioxidative Systeme haben die Aufgabe, die physiologische Konzentration an ROS aufrecht zu erhalten und den Organismus vor schädigenden Einflüssen durch oxidativen Stress zu schützen. Dabei stehen dem Körper eine Reihe von Substanzen zur Verfügung, die über ein komplexes Netzwerk auf die Zelle wirken. Zum einen besteht hierfür die Möglichkeit, über Betacarotin, Vitamine wie Vitamin C und E, Spurenelemente und Proteine, die Bildung von ROS zu verlangsamen, zum anderen haben proteolytische Enzyme die Aufgabe, oxidativ geschädigte Proteine vermehrt abzubauen<sup>97</sup>.

Generell werden endogene und über die Nahrung aufzunehmende Schutzsysteme unterschieden. Endogen stehen eine Vielzahl von Substanzen wie unter anderem

das GSH-Redoxsystem, Harnsäure, Bilirubin oder Liponsäure zur Verfügung. Eine zentrale Rolle kommt hierbei dem GSH-Redoxsystem zu. Es ist in der Lage, Elektronen direkt auf ROS zu übertragen und diese somit zu inaktivieren. Außerdem kann es andere wichtige Antioxidantien, wie zum Beispiel Vitamin E und Vitamin C, reduzieren und so regenerieren. Das Redoxpotential von GSH beträgt  $-240$  mV. Die Reduktion von Wasserstoff durch die Glutathionperoxidasen, als deren Substrat GSH dient, schützen zelluläre Proteine und Membranlipide vor Oxidation<sup>98</sup>. Über die Nahrung werden Antioxidantien wie z. B. Vitamin C oder Vitamin E exogen zugeführt. Im Folgenden werden die antioxidativen Substanzen besprochen, die im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurden.

#### 1.4.4.1 Liponsäure

Liponsäure erfüllt im Organismus eine Vielzahl von Funktionen. Neben Aufgaben als Co-Faktor bei Dekarboxylierungsreaktionen besitzt sie eine Reihe direkter und indirekter antioxidativer Wirkungen. Liponsäure kann direkt mit verschiedenen ROS reagieren und diese damit inaktivieren. Zusätzlich bildet Liponsäure zusammen mit seiner reduzierten Form, der Dihydroliponsäure, ein äußerst effektives Redoxsystem, welches in der Lage ist, andere Antioxidantien wie GSH, Vitamin E oder Vitamin C zu regenerieren<sup>99, 100</sup>. Liponsäure ist in der Lage die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden und kann sich so im Gehirn anreichern und neuronale Strukturen vor oxidativen Schädigungen schützen. Liponsäure wurde in mehreren Studien erfolgreich zur Reduktion oxidativer Schädigungen eingesetzt<sup>101, 102</sup>. Podda M. et al. haben gezeigt, dass Liponsäure die nach Einwirkung von UV-Strahlung auftretenden Hautschäden vermindern kann<sup>103</sup>.

#### 1.4.4.2 Vitamin C

Vitamin C (Ascorbinsäure) ist ein klassisches, wasserlösliches Antioxidans. Es kann vom menschlichen Organismus nicht *de novo* synthetisiert werden und muss über die Nahrung aufgenommen werden. Reich an Vitamin C sind beispielsweise Zitrusfrüchte, Kartoffeln oder Paprika. Vitamin C erfüllt vielfältige Aufgaben im Organismus. So dient es unter anderem als Redoxmittel bei einer Vielzahl



chemischer Reaktionen. Durch zweimalige Elektronenübertragung entsteht aus Ascorbinsäure über die Zwischenstufe des Ascorbylradikals die Dehydroascorbinsäure. Durch dieses Redoxsystem kann Vitamin C die Oxidation anderer Substanzen und Vitamine verhindern. Es ist in der Lage, äußerst effektiv mit anderen Antioxidantien wie GSH und Vitamin E zu interagieren und somit zelluläre Strukturen vor oxidativem Stress zu schützen. Von besonderer Bedeutung ist die antioxidative Wirkung von Vitamin C und Vitamin E bei der Eliminierung von Produkten der Lipidperoxidation, die bei der Oxidation von Fettsäuren entstehen.

In klinischen Studien konnte gezeigt werden, dass unter Zugabe von Vitamin C die hepatotoxischen Effekte von Ethanol vermindert werden <sup>104</sup>. Carvalho et al. haben in experimentellen Untersuchungen die Wirksamkeit von Vitamin C bei amphetaminvermittelten Leberschädigungen gezeigt <sup>105</sup>.

#### 1.4.4.3 N-Acetylcystein

N-Acetylcystein (N-Ac) wird klinisch routinemäßig zur Behandlung der Paracetamol-Intoxikation und zur Prävention von Nierenschäden durch die Gabe von Kontrastmittel eingesetzt. Der exakte Wirkmechanismus von N-Acetylcystein bei diesen Anwendungen ist gegenwärtig Gegenstand der Forschung. In den letzten Jahren ist die antioxidative Wirkung von N-Acetylcystein vermehrt in den Vordergrund gerückt. Diese wird über verschiedene Eigenschaften des N-Acetylcystein vermittelt. Es ist in der Lage, direkt mit reaktiven Sauerstoffspezies zu interagieren oder über Modulation der Glutathionsynthese antioxidativ zu wirken. N-Acetylcystein ist ein Derivat der Aminosäure Cystein, welche für die Synthese von GSH erforderlich ist und kann die Glutathionsynthese auch direkt stimulieren. Außerdem verfügen einige Metabolite des N-Acetylcystein über Sulfhydrylgruppen, welche eigene antioxidative Eigenschaften aufweisen. Die antioxidative Wirkung von N-Acetylcystein, unter anderem zur Verhinderung amphetaminvermittelter Leberschädigungen, wurde in verschiedenen Studien nachgewiesen <sup>105 - 107</sup>.

### 1.4.5 Neuronale Schädigung

In den letzten Jahren ist die Bestimmung des Ausmaßes an oxidativem Stress als Pathomechanismus in der Neurologie intensiver untersucht worden. Oxidativen Schädigungen wird eine bedeutende Rolle bei einer Vielzahl von Erkrankungen des zentralen Nervensystems zugesprochen. Hierzu zählen in erster Linie neuronale Prozesse wie beispielsweise bei Morbus Alzheimer, Multipler Sklerose, Morbus Parkinson und beim Apoplex. Hierbei ist ein Zusammenhang zwischen der neuronalen Schädigung und oxidativem Stress deutlich geworden. Eine Reihe neurodegenerativer und neuroinflammatorischer Erkrankungen ist mit der Akkumulation von Proteinoxidationsprodukten verbunden<sup>108, 109</sup>. In der Pathogenese demyelinisierender Erkrankungen wie beispielsweise der Multiplen Sklerose spielt die immunologische Reaktion auf oxidativ veränderte Proteine eine wichtige Rolle<sup>110</sup>. Außerdem kann Malondialdehyd als Produkt der Lipidperoxidation bei vielen neurologischen Erkrankungen in erhöhten Konzentrationen nachgewiesen werden. Ursächlich für die besondere Anfälligkeit des ZNS für oxidativen Stress scheint die besondere Lipidbeschaffenheit neuronaler Gewebe zu sein. Sie sind reich an mehrfach ungesättigten Fettsäuren, die besonders empfindlich auf oxidativen Stress reagieren<sup>109</sup>. Durch den hohen Sauerstoffumsatz im ZNS wird die Entstehung von ROS hier noch begünstigt<sup>91</sup>. Des Weiteren stehen im ZNS aufgrund der Blut-Hirn-Schranke nur in begrenztem Umfang antioxidative Schutzmechanismen zur Verfügung<sup>111, 112</sup>. Hierzu zählen sowohl endogene Enzyme wie die Glutathionperoxidase oder Liponsäure als auch über die Nahrung zugeführte Vitamine wie Vitamin E.

## 1.5 Fragestellung

In dieser Arbeit sollte die unmittelbaren Auswirkungen einer Belastung mit den psychotropen Substanzen Ethanol und halluzinogenen Amphetaminen auf Nervenzellen des ZNS untersucht werden. Neben Ethanol werden MDMA, MDA und MDE untersucht. Bei letzteren handelt es sich um Inhaltsstoffe der weit verbreiteten „Partydroge“ Ecstasy. Der Schwerpunkt meiner Arbeit soll hierbei auf den Nachweis von oxidativem Stress liegen, da oxidativem Stress eine zentrale Rolle als Schädigungsmechanismus von Ethanol und Amphetaminen zugeschrieben wird.

Das ZNS reagiert sehr empfindlich auf oxidativen Stress. Die geplanten Experimente werden *in vitro* an der neuronalen Zelllinie HT22 durchgeführt. Hierbei handelt es sich um immortalisierte Zellen aus dem Hippokampus der Maus. Diese Region reagiert besonders empfindlich auf toxische Effekte von Ethanol und Amphetaminen  
18, 113

Im Weiteren wird untersucht, inwieweit durch Zufuhr von Antioxidantien das Missverhältnis von pro- und antioxidativen Substanzen verbessert werden und somit eine Schädigung auf zellulärer Ebene durch Belastung mit Alkohol oder Amphetaminderivaten reduziert werden kann. Es werden sowohl Vitamine wie Vitamin C, als auch Liponsäure und N-Acetylcystein eingesetzt.

In einer Fortführung der Experimente wird die Problematik des Mischkonsums von Ethanol und halluzinogenen Amphetaminen beleuchtet. Werden toxische Effekte durch Kombination der Substanzen verstärkt? Die kombinierte Belastung von HT22 Zellen durch Ethanol und Amphetaminderivaten *in vitro* dient hierbei als Modell des Mischkonsums. Auch hier wird anschließend die potentiell protektive Wirkung einzelner antioxidativer Substanzen geprüft.

Somit lauten die zentralen Fragen, die durch diese Arbeit beantwortet werden sollen:

Ethanol

1. Wie ist die Dosis-Wirkung-Beziehung von Ethanol bezüglich der Zytotoxizität in HT22 Zellen?
2. Kommt es durch Belastung mit Ethanol zur vermehrten Bildung zellulärer Oxidationsprodukte in HT22 Zellen?

3. Kann der durch Ethanol hervorgerufene oxidative Stress durch Zugabe antioxidativer Substanzen positiv beeinflusst werden?

#### Halluzinogene Amphetaminderivate

1. Haben die halluzinogenen Amphetaminderivate MDMA, MDA und MDE toxische Wirkungen auf HT22 Zellen?
2. Kommt es hier zur vermehrten Bildung zellulärer Oxidationsprodukte in HT22 Zellen?
3. Kann der oxidative Stress bei Belastung mit MDMA, MDA bzw. MDE durch Zugabe von Antioxidantien vermindert werden?

#### Kombinationsbelastung

1. Wird die Wirkung von Ethanol und Amphetaminderivaten bezüglich Toxizität bei einer Kombinationsbelastung verstärkt?
2. Kann der Zusatz von Antioxidantien den Vitalitätsverlust reduzieren?

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte

Fluoreszenzdetektor RF-530	Shimadzu Europa GmbH, Duisburg
HPLC Pumpe 510	Waters GmbH, Eschborn
HPLC System Alliance-HPLC®	Waters GmbH, Eschborn
Inkubator HERAcell®	Thermo Scientific, Waltham, USA
Integrator C-R6A	Shimadzu Europa GmbH, Duisburg
Kühlzentrifuge Allegra®	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
Kreisschüttler Titramax	Heidolph Instruments GmbH, Schwabach
Mikroskop Leica DM IL	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
Mikrowaage MC 210S	Sartorius AG, Göttingen
Neubauer-Zählkammer	Fein-Optik, Bad Blankenburg
pH-Meter	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
Pipettierhilfe	Invitrogen Corp., Carlsbad, USA
Plate Reader iEMS MF	Labsystems, Helsinki, Finnland
Präzisionswaage BL1500S	Sartorius AG, Göttingen
Rotor F2404H (f. Kühlzentrifuge)	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
Rotor H400 (f. Zellkulturzentrifuge)	Kendro, Hanau
UV-Spektrophotometer UV-160A	Shimadzu Europa GmbH, Duisburg
Vortexer REAX top	Heidolph Instruments GmbH, Schwabach
Werkbank HERAsafe	Thermo Scientific, Waltham, USA
Zellkulturzentrifuge Sorvall® TC6	Kendro, Hanau
Zentrifuge CS15-R	Beckman Coulter GmbH, Krefeld

### 2.1.2 Verbrauchsmaterial

Cryo-Röhrchen	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Deckgläser	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Falcon™ Conical Tubes	Becton Dickinson, San Jose, USA
HPLC Säule Supelcosil LC 18	Sigma-Aldrich, München
Nunc Multischale (6 Wells)	Thermo Fisher Scientific, Rochester, USA
Nunc Multischale (24 Wells)	Thermo Fisher Scientific, Rochester, USA
Nunc 96 MicroWell™ Platte	Thermo Fisher Scientific, Rochester, USA
Nunc Serologische Pipetten	Thermo Fisher Scientific, Rochester, USA
Nunc Zellkulturflasche EasyFlasks™	Thermo Fisher Scientific, Rochester, USA
Reaktionsgefäß (Eppendorfggefäß)	Eppendorf AG, Hamburg
UV-Küvetten	Hellma GmbH, Müllheim
Zellschaber	Merck KGaA, Darmstadt

### 2.1.3 Zelllinie

Für die im folgenden beschriebenen Versuche wurden Zellen der Zelllinie HT22 verwendet. Bei der HT22 Zelle handelt es sich um einen Subklon der HT4 Zellen<sup>114</sup>. Sie wurden aus dem Hippokampus der Maus isoliert und mittels SV-40 T-Antigen immortalisiert<sup>115</sup>. HT22 Zellen sind gut charakterisiert und gelten als Modell für humane Nervenzellen des ZNS. Sie werden unter anderem bei der Untersuchung von molekularen Mechanismen von oxidativem Stress verwendet<sup>116-119</sup>. Die Zellen weisen keine inotropen Glutamatrezeptoren auf und wurden aufgrund ihrer Glutamatsensitivität selektioniert<sup>120</sup>. Die verwendeten Zellen wurden uns freundlicherweise vom Labor Prof. Dr. O. Ullrich, Institut für Anatomie der Charité, zur Verfügung gestellt.

### 2.1.4 Alkohol

Ethanol (96%)

J. T. Baker, Deventer, Niederlande

Bei den für die Belastungsuntersuchungen verwendeten Alkohol handelte es sich um Ethanol. Es liegt als Flüssigkeit vor und kann mit Wasser oder Zellkulturmedium in die gewünschte Konzentration verdünnt werden.

### 2.1.5 Amphetamine

3,4-MDA

Sigma-Aldrich, München

3,4-MDMA

Sigma-Aldrich, München

3,4-MDE

Sigma-Aldrich, München

Bei den für die Belastungsuntersuchungen verwendeten Amphetaminen handelte es sich um 3,4-MDMA, 3,4-MDA und 3,4-MDE.

MDMA, MDA und MDE liegen als weiße kristalline Pulver vor und sind gut in Wasser löslich <sup>121</sup>. Sie wurden gemäß der gesetzlichen Vorschriften des deutschen Betäubungsmittelgesetzes verwendet bzw. gelagert (§ 18 BTMG). Die Stoffe wurden über den Zulassungsinhaber PD Dr. Matthias Pirlich unter der BTM-Nr. 4460796 bezogen.

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Versuchsablauf

Alle Versuche dieser Arbeit wurden an HT22 Zellen durchgeführt. Hierfür wurden die HT22 Zellen zunächst in geeigneten Zellkulturgefäßen ausgesät und zu einem prä-konfluenten Zellrasen kultiviert. Um die toxische Wirkung der eingesetzten Substanzen auf die HT22 Zellen zu untersuchen, wurden die Zellen über einen definierten Zeitraum mit der jeweiligen Substanz belastet. Hierbei wurde zunächst Ethanol in steigender Konzentration untersucht. Um oxidativen Stress als ursächlichen Schädigungsmechanismus zu identifizieren und um eine mögliche Protektion der Zellen durch antioxidative Substanzen zu prüfen, wurden bei der Belastung mit Ethanol verschiedene Antioxidantien zugesetzt. Zunächst wurden die HT22 Zellen auch isoliert mit der jeweiligen Substanz inkubiert, um eine toxische Wirkung der verwendeten antioxidativen Substanzen zu untersuchen.

In einem zweiten Teil dieser Arbeit wurde die Wirkung der Amphetaminderivate MDMA, MDA und MDE auf HT22 Zellen untersucht. Auch hierbei wurden antioxidative Substanzen zugesetzt, um eine potentiell protektive Wirkung zu prüfen. Im dritten Teil dieser Arbeit wurde eine Kombinationsbelastung der HT22 Zellen mit Ethanol und MDMA untersucht und wiederum der Effekt antioxidativer Substanzen geprüft.

Nach Abschluss der jeweiligen Belastungsphase erfolgte die Vitalitätsmessung mittels der Trypanblaumethode, die einen direkten Nachweis vitaler und avitaler Zellen ermöglicht. Im Anschluss wurden Messungen durchgeführt, die Aussagen bezüglich des oxidativen Status einer Zelle zulassen und so den auf die Zelle einwirkenden oxidativen Stress charakterisieren. So wurde zum einen die Konzentration der Carbonylgruppen in zellulären Proteinen bestimmt. Diese entstehen durch Oxidation zellulärer Proteine in Anwesenheit von ROS. In weiteren Experimenten wurde die Konzentration von Malondialdehyd gemessen, das bei der Lipidperoxidation entsteht und damit ebenfalls ein Indikator für die oxidative Belastung der Zellen darstellt.



## 2.2.2 Zellkultur

### Reagenzien

Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM)	Gibco®, Invitrogen Corp., Carlsbad, USA
Fötales Bovines Serum (FBS)	Biochrom AG, Berlin
Penicillin/Streptomycin	Sigma-Aldrich, München
Glutamin	Gibco®, Invitrogen Corp., Carlsbad, USA
Glukose	Sigma-Aldrich, München
Phosphate Buffered Saline (PBS)	Biochrom AG, Berlin
Trypsin	Sigma-Aldrich, München

Alle Arbeitsgänge in Verbindung mit der Zellkultur wurden unter sterilen Bedingungen in einer Sicherheitswerkbank durchgeführt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in einem Begasungsbrutschrank wasserdampfgesättigt bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>.

Zur Aufzucht der Zellen wurden T75 – Zellkulturflaschen verwendet. Das Zellkulturmedium bestand aus DMEM mit 10% FBS (hitzeinaktiviert), 1% Penicillin/Streptomycin, 1% 0,2 M Glutamin und 0,35 % Glukose.

Das Kulturmedium wurde alle zwei Tage gewechselt. Hierfür wurde das Medium abgesaugt, die Zellkulturflasche mit 10 ml PBS gespült und anschließend wieder mit 20 ml Kulturmedium aufgefüllt.

Nach etwa 4 Tagen erfolgte bei präkonfluentem Zellrasen die Umsiedelung. Hierfür wurde das Kulturmedium abgesaugt, die Zellen mit 10 ml PBS gespült und anschließend für 2 Minuten mit 1 ml Trypsin bei 37°C inkubiert. Die vollständige Lösung der Zellen vom Boden der Zellkulturflasche wurde unter dem Mikroskop überprüft. Anschließend wurde das Trypsin mit Hilfe von 9 ml Kulturmedium inaktiviert. Die gelösten Zellen wurden im Kulturmedium als Einzelzellsuspension aufgenommen. Die Konzentration der Zellen in der Suspension wurde mittels Zählung in der Neubauer-Zählkammer bestimmt. Bei präkonfluentem Zellrasen enthielt eine T75 – Zellkulturflasche etwa  $4 \times 10^6$  HT22 Zellen, dies entspricht etwa  $5,3 \times 10^4$  Zellen/cm<sup>2</sup>. In die T75 – Zellkulturflaschen wurden  $4 \times 10^5$  Zellen ausgesät und mit insgesamt 20 ml Kulturmedium aufgefüllt.

### 2.2.2.1 Kryokonservierung von Zellen

#### Reagenzien

Dimethyl-Sulfon-Oxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, München
Fötales Bovines Serum (FBS)	Biochrom AG, Berlin
Glycerol	Sigma-Aldrich, München

Zur Konservierung wurden HT22 Zellen niedriger Passagen eingefroren und in flüssigem Stickstoff (-196 °C) aufbewahrt. Hierzu wurden die Zellen wie beschrieben vom Boden der Zellkulturflaschen abgelöst (siehe Kap. 2.2.1) und jeweils  $5 \times 10^7$  Zellen zu einem kompakten Pellet abzentrifugiert (8 Minuten, 1000 U/min). Nach einem Waschschrift mit PBS und erneuter Zentrifugation wurden die Zellen in 1,5 ml Gefriermedium resuspendiert und in Cryo-Röhrchen überführt. Das Gefriermedium bestand zu 1/3 aus Kulturmedium und zu 2/3 aus einer Stocklösung aus 60 % FBS, 20 % Glycerol und 20 % DMSO. Die Aliquots wurden für 24 Stunden bei -80°C gelagert und anschließend in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

Zum Auftauen der Zellen wurden die Aliquots in Falcon™ Tubes überführt, tropfenweise mit etwa 10 ml kaltem Kulturmedium versetzt und anschließend in T75 – Zellkulturflaschen ausgesät. Nach 12 Stunden wurde das Medium gewechselt, um Rückstände des DMSO zu entfernen.

### 2.2.2.2 Mykoplasmentest

#### Reagenzien

Diamidino-Phenylindol (DAPI)	Invitrogen Corp., Carlsbad, USA
Methanol (min. 99,8%)	J. T. Baker, Deventer, Niederlande

Um eine Kontamination der Zellen während der Zellkultur auszuschließen, wurde in regelmäßigen Abständen eine Testung auf Mycoplasmen durchgeführt<sup>122</sup>. Hierfür wurden Zellen in einer sterilen Petrischale auf Deckgläsern ausgesät. Nach 24 Stunden wurde das Kulturmedium abgesaugt, die Zellen zweimal mit PBS

gewaschen und anschließend für 15 Minuten im Brutschrank mit einer Lösung aus DAPI (2 %) und Methanol (98%) inkubiert. Danach wurde die Lösung entfernt und die Zellen mit Methanol fixiert. Anschließend erfolgte die Untersuchung der Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop. Bei Nachweis von Mycoplasmen wurden die Zellen der kontaminierten Passage verworfen.

### 2.2.3 Belastung der Zellen

#### Reagenzien

3,4-MDMA	Sigma-Aldrich, München
3,4-MDA	Sigma-Aldrich, München
3,4-MDE	Sigma-Aldrich, München
Ethanol (96%)	J. T. Baker, Deventer, Niederlande
Aqua bidest.	Fresenius Kabi GmbH, Bad Homburg

#### 2.2.3.1 Einfachbelastungen

Für die Belastungstests wurden HT22 Zellen in verschiedene Zellkulturgefäße ausgesät. In Abhängigkeit vom geplanten Testverfahren wurden 24-Well-Multischalen (Vitalitätsmessung), T-75 Zellkulturflaschen (Proteincarbonylbestimmung) und 6-Well-Multischalen (Malondialdehydbestimmung) verwendet. Die besiedelten Kulturgefäße wurden vor Belastung für 24 Stunden im Inkubator inkubiert. Anschließend erfolgte die Belastung nach jeweiligem Belastungsschema. Hierfür wurde das Kulturmedium durch das Belastungsmedium ersetzt.

Die in Pulverform vorliegenden Amphetamine MDMA, MDA und MDE wurden nach dem Protokoll von Clauwaert et al. in Aqua bidest. gelöst und in flüssigem Stickstoff aufbewahrt <sup>121</sup>. Bei der Auswahl der untersuchten Konzentrationen orientierten wir uns an in der Literatur angegebenen Werten <sup>123</sup>. Für die Belastung der HT22 Zellen wurde Ethanol in der Konzentration von 100 mM, 200 mM, 300 mM und 400 mM untersucht. Die Belastungsuntersuchungen mit den Amphetaminen wurden mit Konzentrationen von 0,1 mM, 0,5 mM und 1 mM MDMA, MDA bzw. MDE durchgeführt. Die Belastungslösungen mit der gewünschten Konzentration von

Ethanol bzw. den Amphetaminen wurden durch Verdünnung mit Zellkulturmedium hergestellt.

Für jede untersuchte Konzentration wurden Mehrfachproben angelegt. Außerdem wurden stets Negativkontrollen mit reinem Kulturmedium ohne Amphetamine bzw. Ethanol mitgeführt.

### 2.2.3.2 Kombinationsbelastungen

Als Ergänzung zur Einfachbelastung erfolgte in einer Fortführung der Experimente eine Kombinationsbelastung von Amphetaminen und Ethanol. Hierzu wurden die Amphetamine und Ethanol zusammen in Kulturmedium auf die gewünschte Konzentration verdünnt. Die Experimente der Kombinationsbelastung wurden exemplarisch mit 0,5 mM MDMA sowie 100 mM, 200 mM, 300 mM und 400 mM Ethanol durchgeführt.

### 2.2.3.3 Antioxidantien

#### Reagenzien

Liponsäure	Sigma-Aldrich, München
Vitamin C	Merck KGaA, Darmstadt
Vitamin E	Sigma-Aldrich, München
Katalase	Sigma-Aldrich, München
N-Acetylcystein	Fluka®, Sigma-Aldrich, München
Desferal	Sigma-Aldrich, München

In weiteren Experimenten wurde die Wirkung von antioxidativen Substanzen auf HT22 Zellen unter Einfach- und Kombinationsbelastung mit Ethanol und Amphetaminen untersucht. In einer Reihe von Vorversuchen wurden mögliche toxische Wirkungen der Antioxidantien auf HT22 Zellen geprüft. Dies erfolgte mittels Vitalitätstestung nach 24-stündiger Inkubation der Zellen mit den Antioxidantien in verschiedenen Verdünnungen. Im einzelnen wurden Liponsäure (0,01 mM, 0,05 mM, 0,1 mM, 0,25 mM, 0,5 mM, 0,75 mM, 1,0 mM, 1,25 mM), Vitamin C (0,2 mM),



Die Zellzählung erfolgte in der Neubauer-Zählkammer. Es wurden jeweils 4 große Quadrate ausgezählt und der Mittelwert errechnet. Die genaue Zellzahl errechnete sich anhand folgender Formel:

Formel:

$$(1) \quad \text{Zellzahl}_{\text{gesamt}} = \text{Zellzahl}_{\text{Quadrat}} \times 10^4/\text{ml} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \text{Volumen}_{\text{Zellsuspens.}}$$

$$\text{Zellzahl}_{\text{gesamt}} = \text{Zellzahl}_{\text{Quadrat}} \times 10^4/\text{ml} \times 2 \times 0,5\text{ml}$$

Durch die Anfärbung mit Trypanblau können vitale Zellen zuverlässig von avitalen Zellen unterschieden werden und so die Vitalität der Zellprobe gemessen werden. Die Vitalität errechnet sich anhand folgender Formel:

Formel:

$$(2) \quad \text{Vitalität [\%]} = (\text{Zellzahl}_{\text{vital}}) \times (\text{Zellzahl}_{\text{avital}})^{-1} \times 100$$

### 2.2.5 Proteincarbonyle

Proteincarbonyle entstehen durch Oxidation zellulärer Proteine und sind deshalb empfindliche Parameter zur Einschätzung des oxidativen Status der Zelle<sup>125, 126</sup>. Da die absolute Menge zellulärer Proteine in Abhängigkeit von Faktoren wie beispielsweise der Zellzahl oder des Zellzyklus teilweise beträchtliche Schwankungen aufweisen können, ist der Vergleich der Proteincarbonyle einzelner Zellpopulationen nur im Verhältnis zum Gesamtprotein der Zellpopulation möglich. Zur Messung der Konzentration von Proteincarbonylen ist somit zunächst die Bestimmung der Menge Gesamtprotein notwendig. Im Anschluss lässt sich dann der Anteil der Proteincarbonyle am Gesamtprotein ermitteln.

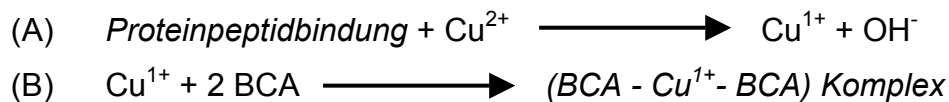
### 2.2.5.1 Messung des Gesamtproteins

#### Reagenzien

BCA Protein Assay Kit	Pierce Biotechnology, Rockford, USA
Butyl-Hydroxy-Toluol (BHT)	Sigma-Aldrich, München
Bovines Serum Albumin (BSA)	Merck KGaA, Darmstadt

Die Messung des Gesamtprotein erfolgte mittels des BCA Protein Assay Kits. Der BCA Protein Assay Kit basiert auf der Biuret-Reaktion: Peptidbindungen reduzieren im alkalischen Milieu zweiwertige Kupfer-Ionen, die in Anwesenheit der Aminosäuren Cystein, Cystin, Tryptophan und Tyrosin zu einem Tetradenat-Kupfer-Komplex reagieren. Der entstehende Tetradenat-Kupfer-Komplex bildet mit Bicinchoninsäure (BCA) einen violetten Chelatkomplex (BCA-Kupfer-Komplex), der photometrisch bei 562 nm gemessen werden kann <sup>127</sup>.

Reaktion:



Die Nachweisgrenze des BCA Protein Assay Kits liegt bei 5 µg/ml Protein. Der lineare Messbereich wird mit 25 µg/ml – 2000 µg/ml angegeben. Da die Komplexbildungsreaktion temperaturabhängig ist, kann die Sensitivität des Tests durch Inkubation im Inkubator (37°C) verstärkt werden.

Für die Messung des Gesamtproteins und der Proteincarbonyle wurden die HT22 Zellen in T-75 Zellkulturflaschen ausgesät und nach Protokoll belastet. Nach der Belastungsphase wurde das Belastungsmedium abgesaugt, die Zellen mit 10 ml PBS gewaschen, mit 1 ml Trypsin gelöst und in 9 ml Kulturmedium resuspendiert. Zur Herstellung eines kompakten Zellpellets wurden die belasteten Zellen aus der Zellsuspension bei 1100 U/min abzentrifugiert. In wiederholten Waschschrritten mit je 10 ml kaltem PBS wurden Mediumrückstände beseitigt. Während dieses Vorgangs wurde die Probe im Eisbad gekühlt.

Im Anschluss wurden die Zellen mit 150 µl 1 mM Butyl-Hydroxy-Toluol (BHT) vermengt und für eine Stunde bei 4 °C im Kreisschüttler lysiert. Die festen

Zellbestandteile wurden anschließend durch Zentrifugation entfernt (14000 U/min, 30 Minuten, 4°C). Im Überstand befand sich das Lysat für die Proteinbestimmung.

Da der Proteingehalt in den einzelnen Proben zum Teil weit über dem linearen Messbereich des BCA Protein Assay Kits lag, werden die Proben im Verhältnis 1:10 mit Aqua bidest. verdünnt. Als Kontrolle wird bei der Messung neben den Proben auch Aqua bidest als Negativkontrolle sowie eine BSA-Standardreihe mit 25 µg/ml, 125 µg/ml, 250 µg/ml, 500 µg/ml, 750 µg/ml, 1000 µg/ml, 1500 µg/ml und 2000 µg/ml BSA mitgeführt. Jede Probe wurde als Dreifachwert angesetzt.

Je 25 µl der zu untersuchenden Proben (Lysat bzw. Standard) wurden in einer 96 MicroWell™ Platte mit 200 µl der Arbeitslösung (Reagenz A und Reagenz B im Verhältnis 50 : 1) vermischt und für 30 Minuten bei 37 °C im Inkubator inkubiert. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur wurde die Extinktion im Plate Reader bei 562 nm gemessen. Die Berechnung des Proteingehaltes erfolgte mittels der Standardkurve.

Formel:

$$(3) \quad \text{Proteingehalt [mg/ml]} = \text{Extinktion}_{\text{Probe}} \times \text{Anstieg}_{\text{Standard}} \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

Das verbleibende Lysat wurde für die Messung der Proteincarbonyle verwendet. Hierfür wurden einzelnen Proben aus der Proteinbestimmung mit Aqua bidest. auf eine Proteinmenge von 1 mg/ml Gesamtprotein normiert.

#### 2.2.5.2 Messung der Proteincarbonyle (ELISA)

##### Reagenzien

Anti-DNP-Antikörper (Kaninchen)	Sigma-Aldrich, München
Anti-Kaninchen-IgG (POD – konjugiert)	Sigma-Aldrich, München
Bovines Serum Albumin (BSA)	Merck KGaA, Darmstadt
Dinatriumhydrogenphosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Merck KGaA, Darmstadt
Dinitrophenylhydrazin (DNPH)	Sigma-Aldrich, München
Guanidinhydrochlorid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Hypochlorsäure (HOCl)	Sigma-Aldrich, München
Kaliumdihydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Merck KGaA, Darmstadt



Natriumborhydrid (NaBH <sub>4</sub> )	Sigma-Aldrich, München
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma-Aldrich, München
Natriumdihydrogenphosphat (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Fluka®, Sigma-Aldrich, München
Natriumphosphat Puffer	Sigma-Aldrich, München
o-Phenylendiamin	Sigma-Aldrich, München
PBS Tablette	Invitrogen Corp., Carlsbad, USA
Salzsäure (HCl)	Sigma-Aldrich, München
Schwefelsäure (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	Merck KGaA, Darmstadt
Tween® 20	Fluka®, Sigma-Aldrich, München
Wasserstoffperoxid (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	Sigma-Aldrich, München
Zitronensäure	Sigma-Aldrich, München

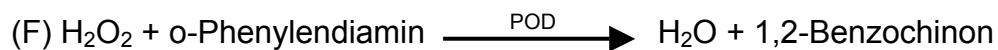
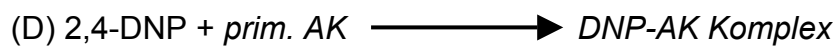
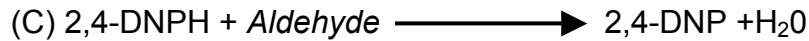
#### Stammlösungen

DNP Puffer	Guanidinhydrochlorid (6 M) Kaliumdihydrogenphosphat (0,5 M)
Bindungspuffer	Natriumphosphat Puffer (10 mM) Natriumchlorid (40 mM)
Entwicklerlösung	o-Phenylendiamin (6 mg/ml) Dinatriumhydrogenphosphat (50 mM) Zitronensäure (24 mM) Wasserstoffperoxid (0,04 %)
PBS Dialysepuffer	1 PBS Tablette 100 ml Aqua bidest.

Die Proteincarbonylbestimmung erfolgte nach einer von Buss et al. modifizierten Methode<sup>128</sup>. Hierbei werden die Proteincarbonyle über eine Farbkomplexbildung mit Dinitrophenylhydrazin (DNPH) nachgewiesen. Dabei entsteht Dinitrophenylhydrazon (DNP). Das entstehende DNP wird anschließend in einer Immunkomplexreaktion an Anti-DNP-Antikörper vom Kaninchen gebunden. Beim sekundären Antikörper handelte es sich um einen monoklonalen anti-Kaninchen-Antikörper, der mit einer Peroxidase (POD) konjugiert ist. Diese katalysiert die Reduktion von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zu H<sub>2</sub>O. Dabei dient o-Phenylendiamin als Wasserstoffdonor. Dieses wird dabei zu 1,2-

Benzochinondiimin oxidiert und zerfällt zu 1,2-Benzchinon. Über die Absorption von 1,2-Benzchinon bei 492 nm kann die Konzentration an Proteincarbonylen errechnet werden.

Reaktion:



Als Negativkontrolle diente bei der Messung der Proteincarbonyle 1 mM BHT. Zusätzlich wurde eine Standardreihe aus 1%, 3% und 5% oxidiertem BSA mitgeführt. Hierfür wurde 50 mg/ml BSA durch zweistündige Inkubation im Kreisschüttler bei Raumtemperatur in Gegenwart von 5mM Hypochorsäure oxidiert und mit PBS auf die gewünschte Konzentration verdünnt. Für die Standardreihe wurde PBS als Negativkontrolle verwendet.

Die Proben für die Messung der Proteincarbonyle (Lysat bzw. Standard) wurden mit DNPH vermengt. Hierzu wurden 15 µl der Proben mit 45 µl DNHP (in 2 mg/ml DNP Puffer) im Vortexer vermischt. Während einer 45-minütigen Inkubation im Dunkeln bei Raumtemperatur erfolgte die Bindung des DNPH an die Carbonylgruppen der Proteine unter Abspaltung von Wasser. Anschließend wurden jeweils 5 µl der Lösung mit jeweils 1 ml Bindungspuffer vermischt und in 200 µl Aliquots in eine 96 MicroWell™ Platte pipettiert. Die Platte wurde im Anschluss für 24 Stunden bei 4°C für inkubiert, wodurch ein Anhaften der DNP-markierten Proteins an den Boden der MikroWells erfolgt.

Um unspezifische Antikörperreaktionen zu verhindern, wurde nach Absaugen des Bindungspuffers ein Serumblock aus je 250 µl reduziertem BSA in die einzelnen MikroWells gegeben und für 90 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Hierfür wurde BSA durch schrittweise Zugabe von Natriumborhydrid reduziert. Durch abschließende Zugabe von konzentrierter Salzsäure wurde ein vollständiger Umsatz des Natriumborhydrid sichergestellt. Nach Inkubation über 24 Stunden bei Raumtemperatur wurde das reduzierte BSA gegen PBS Dialysepuffer dialysiert und auf einen pH von 7,4 eingestellt. Nach Messung des Proteingehaltes wurde das reduzierte BSA mit PBS auf eine Konzentration von 0,1 % verdünnt.

Nach der Serumblockade wurde die Lösung aus den MikroWells vorsichtig abgesaugt und der primäre Antikörper zugegeben. Hierbei handelt es sich um einen anti-DNP-Antikörper vom Kaninchen. Der Antikörper wurde in einer Konzentration von 1:1000 mit reduziertem BSA (0,1 %) und Tween® 20 (0,1 %) angesetzt. Die MikroWells wurden mit 200 µl Antikörperlösung gefüllt und für 1 Stunde bei 37°C inkubiert.

Im Anschluss wurden die MikroWells dreifach mit PBS gewaschen, um nicht gebundenen Antikörper zu entfernen, bevor dann jeweils 200 µl des sekundären POD-konjugierten anti-Kaninchen-IgG aufgetragen wurde. Dieser wurde in einer Konzentration von 1:10000 in reduziertem BSA (0,1 %) und Tween® 20 (0,1 %) verwendet. Nach Inkubation für 1 Stunde bei Raumtemperatur wurde die Platte wiederum dreifach mit PBS gewaschen und anschließend mit 200 µl Entwicklerlösung für etwa 20 Minuten bei 37 °C inkubiert. Trat ein Farbumschlag auf, wurde die Farbkombildung durch Zugabe von jeweils 100 µl 2,5 M Schwefelsäure gestoppt und die Extinktion bei 492 nm am Plate Reader gemessen. Zur Berechnung der Konzentration der Proteincarbonyle wurden die Extinktionswerte der Negativkontrollen von den Werten der einzelnen Proben subtrahiert und mit einem ermittelten Faktor F multipliziert.

Formel:

$$(4) \text{ Proteincarbonyle [nmol/mg Protein]} = (\text{Extinktion}_{\text{Probe}} - \text{Extinktion}_{\text{BHT}}) \times \text{Faktor F}$$

$$(5) \text{ Faktor F} = [2,006 / ((E_{1\% \text{BSA}} + E_{3\% \text{BSA}} + E_{5\% \text{BSA}}) - E_{\text{PBS}})] / \text{Proteinmenge}_{\text{Probe}}$$

## 2.2.6 Malondialdehydbestimmung

Reagenzien

Kaliumdihydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Merck KGaA, Darmstadt
Methanol (min. 99,8%)	J. T. Baker, Deventer, Niederlande
Natriumhydroxid (NaOH)	Sigma-Aldrich, München
Phosphorsäure (H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> )	Sigma-Aldrich, München
Thiobarbitursäure	Sigma-Aldrich, München
Tetraethoxypropan (Malondialdehyd-Standard)	Sigma-Aldrich, München

## Stammlösungen

HPLC Laufmittel	Phosphatpuffer pH 6,8 (60 ml) Methanol (40 ml)
Phosphatpuffer 50 mM	Kaliumdihydrogenphosphat (4,08 g) Aqua bidest (600 ml)
TBA Lösung	Thiobarbitursäure (0,6 g) Aqua bidest. (100 ml)

Thiobarbitursäurereaktive Substanzen (TBA-RS) entstehen bei der Oxidation mehrfach ungesättigter Fettsäuren, die durch freie Sauerstoffradikale in Zellen verursacht wird. Einen großen Anteil der entstehenden Substanzen stellt dabei Malondialdehyd dar <sup>129</sup>. Malondialdehyd kann damit als Maß für die oxidative Belastung einer Zelle herangezogen werden. Bei der Messung des TBA-RS handelt es sich somit um eine weitere Methode zur Einschätzung des oxidativen Status der Zelle.

Die Bestimmung der TBA-RS erfolgte nach der Methode von Wong et al. <sup>130</sup> mit Modifikationen nach Sommerburg et al. <sup>131</sup>. Die Methode basiert auf der Komplexbildung von Malondialdehyd und TBA zu einem roten Farbstoff. Die Messung der TBA-RS erfolgte mittels Fluorometrie nach chromatographischer Trennung durch HPLC. Da auch die Menge der TBA-RS im Verhältnis zur Menge Gesamtproteins angegeben wird, erfolgte analog zur Bestimmung der Proteincarbonyle zunächst die Messung des Gesamtproteins (siehe Kap. 2.2.4.1).

Reaktion:



Für die Messung der TBA-RS wurden die HT22 Zellen in 6-Well-Multischalen ausgesät und nach Protokoll belastet. Nach der Belastungsphase wurde das Belastungsmedium abgesaugt und die Zellen mit 10 ml PBS gewaschen. Im Anschluss wurden die Wells mit je 460 µl Aqua bidest. gefüllt und die Zellen mit dem

Zellschaber sorgsam vom Boden der Wells gelöst. Zur Bestimmung der Menge Gesamtprotein wurden 16 µl der so hergestellten Zellsuspension mittels des BCA Protein Assay Kits analysiert.

Als Negativkontrolle diente bei der Messung der TBA-RS Aqua bidest. Zusätzlich wurde ein TBA-RS Standard mitgeführt. Hierzu wurde Tetraethoxypropan mit Ethanol und Aqua bidest. (Verhältnis 2 : 3) auf eine Konzentrationen von 2 mg/ml verdünnt.

Die Proben für die Messung der TBA-RS (Suspension bzw. Standard) wurden mit der TBA-Lösung vermengt. Hierzu wurden 200 µl der Proben mit 250 µl TBA-Lösung, 750 µl Phosphorsäure (0,4 mM) und 300 µl Aqua bidest. im Vortexer vermischt. Das Gemisch wurde über eine Stunde im Wasserbad bei 95 °C – 100 °C erhitzt und anschließend zügig im Eisbad abgekühlt, um die Reaktion zu stoppen. Unmittelbar vor der HPLC-Analyse wurden jeweils 100 µl der Proben mit 100 µl einer Lösung aus Methanol und NaOH (Verhältnis 1 : 50) neutralisiert. Anschließend wurde die Probe zentrifugiert (4000 U/min, 10 Minuten, Raumtemperatur), um den Überstand vom Bodensatz zu trennen. Für die chromatographische Auftrennung mittels HPLC wurden Aliquots von je 50 µl der einzelnen Proben in eine Supelcosil LC 18 Säule injiziert. Die Flussrate des HPLC Laufmittels beträgt 1,0 ml/min. Die Messung der TBA-RS erfolgte bei einer Extinktionswellenlänge von 525 nm und Emissionwellenlänge von 550 nm. Zur Berechnung der Konzentration der TBA-RS wurden die Extinktionswerte der Negativkontrollen von den Werten der einzelnen Proben subtrahiert und die Menge TBA-RS mittels der Standardkurve ermittelt.

Formel:

$$(6) \text{ TBA-RS}_{\text{Probe}} [\text{pmol}/\mu\text{l}] = \text{Fläche}_{\text{Probe}} / \text{Fläche}_{\text{Standard}} / 6$$

$$(7) \text{ TBA-RS}_{\text{Probe}} [\text{pmol}/\mu\text{g Protein}] = \text{TBA-RS}_{\text{Probe}} [\text{pmol}/\mu\text{l}] / (\text{Proteinmenge}_{\text{Probe}} \times 300)$$

Ich danke hiermit herzlichst Frau Manuela Jackstadt für Ihre Hilfe und Unterstützung bei der Durchführung der Experimente.

## 2.3 Graphische Darstellung und statistische Auswertung

Die erhobenen Daten der Vitalitätstests wurden als Balkendiagramm der Mittelwerte mit jeweiliger Standardabweichung dargestellt.

Die statistische Auswertung der erhobenen Daten erfolgte mittels des Student t-Tests für stetige Zielgrößen. Die zu prüfenden Hypothesen der Untersuchungen lauteten hierbei:

1. Durch Belastung von HT22 Zellen mit Ethanol bzw. Amphetaminderivaten kommt es zu einer Reduktion der Zellvitalität der HT22 Zellen gegenüber der Kontrollgruppe.
2. Durch Belastung von HT22 Zellen mit Ethanol bzw. Amphetaminderivaten kommt es zu einer Steigerung der Proteincarbonyle und Malondialdehyde (als Ausdruck von oxidativem Stress als Ursache des zellulären Schädigungsmechanismus).
3. Durch Zusatz von Antioxidantien zur Belastung mit Ethanol bzw. Amphetaminderivaten kommt es zu einer Verbesserung der Zellvitalität und Reduktion der Proteincarbonyle und Malondialdehyde der HT22 Zellen gegenüber der HT22 Zellen unter reiner Belastung mit Ethanol bzw. Amphetaminderivaten.

Da die Daten der jeweiligen Stichproben erst durch Normierung auf den Kontrollwert von 100% verglichen werden können, wurde das Signifikanzniveau  $\alpha$  mit 1% festgelegt. Als statistisch signifikant galten Ergebnisse bei  $p < 0,01$ . Signifikante Ergebnisse wurden in den Tabellen fett gedruckt dargestellt und in den Abbildungen mit \* markiert.

Die statistische Auswertung der erhobenen Daten wurde mittels SPSS für Windows, Version 12.0.1 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) durchgeführt. Die graphische Aufarbeitung der Ergebnisse erfolgte mittels Sigma Plot für Windows, Version 9.0 (Systat Software Inc., San Jose, CA, USA).

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Ethanol

Nach Belastungen der HT22 Zellen mit Ethanol wurden Vitalitätstestungen und weiterführende Untersuchungen bezüglich der oxidativen Situation der Zellen, wie Proteincarbonyl- und Malondialdehydbestimmungen durchgeführt.

#### 3.1.1 Zytotoxische Effekte von Ethanol auf HT22 Zellen

In Abbildung 3 ist die Zellzahl der HT22 Zellen unter Belastung mit Ethanol nach 24 Stunden in Abhängigkeit von der Ethanolkonzentration dargestellt. Die Zellzahl wurde mittels eines Neubauer Haemazytometers ermittelt. Die Unterscheidung von vitalen und avitalen Zellen erfolgte mit der Trypanblauemethode. Die Daten stellen den prozentualen Anteil der Zellen bezogen auf die Gesamtzellzahl der unbelasteten Kontrolle dar. Es zeigt sich eine stetige Abnahme der Zellzahl mit steigender Ethanolkonzentration (98,4 %  $\pm$  1,0 % bei 0 mM Ethanol vs. 10,2 %  $\pm$  11,1 % bei 600 mM Ethanol). Der Anteil der vitalen Zellen an der Gesamtzellzahl, entsprechend der Vitalität der Zellen, sinkt unter steigender Ethanolkonzentration von 98,4 %  $\pm$  1,0 % bei 0 mM Ethanol auf 56,6 %  $\pm$  21,9 % unter 600 mM Ethanol. Sowohl die Veränderung der Gesamtzellzahl als auch die Abnahme der Vitalität erfolgen kontinuierlich und erreichen ein Minimum bei einer Ethanolbelastung von 600 mM. Dabei zeigt sich bereits ab einer Ethanolbelastung von 100 mM eine signifikante Abnahme der vitalen Zellen im Vergleich zur Kontrolle.

Abbildung 3

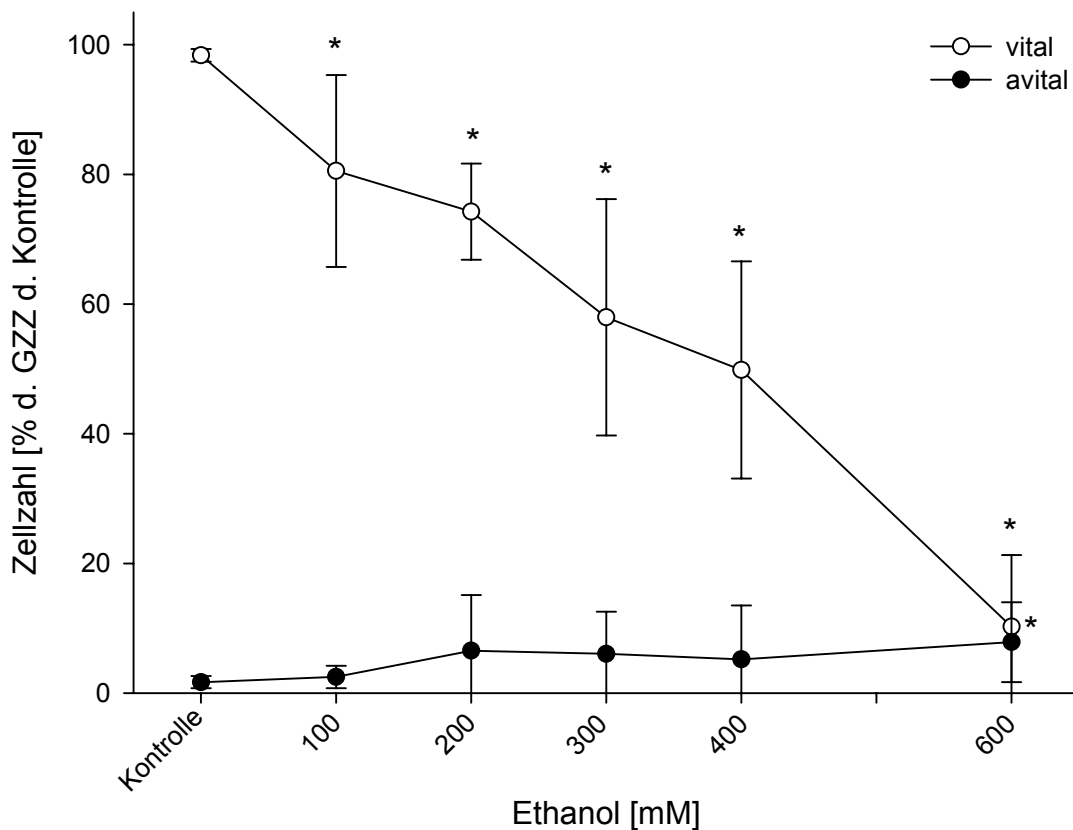


Abbildung 3: Zellvitalität bei steigender Ethanolbelastung

Die Zellvitalität wurde mit der Trypanblaumethode nach Belastung der Zellen für 24 Stunden bestimmt. Die Daten stellen den prozentualen Anteil der Zellen bezogen auf die Gesamtzellzahl der unbelasteten Kontrolle dar.

Mittelwerte mit Standardabweichung bei  $n = 36$  bzw.  $n = 18$  (\*  $p < 0,01$  im Vergleich zur Kontrolle). Proteinoxidation durch Ethanolbelastung

### 3.1.2 Proteinoxidation durch Ethanolbelastung

Abbildung 4 zeigt die Konzentration der Proteincarbonyle im Zellkulturmedium unter Ethanolbelastung. Die Daten stellen den prozentualen Wert der Proteincarbonyle bezogen auf den Wert der unbelasteten Kontrolle dar. Dargestellt sind Ergebnisse einer Belastung über die Dauer von 24 Stunden. Nach der Belastung der Zellen mit Ethanol wird ein Anstieg der Proteincarbonyle deutlich. Bei der Belastung mit 400 mM Ethanol wird dieser Anstieg signifikant ( $190,3 \% \pm 32,1 \%$  vs.  $100,0 \% \pm 43,8 \%$ ,  $p < 0,01$ ).



Abbildung 4

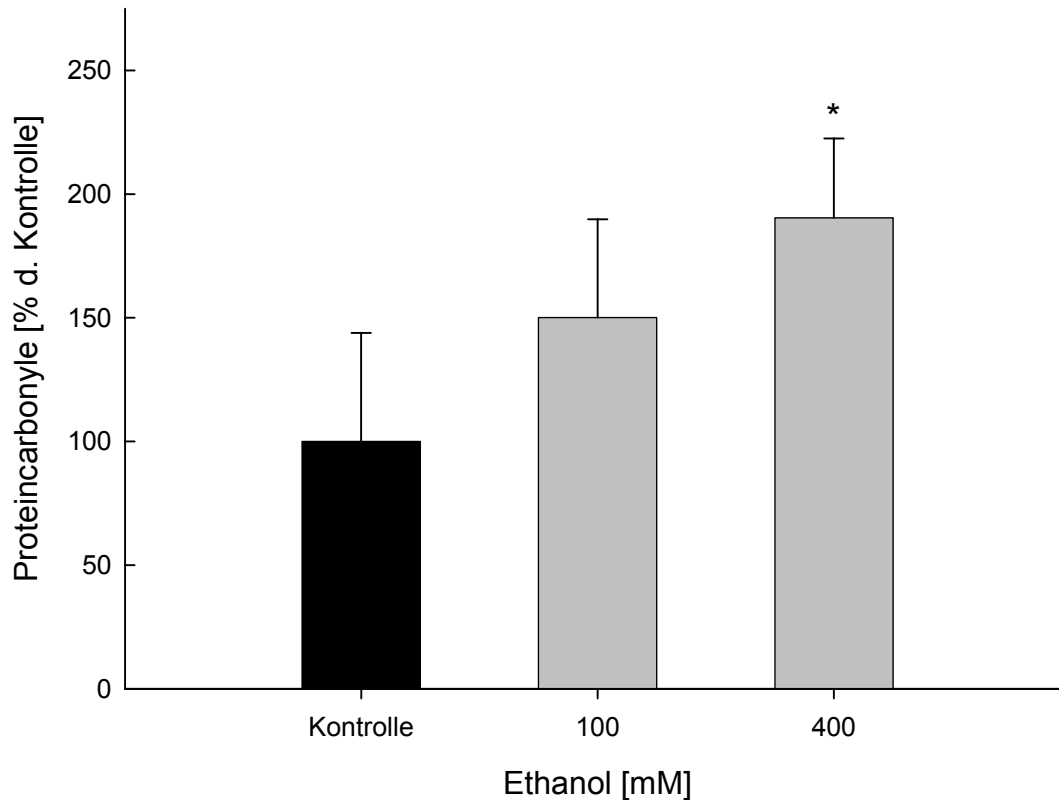


Abbildung 4: Protein carbonyle nach Ethanolbelastung

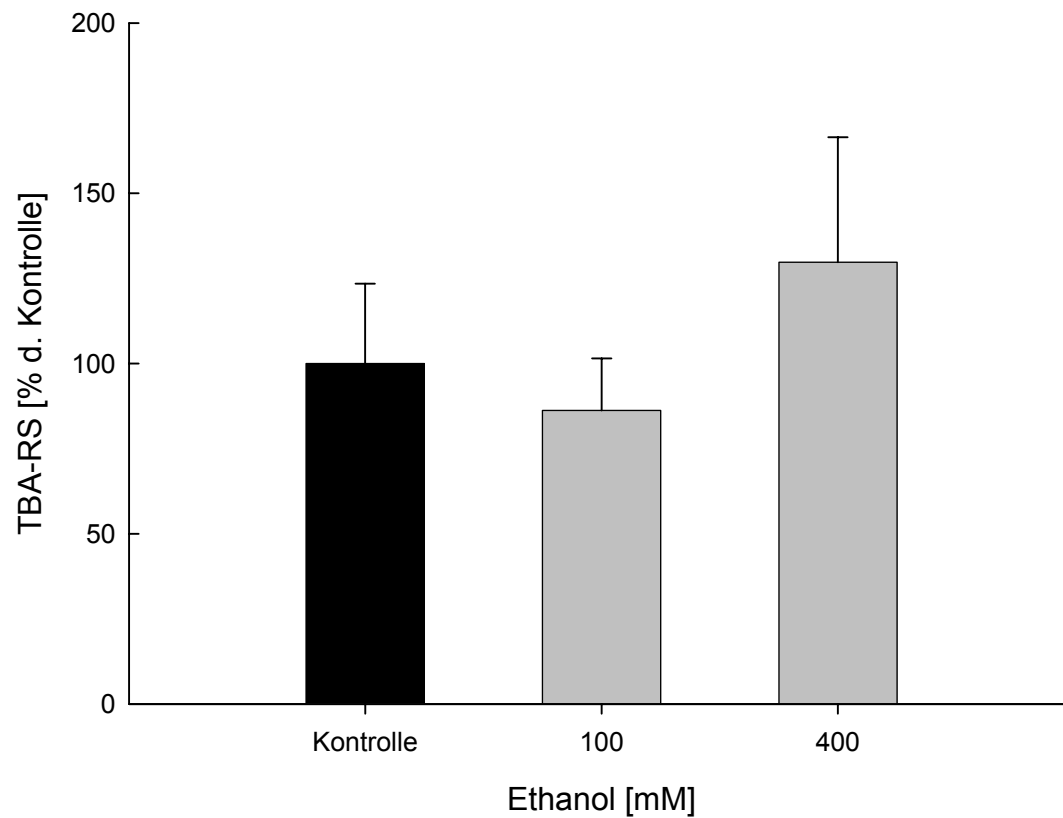
Die Protein carbonyle wurden nach Belastung der Zellen für 24 Stunden bestimmt. Die Daten stellen den prozentualen Wert der Protein carbonyle bezogen auf den Wert der unbelasteten Kontrolle dar. Mittelwerte mit Standardabweichung bei  $n = 9$  (\*  $p < 0,01$  im Vergleich zur Kontrolle).

### 3.1.3 Lipidperoxidation durch Ethanolbelastung

Unter der Ethanolbelastung kommt es zu einer Veränderung der TBA-RS-Konzentration. In Abbildung 5 ist die Veränderung der TBA-RS-Konzentration bei steigender Ethanolbelastung dargestellt. Analog zu den vorhergehenden Diagrammen stellen die Daten den prozentualen Wert der TBA-RS bezogen auf den Wert der unbelasteten Kontrolle dar. Bei einer Belastung mit 100 mM Ethanol zeigt sich ein nicht signifikanter Abfall der TBA-RS. Unter Belastung mit 400 mM Ethanol lässt sich hingegen ein Anstieg der TBA-RS auf  $129,7 \% \pm 36,8 \%$  bezogen auf die

unbelastete Kontrolle zeigen. Diese Veränderung ist deutlicher, verfehlt allerdings das geforderte Signifikanzniveau ( $p = 0,06$ ).

**Abbildung 5**



**Abbildung 5: Malondialdehyd bei steigender Ethanolbelastung**

Die Malondialdehyde wurden nach Belastung der Zellen für 24 Stunden bestimmt. Die Daten stellen den prozentualen Wert der Malondialdehyde bezogen auf den Wert der unbelasteten Kontrolle dar. Mittelwerte mit Standardabweichung bei  $n = 9$  (\*  $p < 0,01$  im Vergleich zur Kontrolle).

### 3.1.4 Ko-Inkubation mit Ethanol und Antioxidantien

Für weiterführende Experimente wurden die Versuche der Einzelbelastungen mit Ethanol durch den gleichzeitigen Einsatz von ausgewählten Antioxidantien ergänzt.

#### 3.1.4.1 Zytotoxische Effekte der Antioxidantien

Um zytotoxische Effekte der Antioxidantien selber auszuschließen, wurde in einem Trypanblauversuch untersucht, inwieweit sich die Zellvitalitäten unter Inkubation mit Antioxidantien verändern. Hierzu wurden die Konzentrationen Angaben aus der Literatur für ähnliche Versuchsreihen entsprechend ausgewählt<sup>105, 132</sup>.

In Abbildung 6 ist die Zellzahl der HT22 Zellen unter Belastung mit verschiedenen Antioxidantien nach 24 Stunden dargestellt. Die Daten stellen den prozentualen Anteil der vitalen Zellen im Vergleich zur unbelasteten Kontrolle dar. Hier zeigt sich keine Abnahme der Zellvitalität unter Inkubation mit den eingesetzten Substanzen. Es wird im Gegenteil eine – nicht signifikante - Zunahme der Zellzahl. Insbesondere beim Zusatz von Katalase (125,2 % ± 20,2 %,  $p = 0,07$ ), und Vitamin C (119,8 % ± 27,9 %,  $p = 0,17$ ) wird dieser Effekt deutlich. Einzig unter Inkubation mit Desferal 0,1 mM kommt es zu einem leichten Rückgang der Zellzahl auf 91,7 % ± 8,2 % ( $p = 0,50$ ) verglichen mit der Kontrolle. Signifikant ist dieser Unterschied allerdings ebenfalls nicht.

Abbildung 6

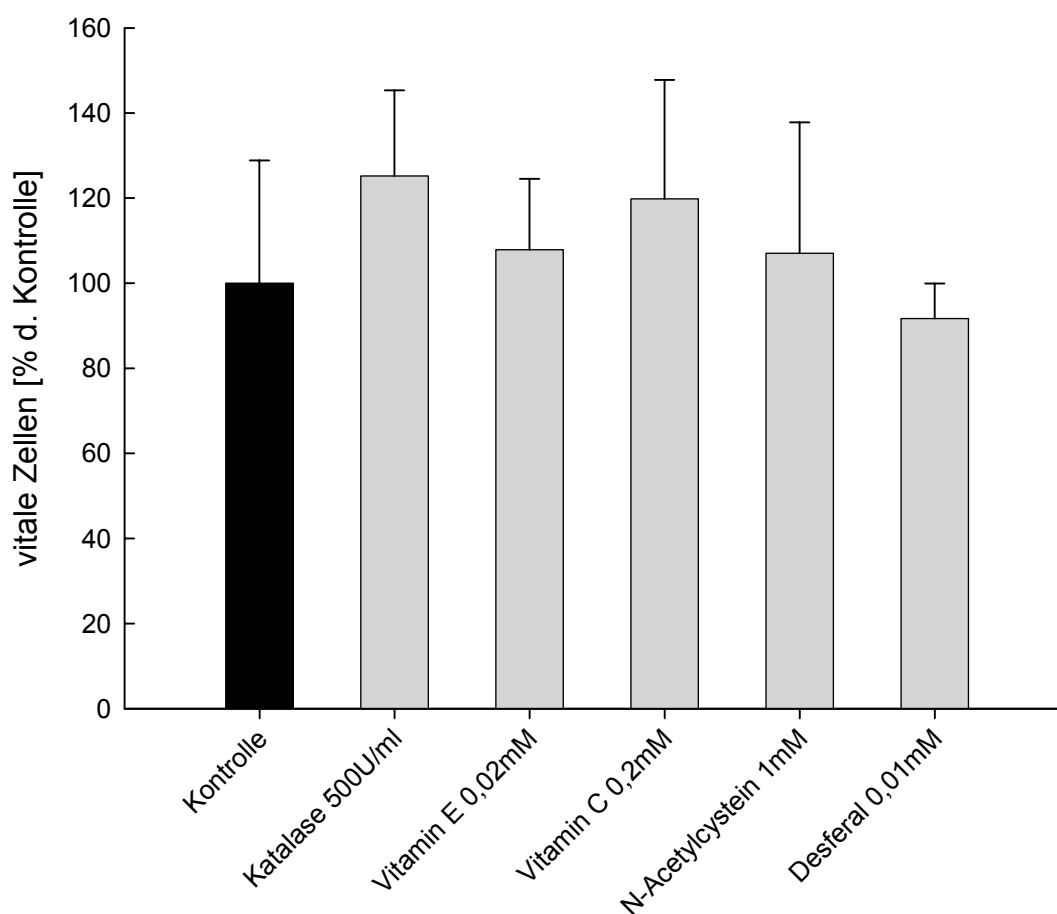


Abbildung 6: Zellvitalität unter Antioxidantien

Die Zellvitalität wurde mit der Trypanblaumethode nach Belastung der Zellen für 24 Stunden bestimmt. Die Daten stellen den prozentualen Anteil der vitalen Zellen bezogen auf die Vitalzellzahl der unbelasteten Kontrolle dar. Mittelwerte mit Standardabweichung bei  $n = 15$  bzw.  $n = 6$  (\*  $p < 0,01$  im Vergleich zur Kontrolle).

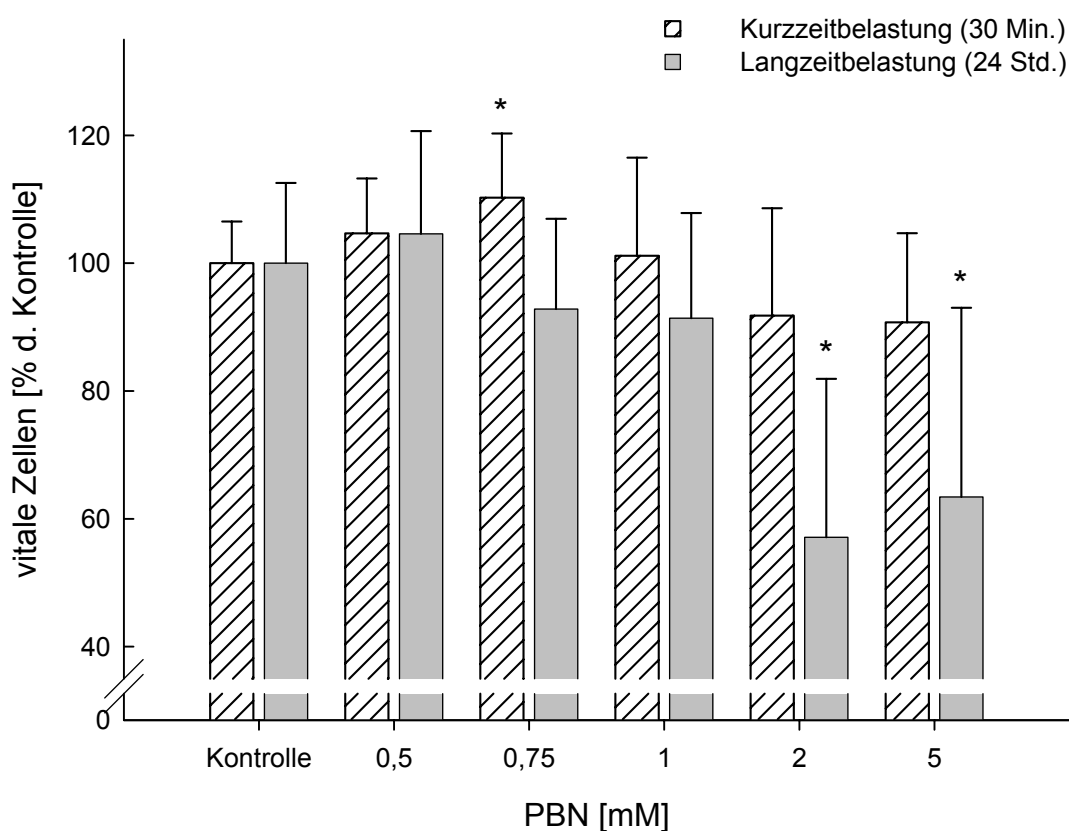
Exemplarisch wurden mit  $\alpha$ -Phenyl-N-tert.-butyl-Nitron (PBN) und Liponsäure (LS) Versuchsreihen mit steigenden Konzentrationen dieser Antioxidantien durchgeführt, um den nicht toxischen Bereich einzugrenzen. Auch hier orientierten wir uns an in der Literatur angegebenen Werten<sup>133-135</sup>.

In Abbildung 7 ist die Zellzahl der HT22 Zellen unter Belastung mit PBN nach 30 Minuten (Kurzzeitbelastung) sowie nach 24 Stunden (Langzeitbelastung) dargestellt. Die Daten stellen den prozentualen Anteil der vitalen Zellen im Vergleich zur unbelasteten Kontrolle dar. Bei der Kurzzeitbelastung kommt es bis zur Belastung mit 5 mM PBN nicht zu einem signifikanten Rückgang der Zellzahl. Eine Tendenz ist ab

einer Konzentration von 2 mM PBN zu erkennen ( $90,8 \% \pm 14,0 \%$  vs.  $100,0 \% \pm 6,5 \%$ ,  $p = 0,03$  bei 5 mM PBN).

Nach der 24-stündigen Inkubation werden geringere Zellzahlen bereits bei einer deutlich geringeren Konzentration von 0,75 mM PBN dokumentiert. Ab einer Konzentration von 2 mM PBN ist dieser Unterschied signifikant ( $57,1 \% \pm 24,8 \%$  vs.  $100,0 \%$ ,  $p < 0,01$ ).

**Abbildung 7**



**Abbildung 7: Zellvitalität unter  $\alpha$ -Phenyl-N-butyl-Nitrone**

Die Zellvitalität wurde mit der Trypanblaumethode nach Belastung der Zellen für 30 Min. bzw. 24 Std. bestimmt. Die Daten stellen den prozentualen Anteil der vitalen Zellen bezogen auf die Vitalzellzahl der unbelasteten Kontrolle dar.

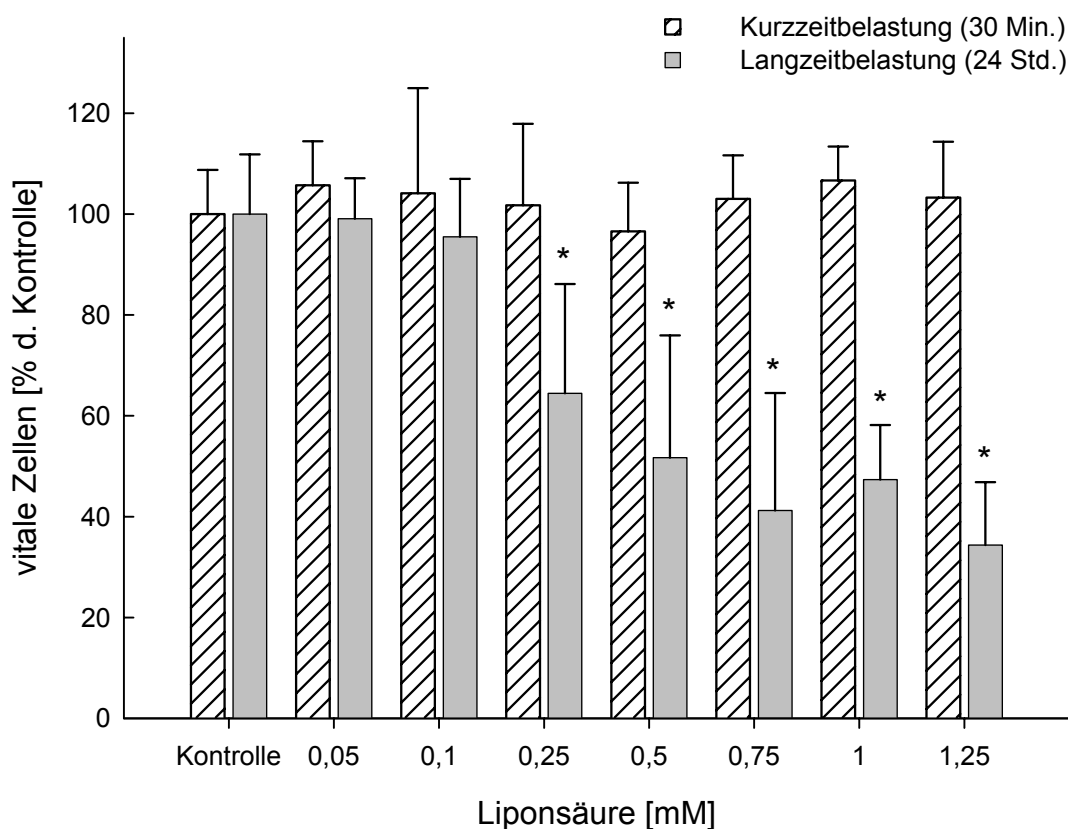
Mittelwerte mit Standardabweichung bei  $n = 15$  (\*  $p < 0,01$  im Vergleich zur Kontrolle).

Analog hierzu ist in Abbildung 8 die Zellzahl der HT22 Zellen unter Belastung mit Liponsäure nach 30 Minuten (Kurzzeitbelastung) und nach 24 Stunden (Langzeitbelastung) dargestellt. Die Daten stellen den prozentualen Anteil der vitalen Zellen im Vergleich zur unbelasteten Kontrolle dar. Die Inkubation mit Liponsäure

zeigt in der 30-minütigen Belastung keine relevante Beeinträchtigung der Zellzahl (siehe Abbildung 8). Die Unterschiede zur Kontrolle sind in der Kurzzeitbelastung mit bis zu 1,5 mM Liponsäure nicht signifikant. Darüber hinaus sinkt die Zellzahl im Vergleich zur Kontrolle signifikant ( $86,2 \% \pm 15,0 \%$  vs.  $100,0 \%$ ,  $p < 0,01$  bei 2 mM Liponsäure, *nicht abgebildet*).

Werden die Zellen über 24 Stunden mit Liponsäure inkubiert, kommt es zu einem Abfall der Zellzahl. Ab 0,1 mM Liponsäure sinkt die Zellzahl im Vergleich zur Kontrolle fast stetig mit zunehmender Konzentration der Liponsäure. Ab einer Konzentration von 0,25 mM Liponsäure werden die Unterschiede zur Kontrolle statistisch signifikant ( $64,5 \% \pm 21,7 \%$  vs.  $100,0 \%$ ,  $p < 0,01$ ).

**Abbildung 8**



**Abbildung 8: Zellvitalität unter Liponsäure**

Die Zellvitalität wurde mit der Trypanblaumethode nach Belastung der Zellen für 30 Min. bzw. 24 Std. bestimmt. Die Daten stellen den prozentualen Anteil der vitalen Zellen bezogen auf die Vitalzellzahl der unbelasteten Kontrolle dar.

Mittelwerte mit Standardabweichung bei  $n = 15$  (\*  $p < 0,01$  im Vergleich zur Kontrolle).

Ausgehend von den Ergebnissen der beschriebenen Versuche wurden für die folgenden Experimente die Antioxidantien Katalase, Vitamin E, Vitamin C und N-Acetylcystein in den angegebenen Konzentrationen verwendet. PBN wurde in einer Konzentration von 1 mM, Liponsäure in Konzentrationen von 0,01 mM bis 0,1 mM eingesetzt.

### 3.1.4.2 Effekte von Antioxidantien auf Zytotoxizität und oxidativen Stress durch Ethanol

Die folgenden Experimente wurden unter Ko-Inkubation von Ethanol und Antioxidantien durchgeführt. Hierzu erfolgte die zeitgleiche Hinzugabe von Ethanol und dem entsprechenden Antioxidans in das Kulturmedium.

#### 3.1.4.2.1 Zytotoxizität durch Ethanol und Protektion durch Antioxidantien

In Abbildung 9 ist die Zellzahl der HT22 Zellen unter Belastung mit Ethanol 400 mM und unter Zusatz von Liponsäure in unterschiedlicher Konzentration nach 24 Stunden dargestellt. Die Daten stellen den prozentualen Anteil der vitalen Zellen im Vergleich zur unbelasteten Kontrolle dar. Unter Belastung mit Ethanol kommt es, wie bereits in Abbildung 3 dargestellt, zu einem signifikanten Rückgang der Zellzahl in Vergleich zur Kontrolle (56,9 %  $\pm$  14,5 % vs. 100,0 %,  $p < 0,01$ ). Unter Ko-Inkubation von Ethanol und Liponsäure ist dieser Abfall der Zellzahl weniger ausgeprägt als unter isolierter Belastung mit Ethanol. Dabei ist dieser Effekt bei einer Konzentration von 10  $\mu$ M Liponsäure am deutlichsten. Hier kommt es zu einem nur minimalen Rückgang der Zellzahl verglichen mit der Kontrolle (98,4 %  $\pm$  17,8 % vs. 100,0 %,  $p = 0,54$ ). Vergleicht man hingegen die Zellzahl nach isolierter Belastung mit Ethanol mit der Zellzahl nach Ko-Inkubation mit Ethanol und 10 $\mu$ M Liponsäure wird ein signifikant geringerer Abfall der Zellzahl deutlich (56,9 %  $\pm$  14,5 % vs. 98,4 %  $\pm$  17,8 % ,  $p < 0,01$ ). Bei steigender Konzentration der Liponsäure in der Kombinationsbelastung nimmt dieser Effekt wieder ab und die Zellzahl erreicht bei 100 mM Liponsäure nahezu das Niveau der isolierten Belastung mit Ethanol.

Abbildung 9

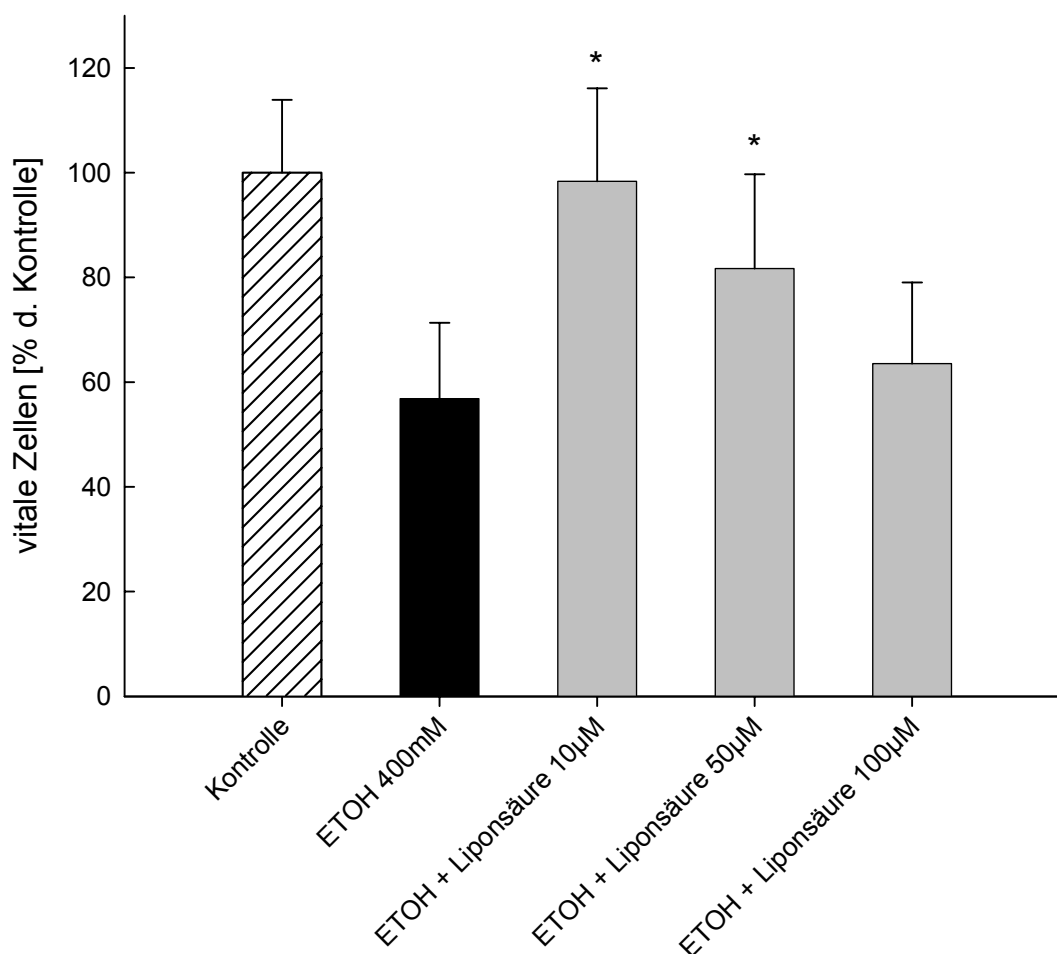


Abbildung 9: Zellvitalität unter Ethanol und Liponsäure

Die Zellvitalität wurde mit der Trypanblaumethode nach Belastung der Zellen für 24 Stunden bestimmt. Die Daten stellen den prozentualen Anteil der vitalen Zellen bezogen auf die Vitalzellzahl der unbelasteten Kontrolle dar. Mittelwerte mit Standardabweichung bei  $n = 24$  (\*  $p < 0,01$  im Vergleich zu Ethanol 400 mM).

In Abbildung 10 wird der Effekt einer Ko-Inkubation mit Ethanol und verschiedenen Antioxidantien auf die Zellzahl nach Inkubation über 24 Stunden dargestellt. Die Daten stellen den prozentualen Anteil der vitalen Zellen im Vergleich zur unbelasteten Kontrolle dar. Auch durch Zusatz der hier untersuchten Antioxidantien kann im Vergleich zur isolierten Belastung mit Ethanol ein geringerer Rückgang der Zellzahl dokumentiert werden.

Unter einer Kombinationsbelastung mit Ethanol und Katalase kommt es zwar zu einem Rückgang der Zellzahl im Vergleich zur unbelasteten Kontrolle (93,9 %  $\pm$  15,6 % vs. 100,0 %,  $p = 0,30$ ), im Vergleich zur isolierten Belastung mit Ethanol ist die



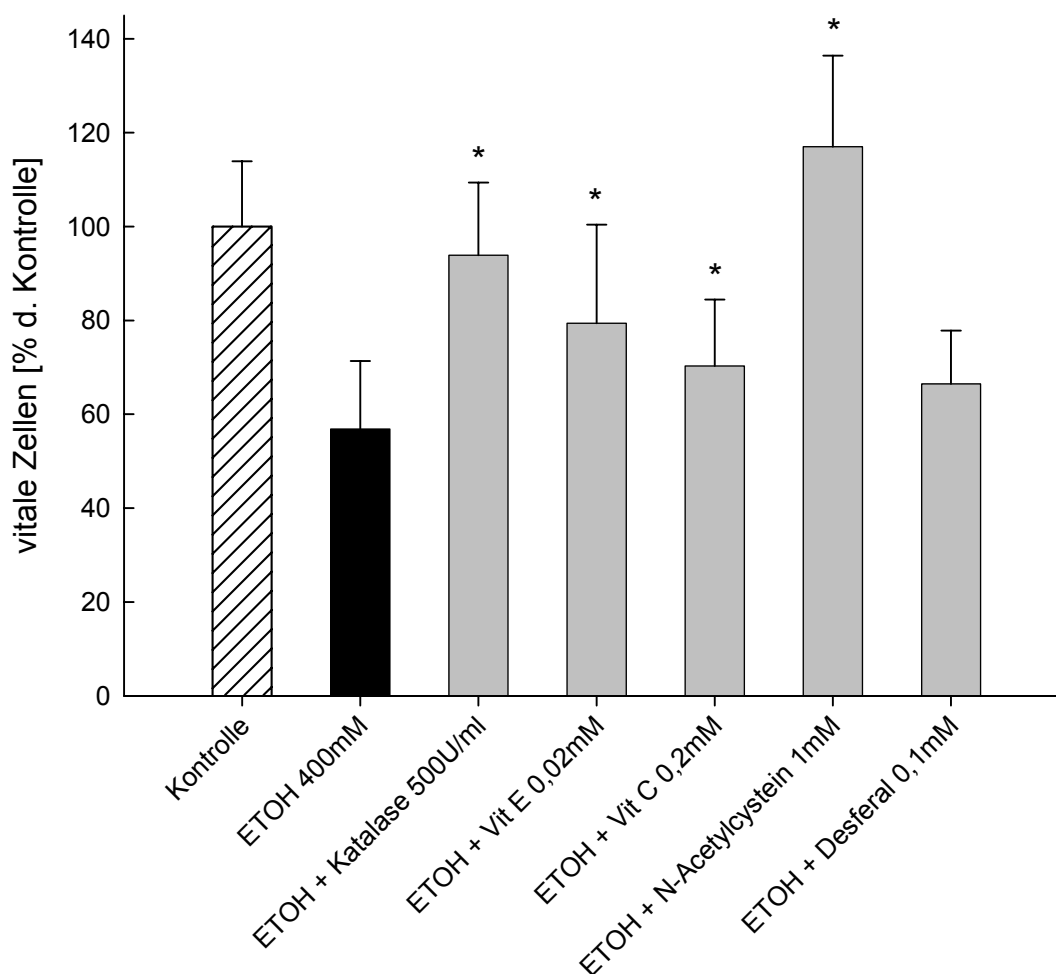
Zellzahl aber statistisch signifikant höher (93,9 % ± 15,6 % vs. 56,9 % ± 14,5 %,  $p < 0,01$ ).

Weniger deutlich, aber ebenfalls nachweisbar, ist dieser Effekt nach Zusatz von Vitamin E und Vitamin C. Im Vergleich zur isolierten Belastung mit Ethanol wird unter der Kombinationsbelastung wiederum eine signifikant höhere Zellzahl dokumentiert: 79,4 % ± 21,0 % bei Ethanol + Vitamin E und 70,3 % ± 14,1 % bei Ethanol + Vitamin C gegenüber 56,9 % ± 14,5 % bei isolierter Belastung (jeweils  $p < 0,01$ ).

Bei der Kombinationsbelastung mit Ethanol und 5 mM N-Acetylcystein im Vergleich zur isolierten Belastung mit Ethanol zeigt sich ein statistisch signifikanter Anstieg der Zellzahl (117,1 % ± 19,4 % vs. 56,9 % ± 14,5 %,  $p < 0,01$ ).

Unter Ko-Inkubation mit 0,1 mM Desferal kommt es ebenfalls zu einem Anstieg der Zellzahl verglichen mit der Einzelbelastung mit Ethanol (66,5 % ± 11,3 % vs. 56,9 % ± 14,5 %). Diese Veränderung ist nur gering und verfehlt das geforderte Signifikanzniveau ( $p = 0,01$ ).

Abbildung 10



**Abbildung 10: Zellvitalität unter Ethanol und verschiedenen Antioxidantien**

Die Zellvitalität wurde mit der Trypanblaumethode nach Belastung der Zellen für 24 Stunden bestimmt. Die Daten stellen den prozentualen Anteil der vitalen Zellen bezogen auf die Vitalzellzahl der unbelasteten Kontrolle dar.

Mittelwerte mit Standardabweichung bei  $n = 24$  (\*  $p < 0,01$  im Vergleich zu Ethanol 400 mM).

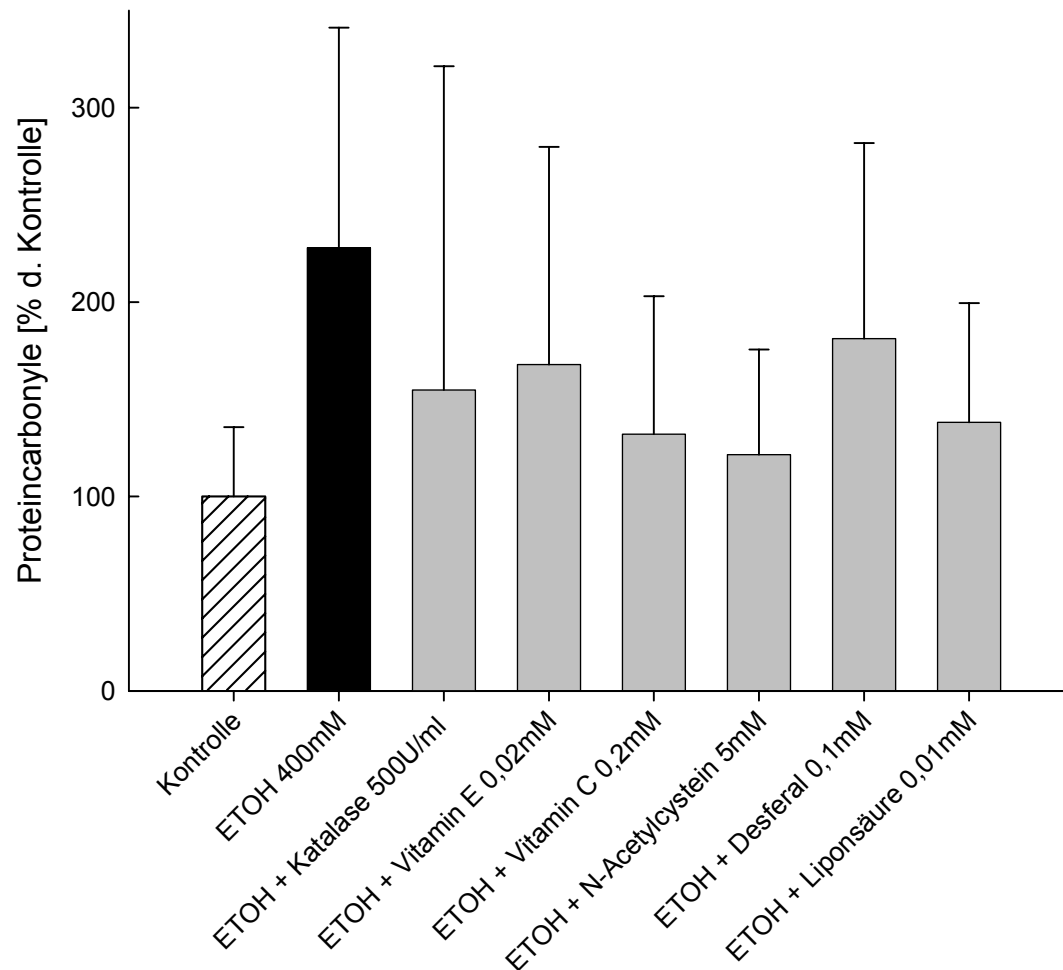
### 3.1.4.2.2 Proteinoxidation durch Ethanol und Protektion durch Antioxidantien

In Abbildung 11 sind die Proteincarbonyle nach Kombinationsbelastung mit Ethanol und verschiedenen Antioxidantien über die Dauer von 24 Stunden dargestellt. Die Daten stellen den prozentualen Wert der Proteincarbonyle bezogen auf den Wert der unbelasteten Kontrolle dar.

Unter der Ko-Inkubation mit Ethanol und den Antioxidantien kommt es verglichen mit der isolierten Belastung mit Ethanol zu einem geringeren Anstieg der

Proteincarbonyle. Besonders deutlich wird dies bei der Kombinationsbelastung mit N-Acetylcystein ( $121,6 \% \pm 54,0 \%$  vs.  $227,9 \% \pm 113,3 \%$ ), verfehlt allerdings das geforderte Signifikanzniveau ( $p = 0,02$ ).

**Abbildung 11**



**Abbildung 11: Proteincarbonyle unter Ethanol und Antioxidantien**

Die Proteincarbonyle wurden nach Belastung der Zellen für 24 Stunden bestimmt. Die Daten stellen den prozentualen Wert der Proteincarbonyle bezogen auf den Wert der unbelasteten Kontrolle dar. Mittelwerte mit Standardabweichung bei  $n = 9$  (\*  $p < 0,01$  im Vergleich zu Ethanol 400 mM).

### 3.1.4.2.3 Lipidperoxidation durch Ethanol und Protektion durch Antioxidantien

In Abbildung 12 sind die Ergebnisse der Versuche zur Lipidperoxidation nach Kombinationsbelastung mit Ethanol und verschiedenen Antioxidantien über die Dauer von 24 Stunden dargestellt. Die Daten stellen den prozentualen Wert der Malondialdehyde bezogen auf den Wert der unbelasteten Kontrolle dar. Unter der isolierten Belastung mit Ethanol wird, wie bereits in Abbildung 5 dargestellt, ein Anstieg der Malondialdehyde deutlich ( $137,6 \% \pm 36,9 \%$  vs.  $100,0 \%$ ). Dieser Unterschied verfehlt allerdings knapp das geforderte Signifikanzniveau ( $p = 0,01$ ). Die Ergebnisse der Kombinationsbelastung sind uneinheitlich:

Abbildung 12

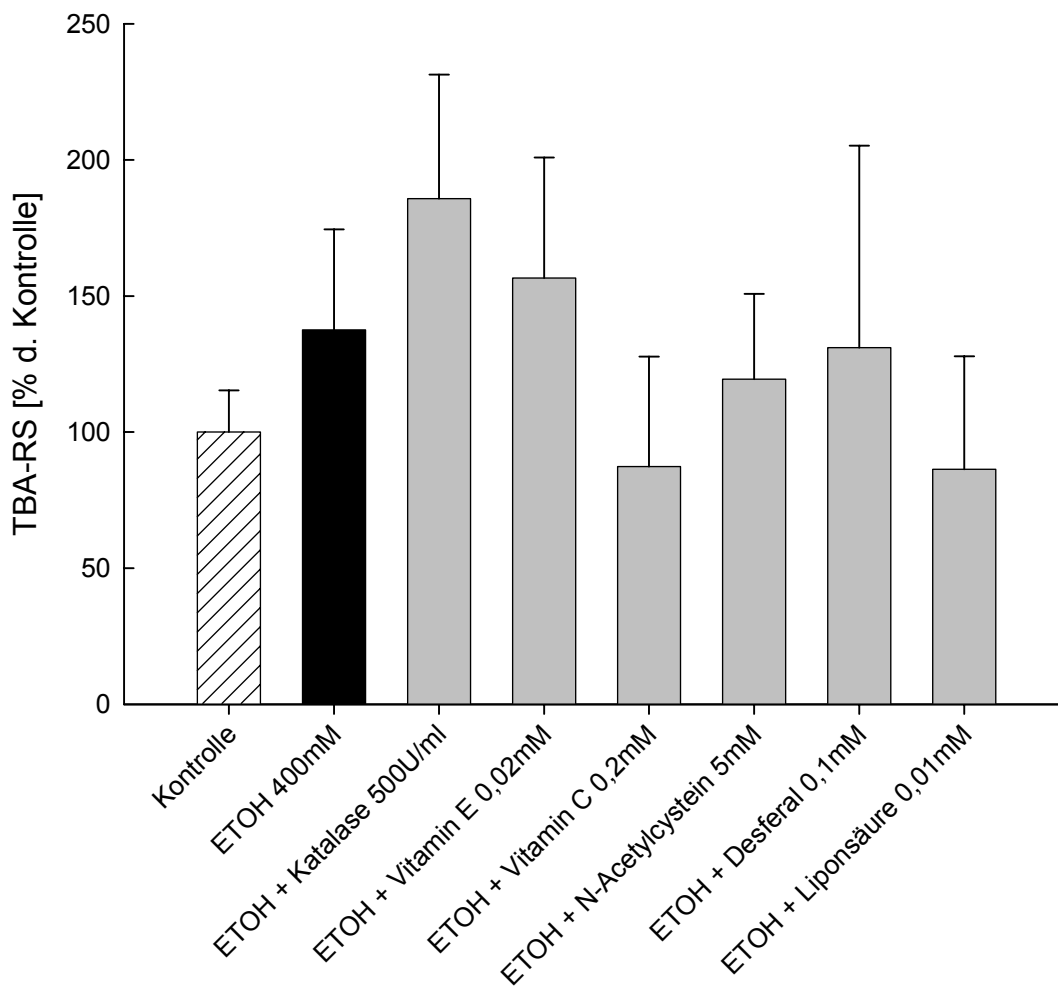


Abbildung 12: Malondialdehyd unter Ethanol und Antioxidantien

Die Malondialdehyde wurden nach Belastung der Zellen für 24 Stunden bestimmt. Die Daten stellen den prozentualen Wert der Malondialdehyde bezogen auf den Wert der unbelasteten Kontrolle dar. Mittelwerte mit Standardabweichung bei  $n = 9$  (\*  $p < 0,01$  im Vergleich zu Ethanol 400 mM).

Unter Zusatz von Vitamin C ( $87,3 \% \pm 40,5 \%$ ) sowie Liponsäure ( $86,3 \% \pm 41,5 \%$ ) zur Ethanolbelastung zeigt sich ein Abfall der Malondialdehyde auf Werte unterhalb der unbelasteten Kontrolle. Verglichen mit der isolierten Belastung mit Ethanol sind diese Unterschiede allerdings nicht signifikant (jeweils  $p = 0,01$ ). Verglichen mit der isolierten Belastung mit Ethanol kommt es unter der Kombinationsbelastung mit Ethanol und N-Acetylcystein bzw. Desferal nicht zu einer wesentlichen Veränderung der Malondialdehyde. Unter Ko-Inkubation mit Ethanol und Katalase bzw. Vitamin E kommt es verglichen mit der isolierten Belastung zu einer deutlichen, aber nicht signifikanten Zunahme der Malondialdehyde.

## 3.2 Amphetaminderivate

Analog der Experimente mit Ethanol wurden Vitalitätstestungen, Proteincarbonyl-, sowie Malondialdehydbestimmungen nach Belastung mit MDMA, MDA und MDE durchgeführt.

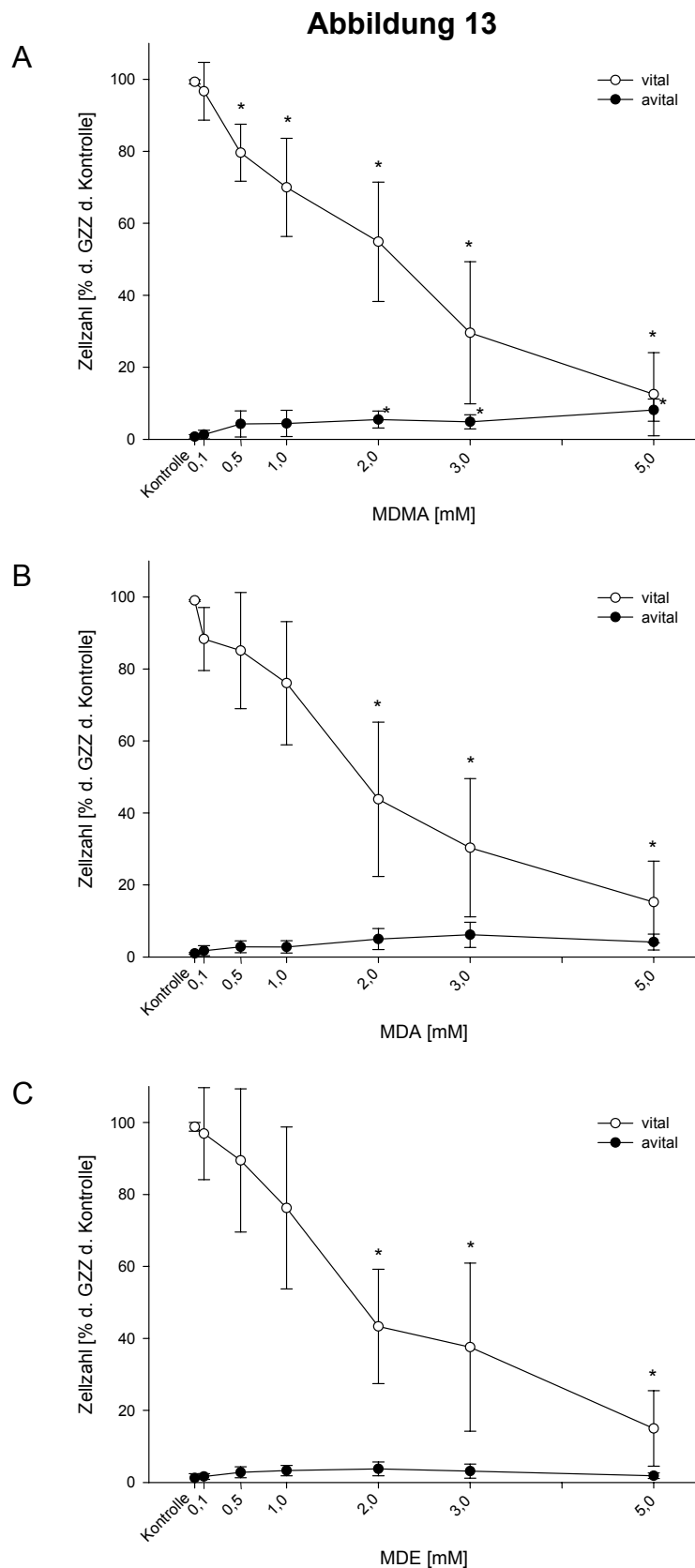
### 3.2.1 Zytotoxizität von MDMA, MDA und MDE

In Abbildung 13 sind die Ergebnisse der Belastung der HT22 Zellen mit MDMA, MDA und MDE über 24 Stunden dargestellt. Die Daten stellen den prozentualen Anteil der vitalen Zellen im Vergleich zur unbelasteten Kontrolle dar. Hierbei zeigt sich eine Abnahme der Gesamtzellzahl bei steigender Konzentration von MDMA, MDA und MDE. Diese Abnahme der Gesamtzellzahl ergibt sich aus einem deutlichen, fast kontinuierlichen Rückgang der vitalen Zellen. Gegenläufig verhält sich der Anteil der avitalen Zellen unter steigender Konzentration von MDMA, MDA und MDE.

Im einzelnen betrachtet zeigt sich nach Belastung mit MDMA bei steigender MDMA-Konzentration ein kontinuierlicher Abfall der Gesamtzellzahl bei Rückgang des Anteils an vitalen Zellen. Bereits eine Konzentration von 0,5 mM MDMA bewirkt eine signifikante Veränderung der Anzahl der vitalen Zellen ( $79,6 \% \pm 7,9 \%$  gegenüber der Kontrolle,  $p < 0,01$ ). Gegensinnig dazu steigt der Anteil der avitalen Zellen an der Gesamtzellzahl bei steigender MDMA-Konzentration fast kontinuierlich an. Ab einer Konzentration von 2,0 mM MDMA ist dieser Anstieg statistisch signifikant ( $5,5 \% \pm 2,3 \%$  vs.  $0,7 \% \pm 0,6 \%$ ,  $p < 0,01$ ).

Unter Belastung mit MDA zeigt sich bereits in der niedrigen Konzentration von 0,1 mM MDA ein Abfall der Zellzahl. Ab einer Konzentration von 2,0 mM MDA erreicht dieser Effekt statistische Signifikanz ( $43,8 \% \pm 21,4 \%$  gegenüber der Kontrolle,  $p < 0,01$ ). Die Anzahl der avitalen Zellen nimmt unter steigender Konzentration von MDA zu ohne allerdings das geforderte Signifikanzniveau zu erreichen.

Analog dazu zeigt sich auch bei der Untersuchung der Zellvitalitäten nach Belastung mit MDE ein Rückgang der Gesamtzellzahl. Die Zahl der vitalen Zellen nimmt bei steigender MDE-Konzentration ebenfalls ab. Ab einer Konzentration von 2,0 mM MDE ist der Unterschied signifikant ( $43,3 \% \pm 15,9 \%$  gegenüber der Kontrolle,  $p < 0,01$ ).



**Abbildung 13: Zellvitalität unter MDMA (A), MDA (B) bzw. MDE (C)**

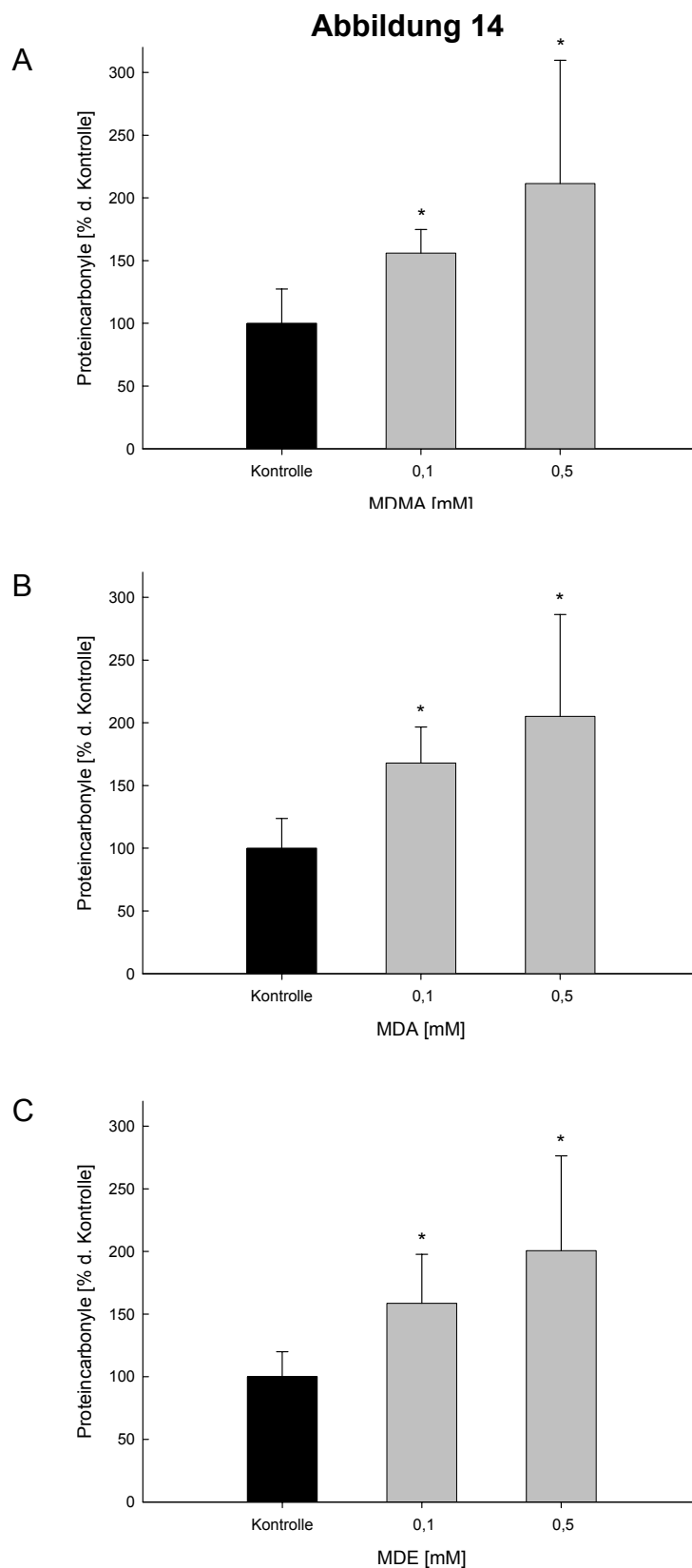
Die Zellvitalität wurde mit der Trypanblaumethode nach Belastung der Zellen für 24 Stunden bestimmt. Die Daten stellen den prozentualen Anteil der vitalen bzw. avitalen Zellen bezogen auf die Gesamtzellzahl der Kontrolle dar. Mittelwerte mit Standardabweichung bei  $n = 20$  (\*  $p < 0,01$  im Vergleich zur Kontrolle).

### 3.2.2 Proteinoxidation durch MDMA, MDA und MDE

In Abbildung 14 sind die Proteincarbonyle nach Belastung mit MDMA, MDA und MDE über die Dauer von 24 Stunden dargestellt. Die Daten stellen den prozentualen Wert der Proteincarbonyle bezogen auf den Wert der unbelasteten Kontrolle dar. Die drei Substanzen wurden jeweils in einer Konzentrationen von 0,1 mM und 0,5 mM eingesetzt, da in den zuvor beschriebenen Experimenten bei diesen Konzentrationen relativ moderate Toxizitäten feststellbar waren (siehe Kap. 3.2.1).

Es zeigt sich für alle drei Substanzen bei steigender Konzentration ein kontinuierlicher Anstieg der Proteincarbonyle. Bei Belastung mit 0,1 mM MDMA steigt die Konzentration der Proteincarbonyle auf etwa 156 % des Ausgangswertes der Kontrolle. In der Versuchsreihe mit 0,1 mM MDA wird ein Anstieg auf etwa 168 %, bei Belastung mit 0,1 mM MDE auf 159 % deutlich. Diese Veränderungen sind statistisch signifikant. Bei der Belastung mit 0,5 mM MDMA, MDA bzw. MDE erhöht sich der Anteil der Proteincarbonyle weiter. Hier wird etwa eine Verdopplung der Konzentration an Proteincarbonylen verglichen mit der Kontrolle gemessen.





**Abbildung 14: Protein carbonyl unter MDMA (A), MDA (B) bzw. MDE (C)**

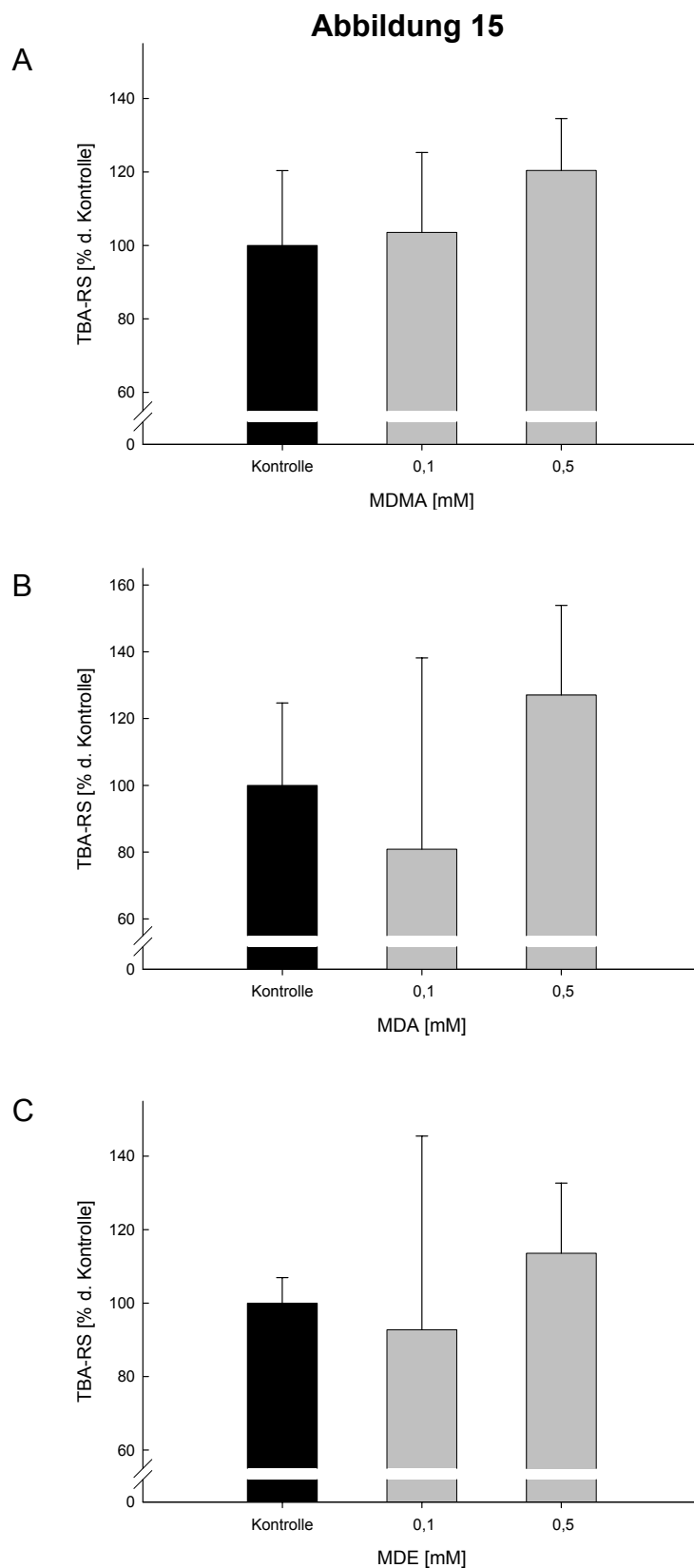
Die Protein carbonyl wurden nach Belastung der Zellen für 24 Stunden bestimmt. Die Daten stellen den prozentualen Wert der Protein carbonyl bezogen auf den Wert der unbelasteten Kontrolle dar. Mittelwerte mit Standardabweichung bei  $n = 9$  (\*  $p < 0,01$  im Vergleich zur Kontrolle).

### 3.2.3 Lipidperoxidation durch MDMA, MDA und MDE

In Abbildung 15 sind die Malondialdehyde nach Belastung mit MDMA, MDA und MDE über die Dauer von 24 Stunden dargestellt. Die Daten stellen den prozentualen Wert der Malondialdehyde bezogen auf den in der unbelasteten Kontrolle gemessenen Wert dar. Die drei Substanzen wurden analog der Proteinoxidation jeweils in einer Konzentrationen von 0,1 mM und 0,5 mM eingesetzt (siehe Kap. 3.2.2).

Die Ergebnisse sind hier uneinheitlich. Bei der Belastung mit 0,1 mM MDMA zeigt sich ein diskreter Anstieg der TBA-RS. Bei Belastung mit 0,1 mM MDA und MDE fällt die Konzentration der Malondialdehyde hingegen ab. Bei der Belastung mit 0,5 mM MDMA, MDA und MDE zeigt sich ein Anstieg der TBA-RS. Für MDA fällt dieser Anstieg am deutlichsten aus und beträgt im Vergleich zur unbelasteten Kontrolle  $127,0 \% \pm 26,9 \%$  ( $p = 0,04$ ).

Insgesamt kann für die Belastung mit jeder der drei Substanzen tendenziell ein Anstieg der TBA-RS-Konzentration abgelesen werden, wobei keine statistische Signifikanz besteht.



**Abbildung 15: Malondialdehyd unter MDMA (A), MDA (B) bzw. MDE (C)**

Die Malondialdehyde wurden nach Belastung der Zellen für 24 Stunden bestimmt. Die Daten stellen den prozentualen Wert der Malondialdehyde bezogen auf den Wert der unbelasteten Kontrolle dar.

Mittelwerte mit Standardabweichung bei  $n = 9$ , bzw.  $n = 6$  (\*  $p < 0,01$  im Vergleich zur Kontrolle).

### 3.2.4 Ko-Inkubation von MDMA, MDA bzw. MDE und Antioxidantien

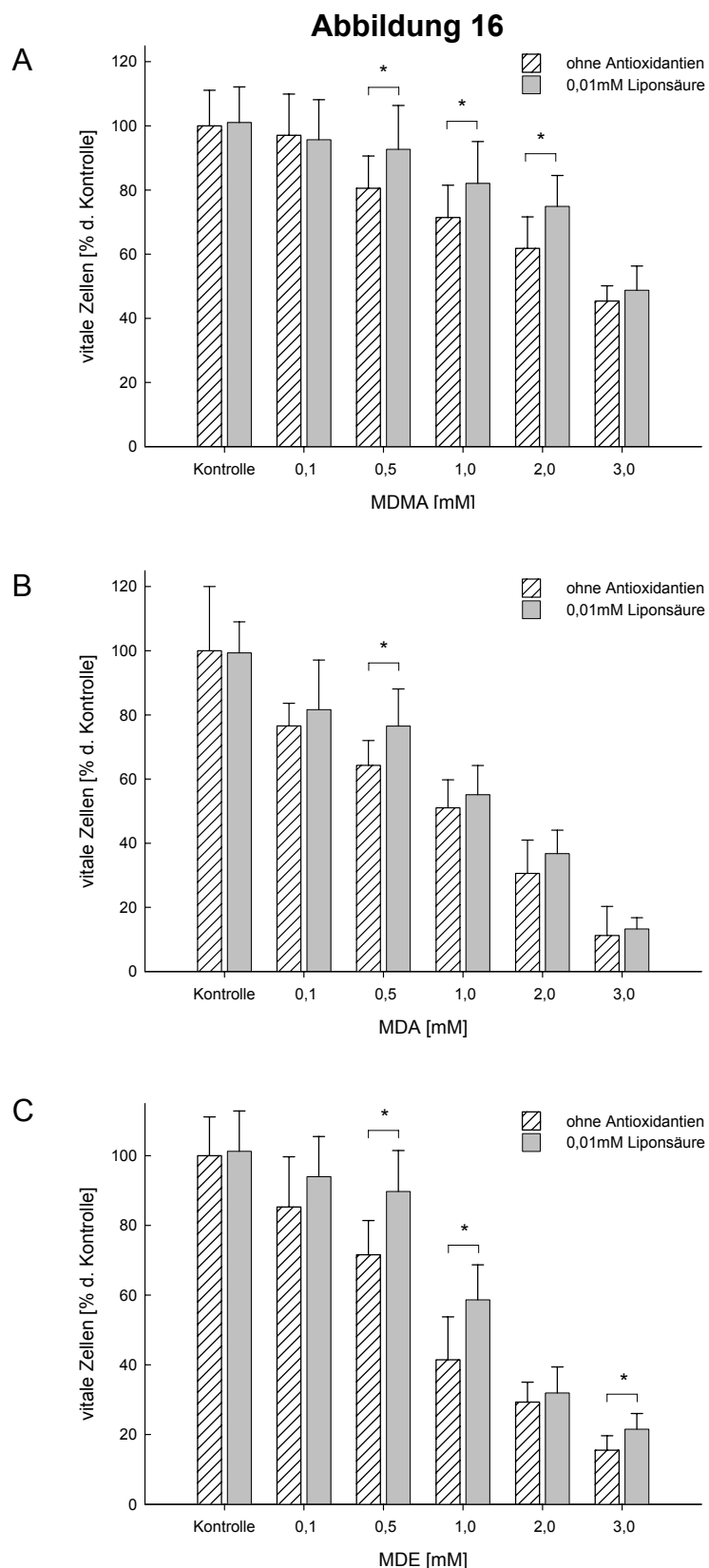
Die folgenden Experimente wurden unter Ko-Inkubation von MDMA, MDA und MDE und Antioxidantien durchgeführt. Hierzu wurden das eingesetzte Amphetaminderivat und die jeweiligen antioxidativen Substanzen gemeinsam für 24 Stunden dem Kulturmedium zugesetzt.

#### 3.2.4.1 Zytotoxizität von MDMA, MDA bzw. MDE und Protektion durch Antioxidantien

In Abbildung 16 ist die Zellzahl der HT22 Zellen unter Belastung mit MDMA, MDA bzw. MDE in steigender Konzentration unter Zusatz von Liponsäure über die Dauer von 24 Stunden dargestellt. Die Daten stellen den prozentualen Anteil der vitalen Zellen bezogen auf die Vitalzellzahl der unbelasteten Kontrolle dar.

Unter isolierter Belastung der HT22 Zellen mit MDMA, MDA bzw. MDE kommt es, wie bereits in Abbildung 13 dargestellt, zu einem kontinuierlichen Abfall der vitalen Zellen in Abhängigkeit von der verwendeten Konzentration der Amphetamine (siehe Kap. 3.2.1). Im Vergleich zu den Ergebnissen der Experimente in Kap. 3.2.1 fallen die Unterschiede in den aktuellen Versuchsreihen noch ausgeprägter aus. So kommt es hier zum Beispiel bereits unter Belastung mit 0,1 mM MDA zu einem signifikanten Rückgang der Zellzahl in Vergleich zur Kontrolle ( $76,5 \% \pm 7,1 \%$  vs.  $100,0 \%$ ,  $p < 0,01$ ).

Ein etwas geringerer Rückgang der Zellzahl unter MDA wird bei gleichzeitiger Einwirkung von 0,01 mM Liponsäure nachgewiesen. Dieser Effekt wird bei allen untersuchten Konzentrationen MDA deutlich und erreicht bei 0,5 mM MDA statistische Signifikanz ( $76,5 \% \pm 11,6 \%$  vs.  $64,3 \% \pm 7,7 \%$ ,  $p < 0,01$ ). Auch bei Belastung mit MDMA und MDE wird nach Zusatz von 0,01 mM Liponsäure ein geringerer Rückgang der Zahl vitaler Zellen für alle untersuchten Konzentrationen MDMA bzw. MDE dokumentiert.



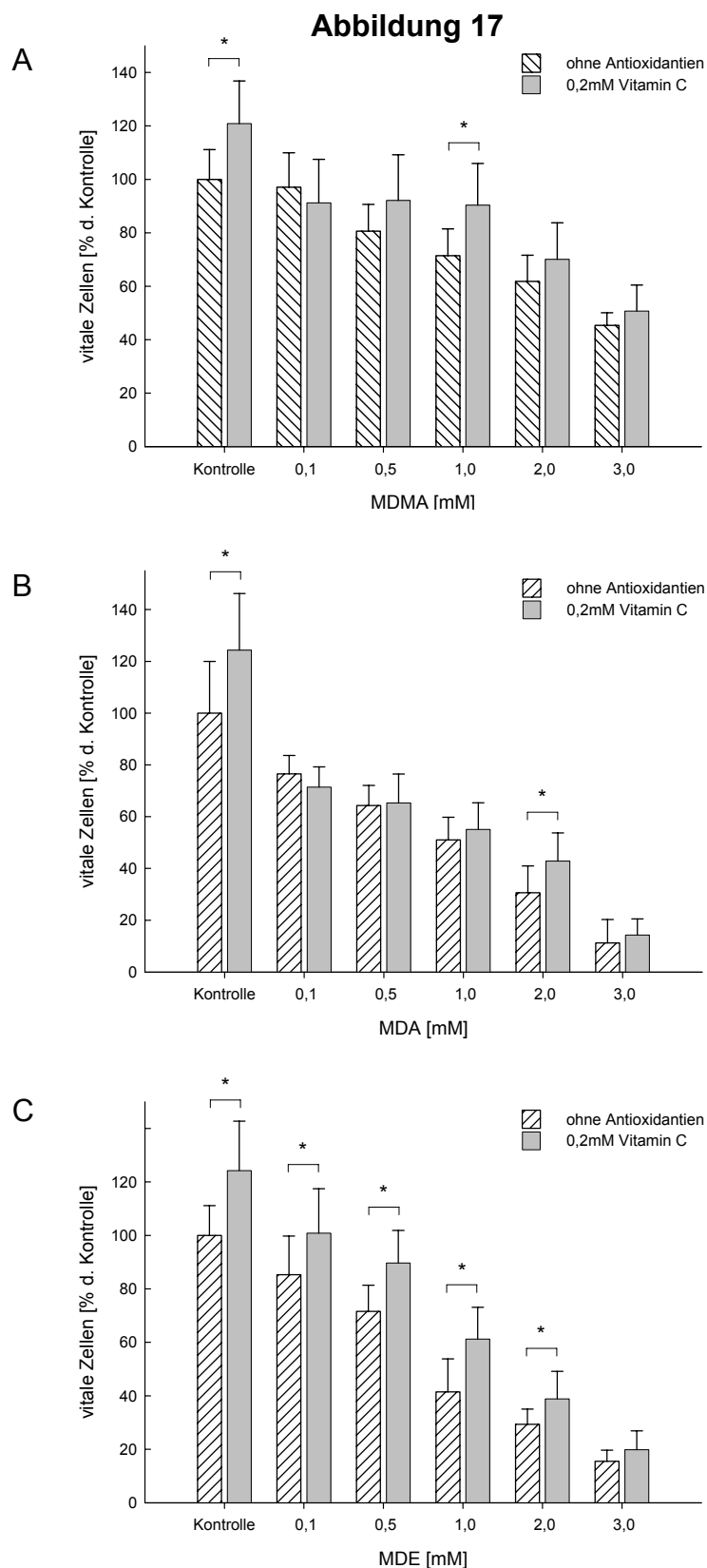
**Abbildung 16: Zellvitalität unter MDMA (A), MDA (B) bzw. MDE (C) und Liponsäure**

Die Zellvitalität wurde mit der Trypanblauemethode nach Belastung der Zellen für 24 Stunden bestimmt. Die Daten stellen den prozentualen Anteil der vitalen Zellen bezogen auf die Vitalzellzahl der unbelasteten Kontrolle dar. Mittelwerte mit Standardabweichung bei  $n = 20$  (\*  $p < 0,01$ ).

In Abbildung 17 ist die Zellzahl der HT22 Zellen unter Belastung mit MDMA, MDA bzw. MDE in steigender Konzentration unter Zusatz von Vitamin C über die Dauer von 24 Stunden dargestellt. Die Daten stellen den prozentualen Anteil der vitalen Zellen bezogen auf die Vitalzellzahl der unbelasteten Kontrolle dar.

Hierbei fällt zunächst auf, dass es unter Zusatz von 0,2 mM Vitamin C zur unbelasteten Kontrolle zu einem signifikanten Anstieg der Zahl der vitalen HT22 Zellen kommt (z. B. für MDA:  $124,3 \% \pm 21,8 \%$  vs.  $100,0 \%$ ,  $p < 0,01$ ). Diese Beobachtung deckt sich mit den Ergebnissen aus Kap. 3.1.4.1 (siehe Abbildung 6).

Analog zu den Experimenten mit Liponsäure ist der Rückgang der Vitalzellzahl auch durch Zusatz von Vitamin C zur Belastung mit MDMA, MDA bzw. MDE geringer ausgeprägt. Sehr deutlich wird dieser Effekt der Belastung mit MDE in steigender Konzentration. In fast jeder eingesetzten Konzentration MDE wird bei Zusatz von Vitamin C eine signifikant höheren Zellzahl nachgewiesen, wie beispielsweise für 1,0 mM MDE ( $61,2 \pm 11,9 \%$  vs.  $41,5 \% \pm 12,3 \%$ ,  $p < 0,01$ ). Weniger deutlich hingegen ist dieser Effekt bei der Belastung mit MDMA, wobei auch hier für nahezu jede untersuchte Konzentration durch Zusatz von Vitamin C eine tendenziell, wobei nicht signifikant, höhere Zellzahl erreicht wird.



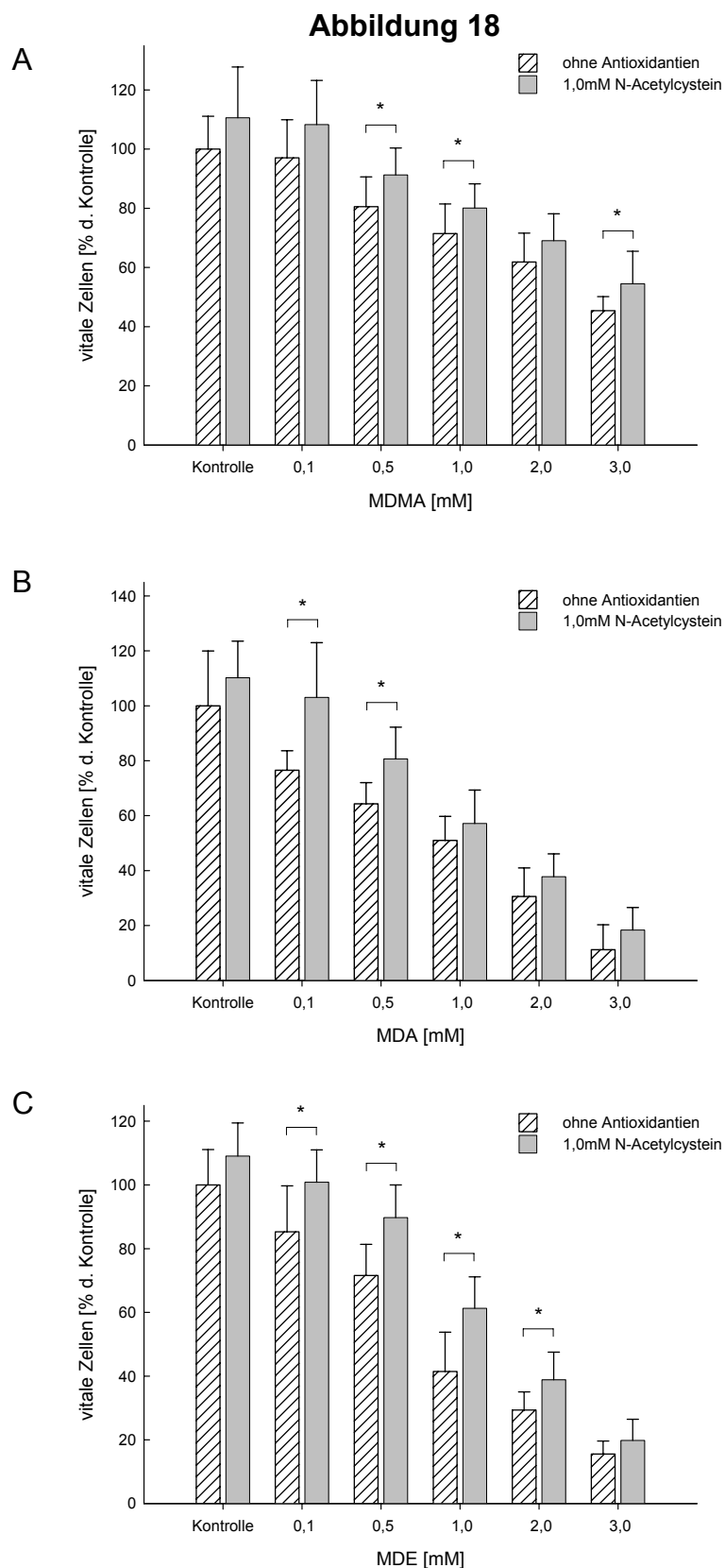
**Abbildung 17: Zellvitalität unter MDMA (A), MDA (B) bzw. MDE (C) und Vitamin C**

Die Zellvitalität wurde mit der Trypanblauemethode nach Belastung der Zellen für 24 Stunden bestimmt. Die Daten stellen den prozentualen Anteil der vitalen Zellen bezogen auf die Vitalzellzahl der unbelasteten Kontrolle dar. Mittelwerte mit Standardabweichung bei  $n = 20$  (\*  $p < 0,01$ ).

In Abbildung 18 ist die Zellzahl der HT22 Zellen unter Belastung mit MDMA, MDA bzw. MDE in steigender Konzentration unter Zusatz von N-Acetylcystein über die Dauer von 24 Stunden dargestellt. Die Daten stellen den prozentualen Anteil der vitalen Zellen bezogen auf die Vitalzellzahl der unbelasteten Kontrolle dar.

Ähnlich den Ergebnissen der Ko-Inkubation der Amphetamine zusammen mit Liponsäure oder Vitamin C zeigt sich bei Zusatz von 1 mM N-Acetylcystein zu MDMA, MDA bzw. MDE ein geringerer Abfall der Zellvitalität gegenüber der isolierten Belastung mit MDMA, MDA bzw. MDE. Insbesondere in den Versuchsreihen mit MDE wird unter Zusatz von N-Acetylcystein eine geringere Reduktion der Vitalzellzahl deutlich. Hier ist der Effekt für fast alle untersuchten Konzentrationen MDE statistisch signifikant, so beispielsweise bei 0,5 mM MDE ( $89,7 \pm 10,3 \%$  vs.  $71,6 \pm 9,8 \%$ ,  $p < 0,01$ ). Auch bei MDMA und MDA ist dieser Effekt vorhanden und für einige der untersuchten Konzentrationen ebenfalls statistisch signifikant.





**Abbildung 18: Zellvitalität unter MDMA (A), MDA (B) bzw. MDE (C) und N-Ac**

Die Zellvitalität wurde mit der Trypanblaumethode nach Belastung der Zellen für 24 Stunden bestimmt. Die Daten stellen den prozentualen Anteil der vitalen Zellen bezogen auf die Vitalzellzahl der unbelasteten Kontrolle dar. Mittelwerte mit Standardabweichung bei  $n = 20$  (\*  $p < 0,01$ ).

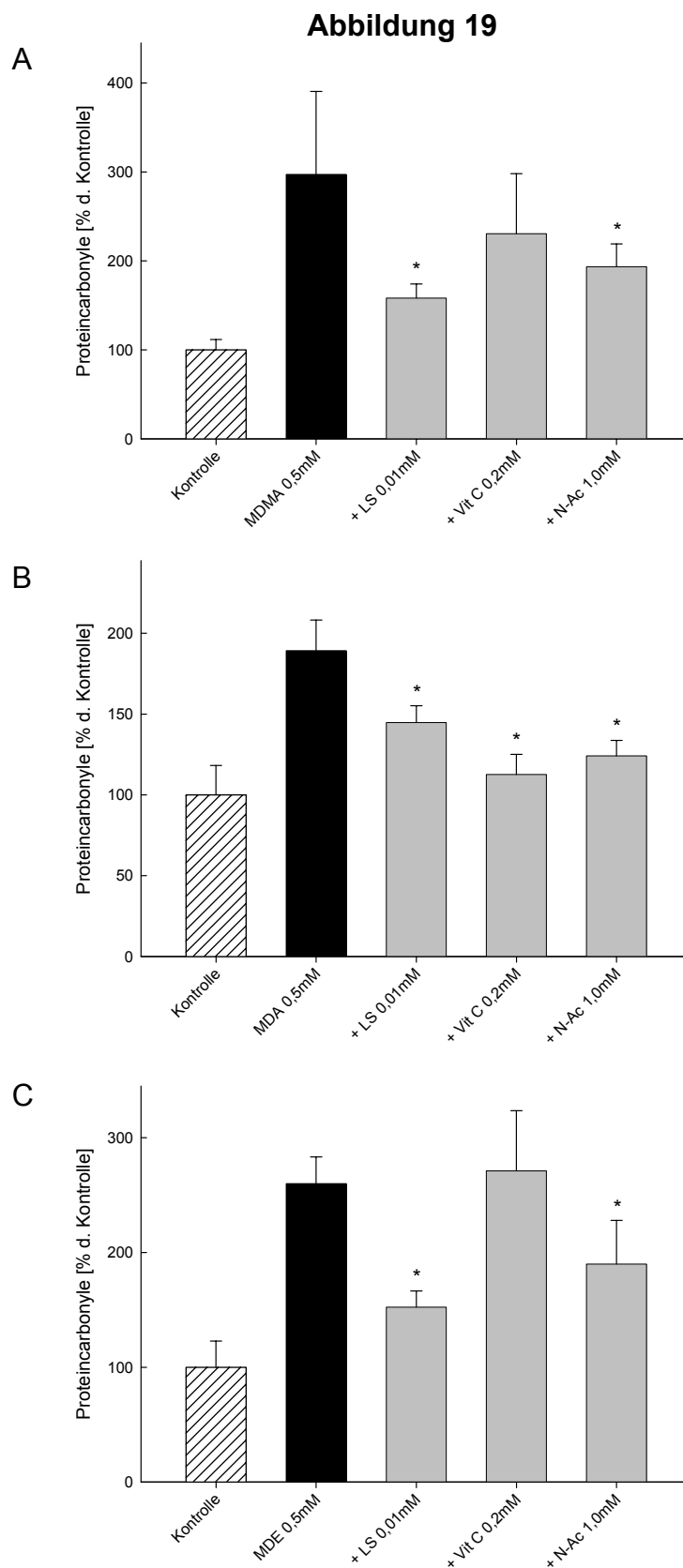
### 3.2.4.2 Proteinoxidation durch MDMA, MDA bzw. MDE und Protektion durch Antioxidantien

In Abbildung 19 sind die Proteincarbonyle nach Belastung mit MDMA, MDA bzw. MDE unter Zusatz von Antioxidantien über die Dauer von 24 Stunden dargestellt. Die Daten stellen den prozentualen Wert der Proteincarbonyle bezogen auf den Wert der unbelasteten Kontrolle dar. Analog der Experimente zur Zytotoxizität wurden Liponsäure, Vitamin C und N-Acetylcystein eingesetzt.

Unter isolierter Belastung mit 0,5 mM MDMA, MDA bzw. MDE kommt es wie bereits in Abbildung 12 dargestellt zu einem signifikanten Anstieg der Proteincarbonyle. Nach Belastung mit 0,5 mM MDMA wird für die drei eingesetzten Antioxidantien ein geringerer Anstieg der Proteincarbonyle dokumentiert. Die Ko-Inkubation mit 10  $\mu$ M Liponsäure zeigt die deutlichste Reduktion des Anstiegs Proteincarbonyle verglichen mit der Einzelbelastung mit MDMA (158,2 %  $\pm$  15,8 % vs. 297,2 %  $\pm$  93,2 %,  $p < 0,01$ ).

Auch unter Zusatz von Antioxidantien zu MDA zeigt sich eine signifikant geringerer Anstieg im Vergleich zur isolierten Belastung mit MDA, insbesondere bei 0,2 mM Vitamin C auf Werte nahe denen der unbelasteten Kontrolle (112,7 %  $\pm$  12,5 % vs. 189,3 %  $\pm$  18,9 %,  $p < 0,01$ ).

Auch bei der Untersuchung von MDE wird bei Zusatz von 10  $\mu$ M Liponsäure bzw. 1 mM N-Acetylcystein ein geringerer Anstieg der Proteincarbonyle deutlich. Hier ist das Ergebnis bei Zusatz von 10  $\mu$ M Liponsäure besonders ausgeprägt (152,4 %  $\pm$  14,1 % vs. 260,1 %  $\pm$  23,2 %,  $p < 0,01$ ).



**Abbildung 19: Proteincarbonyle unter MDMA (A), MDA (B) bzw. MDE (C) und Antioxidantien**

Die Proteincarbonyle wurden nach Belastung der Zellen für 24 Stunden bestimmt. Die Daten stellen den prozentualen Wert der Proteincarbonyle bezogen auf den Wert der unbelasteten Kontrolle dar. Mittelwerte mit Standardabweichung bei  $n = 9$  (\*  $p < 0,01$  im Vergleich zu je MDMA, MDA bzw. MDE 0,5 mM ohne Antioxidantien).

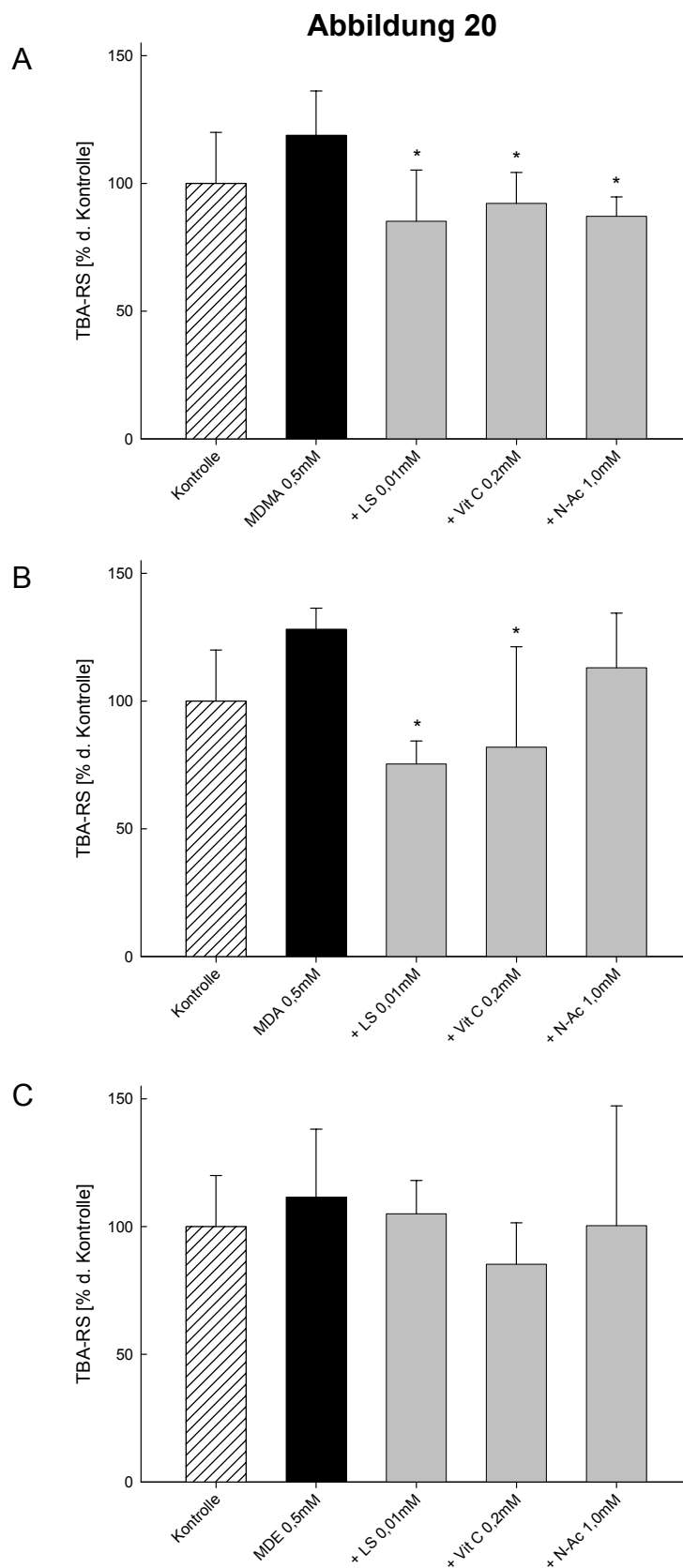
### 3.2.4.3 Lipidperoxidation durch MDMA, MDA bzw. MDE und Protektion durch Antioxidantien

In Abbildung 20 sind die Malondialdehyde nach Belastung mit MDMA, MDA bzw. MDE unter Zusatz von Antioxidantien über die Dauer von 24 Stunden dargestellt. Die Daten stellen den prozentualen Wert der Malondialdehyde bezogen auf den Wert der unbelasteten Kontrolle dar. Analog der Experimente zur Zytotoxizität wurden Liponsäure, Vitamin C und N-Acetylcystein eingesetzt.

Unter isolierter Belastung mit 0,5 mM MDMA, MDA bzw. MDE kommt es wie bereits in Abbildung 15 dargestellt zu einem Anstieg der Malondialdehyde gegenüber der Kontrolle. Im Vergleich zu den Ergebnissen aus Kap. 3.2.3 fällt der Unterschied zwischen Belastung und Kontrolle in den aktuellen Versuchsreihen noch größer aus und erreicht für MDA statistische Signifikanz ( $128,1 \% \pm 8,2 \%$  vs.  $100,0 \%$ ,  $p < 0,01$ ).

Unter Ko-Inkubation mit MDMA und Antioxidantien wird die Konzentration der Malondialdehyde gegenüber der isolierten Inkubation mit MDMA signifikant reduziert. Die Konzentration der Malondialdehyde erreicht dabei Werte etwas unterhalb der unbelasteten Kontrolle. Am deutlichsten wird dieser Effekt bei Zusatz von N-Acetylcystein zu MDMA ( $87,1 \pm 7,6 \%$  vs.  $118,9 \% \pm 17,3 \%$ ,  $p < 0,01$ ).

Unter Zusatz von Antioxidantien zu MDA wird ein geringerer Anstieg der Malondialdehyde dokumentiert. Bei Einsatz von  $10 \mu\text{M}$  Liponsäure und  $0,2 \text{ mM}$  Vitamin C lässt sich ein Rückgang der Malondialdehyde auf unterhalb der unbelasteten Kontrolle liegende Werte nachweisen. Insbesondere bei  $0,01 \text{ mM}$  Liponsäure kommt es zu einer signifikanten Reduktion der Malondialdehyde gegenüber der isolierten Belastung mit MDA ( $75,4 \% \pm 9,0 \%$  vs.  $128,1 \% \pm 8,2 \%$ ,  $p < 0,01$ ). Die Ergebnisse der Ko-Inkubation von MDE und Antioxidantien sind uneinheitlich. Signifikante Unterschiede werden nicht nachgewiesen.



**Abbildung 20: Malondialdehyd unter MDMA (A), MDA (B) bzw. MDE (C) und Antioxidantien**

Die Malondialdehyde wurden nach Belastung der Zellen für 24 Stunden bestimmt. Die Daten stellen den prozentualen Wert der Malondialdehyde bezogen auf den Wert der unbelasteten Kontrolle dar. Mittelwerte mit Standardabweichung bei  $n = 9$  (\*  $p < 0,01$  im Vergleich zu je MDMA, MDA bzw. MDE 0,5 mM ohne Antioxidantien).

### 3.3 Kombinationsbelastungen mit Ethanol und MDMA

Die nachfolgenden Experimente wurden exemplarisch an dem Amphetaminderivat MDMA durchgeführt, da sich in den vorherigen Versuchen für MDE, MDA und MDMA vergleichbare Ergebnisse eruieren ließen.

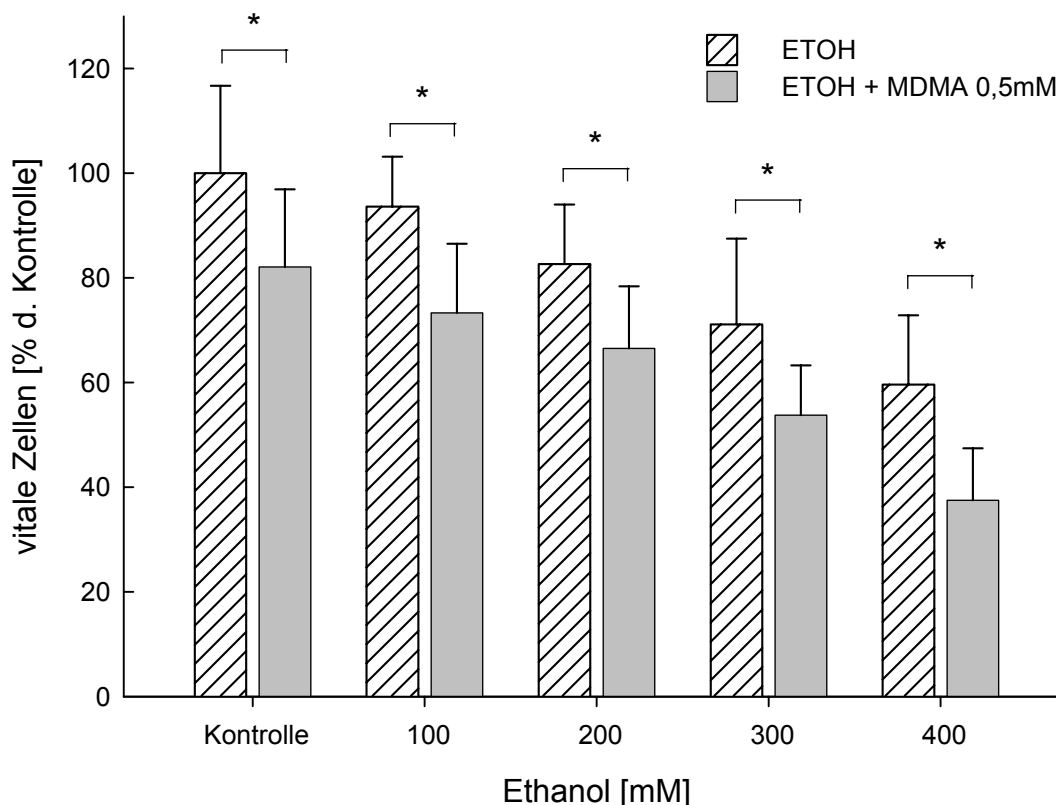
#### 3.3.1 Zytotoxizität durch Ethanol und MDMA auf HT22 Zellen

In Abbildung 21 ist die Zellzahl der HT22 Zellen unter Belastung mit Ethanol in steigender Konzentration und Kombination mit MDMA über die Dauer von 24 Stunden dargestellt. Die Daten stellen den prozentualen Anteil der vitalen Zellen bezogen auf die Vitalzellzahl der unbelasteten Kontrolle dar.

Unter isolierter Belastung der HT22 Zellen mit Ethanol kommt es, wie bereits in Abbildung 3 dargestellt, zu einem kontinuierlichen Abfall der vitalen Zellen in Abhängigkeit von der verwendeten Konzentration (siehe Kap. 3.1.1). Der Zusatz von 0,5 mM MDMA führt zu einem zusätzlichen Abfall der Zellzahl. Dieser Effekt ist bei jeder eingesetzten Ethanolkonzentration nachweisbar und statistisch signifikant.

Besonders deutlich wird die Reduktion der Zellzahl bei 400 mM Ethanol. Hier kommt es durch Inkubation mit Ethanol zu einem Abfall der Zellzahl auf etwa 60 % der Zellen der unbelasteten Kontrolle (59,6 %  $\pm$  13,2 % vs. 100,0 %,  $p < 0,01$ ). Durch Kombination mit zusätzlichen 0,5 mM MDMA fällt die Zellzahl statistisch signifikant auf etwa 38 % der Zellen der unbelasteten Kontrolle (37,5 %  $\pm$  9,9 % vs. 100,0 %,  $p < 0,01$ ) und erreicht das Signifikanzniveau ebenfalls im Vergleich zur Einzelbelastung mit Ethanol (37,5 %  $\pm$  9,9 % vs. 59,6 %  $\pm$  13,2 %,  $p < 0,01$ ).

Abbildung 21



**Abbildung 21: Zellvitalität bei Kombinationsbelastung mit Ethanol und MDMA**

Die Zellvitalität wurde mit der Trypanblaumethode nach Belastung der Zellen für 24 Stunden bestimmt. Die Daten stellen den prozentualen Anteil der vitalen Zellen bezogen auf die Vitalzellzahl der unbelasteten Kontrolle dar. Mittelwerte mit Standardabweichung bei  $n = 12$  (\*  $p < 0,01$ ).

### 3.3.2 Ko-Inkubation mit Antioxidantien bei Kombinationsbelastungen

#### 3.3.2.1 Zytotoxizität durch Ethanol und MDMA und Protektion durch Antioxidantien

In Abbildung 22 ist die Zellzahl der HT22 Zellen unter Kombinationsbelastung mit Ethanol in steigender Konzentration und MDMA unter Zusatz verschiedener Antioxidantien über die Dauer von 24 Stunden dargestellt. Die Daten stellen den prozentualen Anteil der vitalen Zellen bezogen auf die Vitalzellzahl der unbelasteten Kontrolle dar.

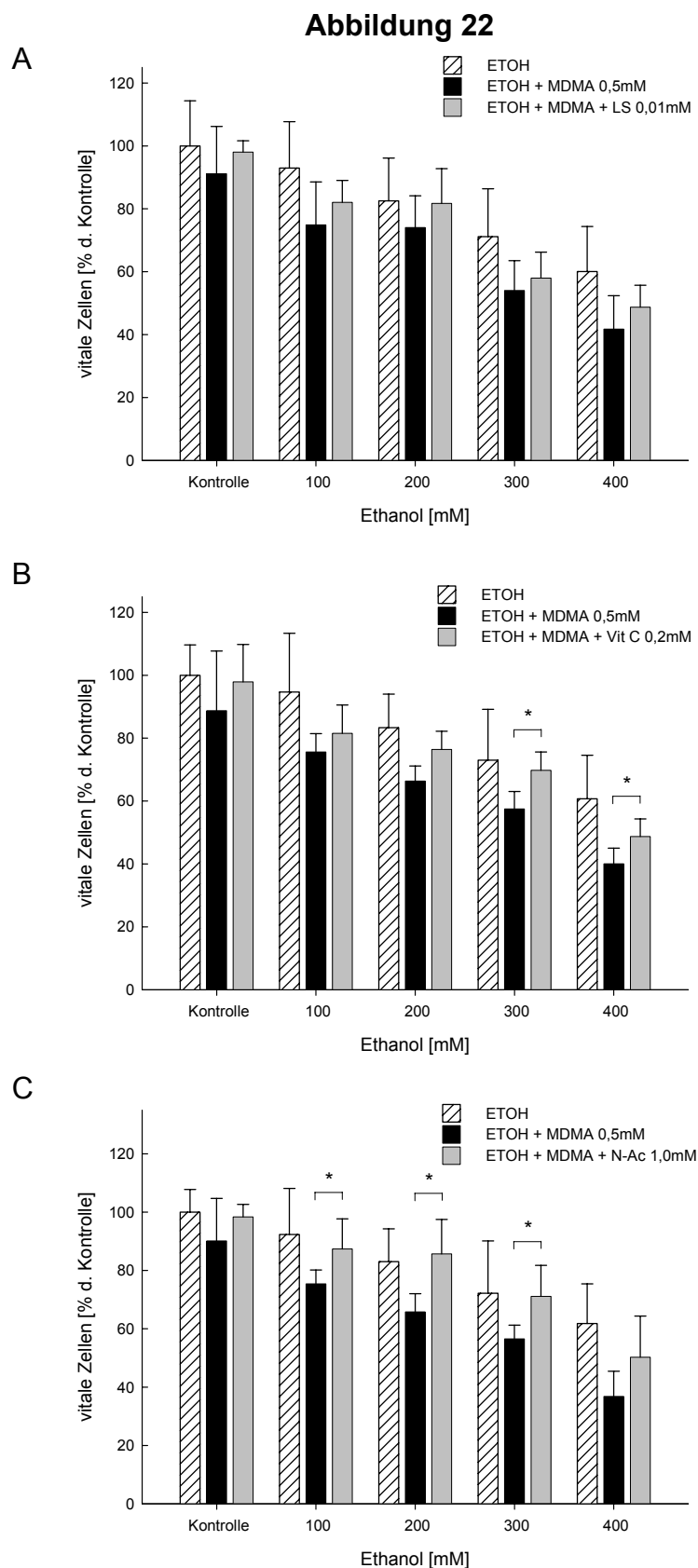
Im ersten Diagramm wird die Kombinationsbelastung unter Zusatz von 10  $\mu\text{M}$  Liponsäure dargestellt. Wie bereits in Abbildung 21 wird ein kontinuierlicher Rückgang der Zellzahl unter Kombinationsbelastung von Ethanol in ansteigenden

Konzentrationen und 0,5 mM MDMA deutlich. Durch Zusatz von 10  $\mu$ M Liponsäure wird ein geringerer Abfall der Vitalzellzahl dokumentiert. Am ausgeprägtesten ist dies bei 200 mM Ethanol. Hier fällt die Zellzahl unter Kombinationsbelastung im Vergleich zur isolierten Belastung mit Ethanol von  $82,6 \% \pm 13,6 \%$  auf  $74,0 \% \pm 10,1 \%$  ( $p = 0,09$ ). Durch Zusatz von 10  $\mu$ M Liponsäure fällt die Zellzahl nur auf  $81,7 \% \pm 11,0 \%$  und liegt damit nahezu im Bereich der isolierten Belastung mit Ethanol. Verglichen mit der Zellzahl unter Kombinationsbelastung erreicht dieser Unterschied allerdings nicht das geforderte Signifikanzniveau.

Das zweite Diagramm zeigt die Entwicklung der Zellzahl unter Zusatz von 0,2 mM Vitamin C zur Kombinationsbelastung. Hier werden vergleichbare Ergebnisse wie im vorherigen Experiment mit Liponsäure deutlich. So wird durch Zusatz von Vitamin C zur Kombinationsbelastung von Ethanol in ansteigenden Konzentrationen und 0,5 mM MDMA ein geringerer Abfall der Zellzahl darstellbar.

Im dritten Diagramm ist die Entwicklung der Zellzahl unter Zusatz von 1,0 mM N-Acetylcystein zur Kombinationsbelastung dargestellt. In einer Konzentration von 200 mM Ethanol in der Kombinationsbelastung ergeben sich bei Zusatz von N-Acetylcystein Werte, die oberhalb der isolierten Belastung mit Ethanol liegen. Für diese Konzentration ist der Effekt statistisch signifikant ( $85,7 \% \pm 11,8 \%$  vs.  $65,8 \% \pm 6,3 \%$ ,  $p < 0,01$ ).





**Abbildung 22: Zellvitalität unter Kombinationsbelastung und Antioxidantien**

Antioxidantien: Liponsäure 0,01mM (A), Vitamin C 0,2mM (B), N-Acetylcystein 1,0 mM (C). Die Zellvitalität wurde mit der Trypanblauemethode nach Belastung der Zellen für 24 Stunden bestimmt. Die Daten stellen den prozentualen Anteil der vitalen Zellen bezogen auf die Vitalzellzahl der unbelasteten Kontrolle dar. Mittelwerte mit Standardabweichung bei  $n = 12$  (\*  $p < 0,01$ ).

## 4 Diskussion

Halluzinogene Amphetamine wie MDMA („Ecstasy“), MDA („Love“) und MDE („Eve“) sind unter Jugendlichen, insbesondere in der „Clubszene“, weit verbreitet. Diese sogenannten „Partydrogen“ werden vor allem in Verbindung mit Alkohol eingenommen<sup>23</sup>. Folge dieses Konsums können schwere neurologische Symptome bis hin zu Koma und Tod sein und eine irreversible Schädigung des Zentralnervensystems ist möglich<sup>81</sup>. Der Pathomechanismus dieser Nervenzellschädigung ist bislang nicht vollständig geklärt. Oxidativer Stress wird in bisherigen Studien und tierexperimentellen Arbeiten als ein wesentlicher Mechanismus der toxischen Effekte von halluzinogenen Amphetaminen und Alkohol diskutiert<sup>16, 60, 61</sup>.

Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit war es, die unmittelbaren Auswirkungen einer Belastung mit den psychotropen Substanzen Ethanol und halluzinogenen Amphetaminen auf Zellen des Zentralnervensystems *in vitro* zu untersuchen und zu klären, inwieweit auch in neuronalen Geweben oxidative Schädigungsmechanismen eine Rolle spielen. Im weiteren wurde geprüft, ob der Einsatz antioxidativer Substanzen protektive Effekte auf die Zellen und Einfluss auf Zellvitalität und das Auftreten oxidierter Zellprodukte hat. Da die untersuchten Substanzen selten isoliert konsumiert werden und im klinischen Alltag insbesondere die Mischintoxikation von Ethanol und halluzinogenen Amphetaminen einen komplizierten Verlauf nehmen kann, galt ein besonderes Augenmerk der vorliegenden Arbeit dieser kombinierten Belastung und die Beeinflussung der vermuteten zytotoxischen Effekte durch Zusatz antioxidativer Substanzen.

### 4.1 Wesentliche Ergebnisse der vorliegenden Arbeit

Bei der detaillierten Betrachtung der Experimente zur Zellvitalität zeigten sich deutliche dosisabhängige zytotoxische Effekte von Ethanol auf die hippokampale Zelllinie HT22. Bereits bei einer niedrigen Ethanolkonzentration von 100 mM kam es zu einem signifikanten Rückgang der Gesamtzellzahl und zu einem prozentualen Anstieg der avitalen Zellen an der Gesamtzellzahl. Mit steigender Ethanolkonzentration wurde der Abfall vitaler Zellen noch deutlicher. Die Zellzahl fiel

unter Belastung mit Ethanol und, wie im Folgenden beschrieben, auch den untersuchten Amphetaminderivaten auf einen Bruchteil der unbelasteten Kontrollgruppe. Allerdings stieg die Zahl der avitalen Zellen im Vergleich dazu nur leicht an. Neben zytotoxischen Effekten scheint also auch eine Hemmung des Zellwachstums eine Rolle zu spielen. Des Weiteren muss bei geschädigten oder avitalen Zellen von einer verminderten Adhärenz an Oberflächen der Zellkulturgefäße ausgegangen werden. Diese werden bei Spülschritten im Rahmen der Vitalitätsmessung entfernt und können in der Zählkammer nicht erfasst werden. Die Messung der Proteincarbonyle zeigte einen signifikanten Anstieg unter isolierter Belastung mit Ethanol. Bei den Experimenten zur Lipidperoxidation waren die Ergebnisse uneinheitlich. Unter isolierter Belastung der Zellen wurde erst bei höheren Konzentrationen von Ethanol ebenfalls ein Trend zu höheren Konzentrationen von Malondialdehyd nachgewiesen.

Beim Zusatz antioxidativer Substanzen zur Belastung mit Ethanol konnte für sämtliche eingesetzte Antioxidantien, insbesondere aber für Liponsäure, N-Acetylcystein und Katalase eine signifikante protektive Wirkung auf die Zellvitalität gezeigt werden. Die verwendeten Substanzen bewirkten zudem eine Reduktion der Proteincarbonyle im Vergleich zur isolierten Belastung mit Ethanol. N-Acetylcystein zeigte sich in diesen Experimenten als das wirksamste Antioxidans. Durch N-Acetylcystein wurde die Vitalität der Zellen signifikant verbessert und die Proteincarbonyle wurden auf Werte gesenkt, die unter dem der Negativkontrolle lagen. Eine Erklärung hierfür könnte in der Wirkweise dieser Substanz als Thiolgruppendonator liegen. Durch Beeinflussung des GSH/GSSG-Redoxsystems, das als eines der wichtigsten zellulären Redoxsysteme bezeichnet wird<sup>98</sup>, wird eine besonders effektive Beeinflussung der Proteincarbonylbildung durch N-Acetylcystein ermöglicht. Allerdings ist eine Ursache für die unterschiedliche protektive Potenz der verschiedenen Antioxidantien nicht offensichtlich und dementsprechend allenfalls spekulativ in den spezifischen biochemischen Eigenschaften der HT22 Zellen zu sehen. Die Konzentration von Malondialdehyd konnte beim Zusatz von Vitamin C, Liponsäure und N-Acetylcystein zur Belastung mit Ethanol ebenfalls, wenngleich nicht signifikant, reduziert werden.

Auch die isolierte Belastung der neuronalen Zellen mit MDMA, MDA und MDE bewirkte bereits ab einer geringen Konzentration einen deutlichen Verlust der

Zellvitalität. Ähnlich wie in den Experimenten mit Ethanol gezeigt, sank die Anzahl der vitalen Zellen deutlich ab, während der Anteil der avitalen Zellen stetig anstieg. Insgesamt war ein signifikanter dosisabhängiger Abfall der Gesamtzellzahl zu beobachten, der bei allen drei eingesetzten Amphetaminderivaten ähnlich stark ausgeprägt war. Die Messung der Proteincarbonyle unter isolierter Belastung mit den untersuchten Amphetaminderivaten ergab einen signifikanten Anstieg der Proteinoxidation in Abhängigkeit von der verwendeten Dosis. Die Ergebnisse der Experimente zur Lipidperoxidation zeigten wiederum nur einen leichten Anstieg des Malondialdehyds bei Belastung mit MDMA, MDA und MDE.

Beim Zusatz von N-Acetylcystein, Liponsäure oder Vitamin C zur Inkubation mit den untersuchten Amphetaminderivaten zeigten die Experimente eine effektive Verbesserung der Zellvitalität, wobei bei sehr geringer Konzentration der untersuchten Amphetaminderivate zum Teil eine Anhebung der Zellzahl auf bzw. über den Wert der Negativkontrolle erreicht werden konnte. In diesen Konzentrationen ist die Verbesserung der oxidativen Situation der Zellen ausreichend, um einen Vitalitätsverlust der Zellen durch halluzinogene Amphetamine effektiv zu verhindern. Dies unterstreicht die Bedeutung oxidativer Schädigungsmechanismen in der Pathophysiologie der Wirkung von MDMA, MDA und MDE auf HT22 Zellen, insbesondere in niedrigen Konzentrationen. In höheren Konzentrationen war es möglich, durch antioxidative Substanzen die Zellzahl zu steigern, allerdings konnten die toxischen Effekte hierdurch nicht vollständig aufgehoben werden. Es kann vermutet werden, dass in höheren Konzentrationen halluzinogener Amphetaminderivate die antioxidative Kapazität der Zellen erschöpft ist und neben oxidativem Stress zunehmend auch andere Schädigungsmechanismen, wie beispielsweise pH-Wert-Veränderungen, eine Rolle spielen. Auch auf die Proteinoxidation hatte der Zusatz der genannten Antioxidantien deutliche Effekte. Der Anstieg der Proteincarbonyle konnte durch alle drei eingesetzten Substanzen effektiv vermindert werden, wobei für alle untersuchten Amphetaminderivate Liponsäure die stärkste Wirkung aufwies. Ein ähnlicher Effekt konnte für die Lipidperoxidation gezeigt werden. Hier wurde der Anstieg des Malondialdehyds unter Belastung mit den Amphetaminderivaten durch Zusatz antioxidativer Substanzen teilweise vollständig aufgehoben.

Die Experimente zur Kombinationsbelastung von neuronalen Zellen mit Ethanol und dem Amphetaminderivat MDMA zeigten, wie vermutet, eine Verstärkung der toxischen Wirkung der einzelnen Substanzen. So führte die kombinierte Belastung mit Ethanol und MDMA im Vergleich zur Einzelbelastung mit Ethanol zu einer signifikanten Abnahme der Zellzahl um etwa weitere 10 % in jeder eingesetzten Ethanolkonzentration. Die gemeinsame toxische Wirkung von Ethanol und MDMA entsprach zwar nicht der Summe der Einzelbelastungen – sie lag zum Teil deutlich darunter – zeigte jedoch durchgehend eine synergistische Beziehung. Colado et al. machten deutlich, dass neurotoxische Effekte durch MDMA besonders ausgeprägt ausfallen, wenn die antioxidative Kapazität des Gewebes erschöpft ist<sup>62</sup>. Bei Kombinationsbelastung mit zwei peroxidativen Substanzen scheinen die antioxidativen Schutzmechanismen der neuronalen Zellen früher ausgelastet als durch singuläre Belastung.

Durch Zusatz von N-Acetylcystein, Liponsäure oder Vitamin C konnten in der vorliegenden Arbeit die toxischen Effekte der kombinierten Belastung mit Ethanol und MDMA auf neuronale Zellen vermindert und eine Verbesserung der Zellvitalität erreicht werden, womit die Hypothese der Bedeutung von oxidativem Stress auch in der kombinierten Belastung mit diesen beiden Substanzen gestützt wird. Allerdings ist das Ausmaß der Protektion durch Antioxidantien verglichen mit den Einzelexperimenten eingeschränkt. Eine Erklärung hierfür könnten verschiedene Pathomechanismen für die Auslösung von oxidativem Stress durch Ethanol bzw. MDMA sein. Hiermit ließe sich beispielsweise auch die protektive Wirkung von Vitamin C bei der Einzelbelastung mit MDMA sowie der Kombinationsbelastung im Gegensatz zur fehlenden Wirkung dieses Antioxidans bei der Einzelbelastung mit Ethanol erklären. Diese Aussage ist jedoch ebenfalls, wie bereits erwähnt, allenfalls spekulativ und erst durch weiterführende Experimente zu belegen.

## **4.2 Zytotoxische Effekte von Ethanol**

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigten, dass es unter Inkubation mit Ethanol oder halluzinogenen Amphetaminen zu einer dosisabhängigen Abnahme der neuronalen Zellvitalität kommt. Hierunter fallen vermehrt Oxidationsprodukte an. Diese Effekte werden durch die kombinierte Belastung mit Ethanol und

Amphetaminderivaten noch verstärkt. Der Zusatz verschiedener Antioxidantien kann diese Effekte zum Teil abmildern.

Diese Ergebnisse decken sich weitgehend mit den Erkenntnissen anderer Arbeitsgruppen. Studien an anderen Zelllinien zeigen ebenfalls deutliche zytotoxische Wirkungen von Ethanol. Zum Teil werden hier höhere Toxizitäten beschrieben, was sich mit einer unterschiedlichen Sensitivität der Zellen für Ethanol erklärt. Li et al. veröffentlichten eine Studie an Phäochromozytomzellen der Zelllinie PC12, die einen Vitalitätsverlust auf etwa 60 % bei einer Inkubation mit 100 mM Ethanol für 24 Stunden ergab <sup>136</sup>. Nach Belastung kultivierter Neurone der Ratte über drei bzw. sechs Tage konnten Lamarche et al. eine signifikante Abnahme der Zellvitalitäten auf bis zu 60 % bereits bei einer Ethanolkonzentration von 20 mM nachweisen <sup>132</sup>. Frühere Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe zeigten auch für HT22 Zellen deutlich stärkere Vitalitätsverluste. So wurden bei einer 24-stündigen Belastung mit 400 mM Ethanol Abnahmen der Zellvitalität auf bis zu 20 % der Negativkontrolle gemessen <sup>137</sup>. Die Diskrepanz zu den jetzigen Ergebnisse ist unter anderem mit veränderten Kulturbedingungen, vor allem einer veränderten Zelldichte erklärbar.

Als ein Pathomechanismus der ethanolvermittelten Zytotoxizität ist in einer Reihe von Studien die peroxidative Wirkung von Ethanol beschrieben worden. Besonders in der Leber ist die Bildung freier Radikaler bei der Metabolisierung von Ethanol bekannt <sup>138, 139</sup>, aber auch in anderen Geweben wurde oxidativer Stress nach Ethanolbelastung nachgewiesen <sup>16, 140</sup>. An Phäochromozytomzellen lieferten Li et al. in einer Studie von 2001 die ersten klaren Hinweise, dass vermehrte intrazelluläre Radikalbildung einen Mechanismus der ethanolvermittelten Neurotoxizität darstellt <sup>136</sup>. Das Nervensystem, insbesondere die Hippokampusregion, reagiert besonders empfindlich auf ein Missverhältnis von pro- und antioxidativen Systemen. Die Hippokampusregion ist die Gehirnregion mit der ausgeprägtesten Expression des Cytochrom P 450 2E1, das bei der Verstoffwechslung von Ethanol eine wichtige Rolle spielt <sup>141</sup>. Ein Mechanismus der Radikalbildung scheint die Induktion des Cytochrom P450 2E1 durch Ethanol zu sein. Die Bedeutung dieses Cytochrom bei der ethanolvermittelten Toxizität wurde unter anderem von Wu et al. gezeigt <sup>142</sup>.

Erhöhte Spiegel von Proteincarbonylen als Maß für die oxidative Schädigung einer Zelle wurden von Ernst et al. in Oligodendrozyten durch die Einwirkung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nachgewiesen <sup>143</sup>. Nach Belastung mit Ethanol wurden insbesondere in

Lebergewebe erhöhte Konzentrationen an Proteincarbonylen bestimmt <sup>144</sup>. Einen deutlichen Anstieg des Malondialdehyds konnten Gutierrez-Ruiz et al. für die hepatische Zelllinie HepG2 nach 24 und mehr Stunden bei einer Ethanolkonzentration von 50 mM zeigen <sup>145</sup>. Hier führte also eine wesentlich geringere Ethanolkonzentration bereits zu TBA-RS-Erhöhungen. Eine mögliche Erklärung hierfür liefert die Enzymausstattung der Gewebe. So ist die Konzentration an Cytochrom P450 2E1 in Ratten nach Studien von Tindberg et al. in der Leber etwa 1000fach höher als in neuronalen Geweben <sup>141</sup>. Cytochrom P450 2E1 wird durch Ethanol induziert und ist maßgeblich am Prozess der Lipidperoxidation beteiligt. Aber auch in extrahepatischen Geweben wurden durch experimentelle Studien vornehmlich an Ratten signifikant erhöhte Konzentrationen an Malondialdehyd nachgewiesen, hierzu zählen insbesondere auch das Nervensystem der Ratte <sup>16</sup>. Eventuell spielen hier auch Unterschiede in der Auswirkung von Ethanol auf das Nervensystem verschiedener Spezies eine Rolle. Eine weitere Erklärung der diskrepanten Befunde liegt möglicherweise auch in der verwendeten Bestimmungsmethode. Geringe Veränderungen an TBA-RS werden aufgrund der eingeschränkten Sensitivität der Messung nicht zuverlässig erfasst <sup>146</sup>.

Eine Reihe von Studien anderer Arbeitsgruppen konnte ebenfalls die protektive Wirkung von antioxidativen Substanzen auf neuronale Zellen gegenüber einer ethanolvermittelten Schädigung belegen <sup>147, 148</sup>. So konnten Mitchell et al. bereits 1999 zeigen, dass Vitamin E eine protektive Wirkung auf hippokampale Zellen gegenüber Ethanol hat <sup>149</sup>. Lamarche et al. zeigten, dass der Zusatz von 10 µM Vitamin E bei einer Belastung mit Ethanol in einer Konzentration von 20 mM die Vitalität neuronaler Zellen von Ratten *in vitro* signifikant verbessert <sup>132</sup>. Sanchez-Moreno et al. beschrieben den protektiven Effekt von Vitamin C auf humane Astrozyten gegenüber einer ethanolvermittelten Schädigung *in vitro* <sup>150</sup>. Heaton et al. gelang es, diese Ergebnisse auf ein tierexperimentelles Modell zu übertragen und zeigten eine protektive Wirkung von Vitamin E auf Purkinjezellen von Ratten unter Ethanolbelastung *in vivo* <sup>140</sup>. Es ist bekannt, dass Vitamin C und Vitamin E an der Reduktion von Lipidperoxidation beteiligt ist.

Masalkar et al. zeigten in klinischen Studien die Bedeutung von oxidativem Stress bei hepatischer Schädigung durch Alkohol. Patienten mit schwerer alkoholischer Lebererkrankung wiesen erhöhte Serumkonzentrationen von Malondialdehyd auf,

während Vitamin C und Vitamin E in verminderten Konzentrationen im Serum gemessen wurden <sup>104</sup>.

### 4.3 Zytotoxische Effekte von Amphetaminderivaten

Auch die Ergebnisse der Vitalitätsmessung der hippokampalen Zellen unter Belastung mit den untersuchten Amphetaminderivaten zeigen Parallelen zur aktuellen Literatur. Zytotoxische Effekte von halluzinogenen Amphetaminen sind bislang insbesondere in hepatischen und neuronalen Zellen nachgewiesen worden. So konnten Nakagawa et al. eine dosis- und zeitabhängige Zellschädigung von Leberzellen der Ratte durch Amphetaminderivate zeigen <sup>151</sup>. Montiel-Duarte et al. beschrieben die Apoptose von hepatischen Zellen der Ratte unter Belastung mit MDMA in Kultur <sup>152</sup>. Capela et al. zeigten in ihrer Arbeit von 2006 eine dosis- und temperaturabhängige Schädigung corticaler Neuronen der Ratte unter MDMA und insbesondere auch dessen Metaboliten <sup>153</sup>.

Bei der Untersuchung des Pathomechanismus der amphetaminvermittelten Zellschädigung wurde ein Großteil der Studien mit MDMA durchgeführt. 1987 fanden Steranka et al. Hinweise, dass bei der amphetaminvermittelten Toxizität die Generation freier Radikaler eine wichtige Rolle spielt <sup>154</sup>. Diese Hypothese wurde 1997 für MDMA von Colado et al. belegt <sup>155</sup>. Die Arbeitsgruppe wies durch Messung von Salizylsäurederivaten in tierexperimentellen Studien an Ratten die Existenz freier Radikaler nach Belastung mit MDMA nach. Diese Studie gilt als erster echter Beweis für den Einfluss von oxidativem Stress durch MDMA. In einer weiteren Arbeit konnten Carvalho et al. 2002 das Auftreten von freien Radikalen durch Belastung hepatischer Zellen der Ratte mit MDMA zeigen <sup>156</sup>. Auch eine Reihe tierexperimenteller Studien an Mäusen zeigte die Bedeutung von oxidativem Stress bei der amphetaminvermittelten Toxizität. So konnten beispielsweise Camarero et al. mittels Mikrodialyse im Striatum von Mäusen vermehrt Sauerstoffradikale nach mehrmaliger Gabe von MDMA nachweisen <sup>157</sup>. Jayanthi et al. belegten für die Kupfer/Zink-Superoxid-Dismutase – einem antioxidativen Enzym – mittels transgener Mäuse das Entstehen reaktiver Sauerstoffspezies durch MDMA <sup>158</sup>.

Durch Verwendung antioxidativer Substanzen konnten toxische Effekte halluzinogener Amphetaminderivate *in vitro* reduziert werden. So zeigten Carvalho et



al. eine protektive Wirkung von Vitamin C und N-Acetylcystein auf die Zellvitalität von hepatischen Zellen der Ratte unter Belastung mit MDMA<sup>105</sup>. Capela et al. erreichten einen vergleichbaren Effekt für N-Acetylcystein und PBN bei der Belastung von corticalen Zellen der Ratte mit MDMA<sup>153</sup>. Bei der erstgenannten Studie werden die toxischen Effekte von MDMA durch die antioxidativen Substanzen sogar vollständig aufgehoben. Damit fällt das Ergebnis deutlicher aus, als in der vorliegenden Arbeit, wo die Verbesserung der Vitalität maximal 25 % beträgt. Eine Erklärung hierfür dürfte wiederum in der unterschiedlichen Enzymausstattung von hepatischem und neuronalem Gewebe liegen.

#### **4.4 Kombinationsbelastung von Ethanol und MDMA**

Ecstasy wird selten isoliert konsumiert. Am häufigsten ist die Kombination mit alkoholischen Getränken<sup>76, 159</sup>. Dies liegt wohl daran, dass Alkohol weit verbreitet, nicht teuer und legal erhältlich ist. Zudem führt Alkohol zur Verstärkung der gewünschten entaktogenen Wirkung von Ecstasy und zur Abschwächung unangenehmer Nebenwirkungen der Amphetaminderivate, wie die anhaltende Unruhe und Reizbarkeit im Anschluss an die Akutwirkung<sup>160</sup>. Es ist bekannt, dass Konsumenten von Ecstasy zu zügellosem Alkoholkonsum neigen<sup>161</sup>.

Insbesondere der Mischkonsum von Ecstasy und Alkohol kann zu schwerwiegenden Komplikationen führen, ist mit einer hohen Letalität assoziiert und daher von großem medizinischem Interesse<sup>162</sup>. Mittlerweile konnte durch eine Reihe von Studien gezeigt werden, dass es beim Mischkonsum zur Wechselwirkung von MDMA und Ethanol kommt<sup>163-165</sup>. Beide Substanzen werden größtenteils in der Leber metabolisiert und konkurrieren dabei um gemeinsame Stoffwechselwege, insbesondere das Cytochrom P450 Enzymsystem<sup>49</sup>. Zudem kann durch Ethanol die Expression und Aktivität wichtiger Schlüsselenzyme des MDMA-Metabolismus verändert werden<sup>166</sup>. Sowohl bei der Metabolisierung von Ethanol als auch von MDMA entstehen reaktive Sauerstoffspezies<sup>167, 113</sup>. Hierdurch wird der Redoxstatus der Zelle empfindlich gestört. So konnte unter anderem gezeigt werden, dass GSH in Zellen unter Belastung mit MDMA vermehrt zu GSSG oxidiert wird<sup>59</sup>. Dieser Effekt wird durch eine verminderte GSH-Synthese verstärkt, wie sie bei Belastung mit Ethanol auftritt<sup>168</sup>. Upreti et al. konnten kürzlich zeigen, dass bei der Ratte die

Aktivität der hepatischen Alkoholdehydrogenase 2, einem Schlüsselenzym des Alkoholmetabolismus, durch MDMA inhibiert wird und so, bei gleichzeitiger Belastung mit Ethanol, ein Anstieg des toxischen Acetaldehyd verursacht wird<sup>169</sup>. Ein weiterer Aspekt der MDMA-induzierten Toxizität ist die Hyperthermie, ein Effekt, der ebenfalls durch Ethanol verstärkt werden kann<sup>170</sup>. Zudem konnte gezeigt werden, dass bei gleichzeitiger Einnahme von Ethanol die Konzentration von MDMA im Zentralnervensystem von Mäusen und Ratten deutlich erhöht ist<sup>171</sup>. Dieses Erkenntnis legt die Vermutung nahe, dass der Transport von MDMA in das Gehirn unter Einfluss von Ethanol vereinfacht ist, oder der Abbau von MDMA im Gehirn durch Ethanol gehemmt wird.

In der einzigen Arbeit zur kombinierten Belastung mit Ethanol und MDMA in der Zellkultur zeigten Pontes et al. synergistische Effekte der untersuchten Substanzen im Bezug auf Vitalität und Redox-Status von hepatischen Zellen der Ratte *in vitro*<sup>170</sup>. Da im Zentralnervensystem die gleichen Enzymsysteme vorhanden sind – wenn auch in geringerer Konzentration –, ist zu vermuten, dass bei der Neurotoxizität ähnliche Pathomechanismen zugrunde liegen. In einer ersten Studie zur kombinierten Belastung mit Ethanol und MDMA im Tiermodell von Cassel et al. aus dem Jahre 2005 wurde eine stärkere Beeinträchtigung des Serotoninsystems im Vergleich zur isolierten Belastung beschrieben<sup>172</sup>.

Die Einordnung der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zur kombinierten Belastung der hippokampalen Zellen mit Ethanol und MDMA in die aktuelle Fachliteratur ist aufgrund fehlender Zellkultur-Studien zu diesem Thema nicht einfach. Die gezeigte zusätzliche Abnahme der Vitalität unter kombinierter Belastung bestätigt die synergistischen neurotoxischen Effekte auch in der Zellkultur. In der vorliegenden Arbeit wird erstmals eine Abschwächung der toxischen Wirkung einer kombinierten Belastung mit Ethanol und MDMA durch Zusatz antioxidativer Substanzen belegt.

#### **4.5 Limitationen der Arbeit**

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit liefern Erkenntnisse über den Pathomechanismus der Neurotoxizität von Ethanol und halluzinogenen Amphetaminen. Inwieweit die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit allerdings auf den Menschen übertragbar sind, bleibt Gegenstand aktueller Forschungsprojekte.

Die Experimente wurden an HT22 Zellen durchgeführt. Hierbei handelt es sich nicht um Zellen einer Primärkultur aus Gewebsbiopsien, sondern um Zellen einer etablierten Zelllinie. HT22 Zellen sind ein Subklon von HT4 Zellen, der aus der Hippokampusregion der Maus gewonnen und mittels SV40 Antigen immortalisiert wurde <sup>114, 120</sup>. Diese Zelllinie ist bereits mehrfach für die Untersuchung oxidativer Schädigungsmechanismen auf Nervengewebe verwendet worden <sup>118, 173-175</sup>.

Die Verwendung einer Zelllinie als Zellquelle ist wegen der nahezu unbegrenzten Verfügbarkeit der Zellen und der Vermeidung einer Mischkultur mit anderen Zellarten für Zellkulturstudien von großem Vorteil, kann aber nur modellhafte Funktionen erfüllen. Die Erkenntnisse sind aufgrund der genetischen Veränderung der neuronalen Zellen kritisch zu bewerten. Insbesondere durch die Transfektion der Zellen mit dem T-Antigen von SV40 und die bereits langjährige Subkultivierung der Zellen kann nicht mit Sicherheit davon ausgegangen werden, dass durch die Zelllinie die Zellphysiologie nativer Nervenzellen reflektiert wird. Es ist fraglich, inwieweit mit genetischen Veränderungen auch Veränderungen der funktionellen Eigenschaften der Zellen auftreten <sup>175</sup>. Aufgrund der beschriebenen begrenzten Aussagemöglichkeiten kann diese Arbeit an HT22 Zellen nur als theoretisches Modell für die Belastung des ZNS mit Ethanol und Amphetaminen dienen. Um in der Zukunft für klinische Fragestellungen verwertbare Aussagen treffen zu können, sind in der Folge Arbeiten an Primärkulturen, mittelfristig auch tierexperimentelle Studien notwendig.

Arbeiten in der Zellkultur bilden die erste Stufe in einer langen Reihe von Experimenten und lassen sich keinesfalls auf Geschehnisse unter physiologischen Bedingungen übertragen. So stellt die Wahl der einzusetzenden Konzentration an Belastungssubstanzen in der Zellkultur ein Problem dar. Nach einer Studie von Chu et al. ist im Rattenmodell die zerebrale Konzentration von MDMA und MDA höher als die Plasmakonzentration dieser Substanzen <sup>176</sup>. Hier scheint eine Umverteilung stattzufinden, die unter Zellkulturbedingungen nicht zu simulieren ist. Auch die Kobelastung von Ethanol und Amphetaminderivaten stellt nur eine Simulation der physiologischen Gegebenheiten auf zellulärer Ebene dar. In neuroanatomischen Studien konnten allerdings die neurotoxischen Effekte von Ethanol und MDMA im Tierversuch bestätigt werden. Hier zeigte sich ein Untergang neuronaler Zellen nach Exposition mit den untersuchten Substanzen <sup>177, 178</sup>. Auch konnte in Studien gezeigt

werden, dass antioxidative Substanzen neurotoxische Effekte von MDMA im Tierversuch abmildern bzw. verhindern<sup>101</sup>.

Ein weiteres Thema aktueller Diskussionen ist die Frage, ob in den untersuchten Tiermodellen die Pathomechanismen der Neurotoxizität von MDMA für den Menschen adäquat abgebildet sind<sup>179, 180</sup>. So ist bekannt, dass sich das Wirkprofil von MDMA auf Rattenzellen deutlich von dem auf Mäusezellen unterscheidet, wobei weit weniger Studienergebnisse über Mäusezellen vorliegen<sup>181, 182</sup>. So führt die Belastung mit MDMA in der Ratte zu Schäden am serotonergen System<sup>59</sup>. In murinen Zellen zeigten sich im Gegensatz dazu kaum Auswirkungen auf das serotonerge System, hier kam es zu einer akuten Beeinflussung des dopaminergen Systems durch Belastung mit MDMA<sup>49</sup>. Eine Vielzahl von tierexperimentellen Studien an Mäusen belegen nach ein- oder mehrmaliger Gabe von MDMA sowohl akute als auch langfristige Störungen im dopaminergen System. Trotzdem liegt das Augenmerk noch immer auf dem serotonergen System als dem hauptsächlich durch MDMA geschädigten System<sup>62</sup>. Auch Arbeiten an Primaten zeigen vornehmlich eine Störung des serotonergen Systems durch halluzinogene Amphetamine ohne Wirkung auf das dopaminerge System<sup>183, 184</sup>. Bei humanen Konsumenten von Amphetaminderivaten konnten mittels moderner Nachweismethoden wie Positron- und Single-Photon-Emissionstomographie (PET und SPECT) *in vivo* Veränderungen im Serotoninsystem nachgewiesen werden. Buchert et al. zeigten eine verminderte Verfügbarkeit des Serotonintransporters SERT bei Probanden mit einem ausgeprägten Ecstasy-Konsum<sup>185</sup>.

Die niedrigste MDMA-Dosis, die im Tierversuch langfristig neurotoxische Effekte zeigte (10 mg/Kg/d über 4 Tage)<sup>183</sup>, liegt deutlich über der üblichen Dosis beim typischen humanen Konsumenten (2 x 75 – 125 mg/Woche)<sup>186</sup>. Auch wenn durch mathematische Modelle eine Vergleichbarkeit der verwendeten MDMA-Dosis bei unterschiedlichen Spezies ermöglicht wird, ist davon auszugehen, dass wohl nur Konsumenten mit ausgeprägtem Konsumverhalten die Dosis aus den Tierversuchen erreichen<sup>179</sup>. Zudem unterscheiden sich die Applikationswege (subcutan bzw. intraperitoneal im Tierversuch gegenüber oral beim Menschen), was im Tierversuch wiederum zu deutlich höheren Plasmakonzentrationen führt<sup>187</sup>.

Wenngleich bislang ein überzeugender Beweis neurotoxischer Effekte durch halluzinogene Amphetaminderivate beim Menschen fehlt, ist der Nachweis im Tierversuch unstrittig. Ungeachtet der offenen Fragen zur Übertragbarkeit der

Studienergebnisse auf den Menschen sind diese Erkenntnisse alarmierend. Die Ergebnisse der vorliegenden Experimente an Zellen einer hippokampalen Zelllinie liefern Einblicke über den Mechanismus der Schädigung neuronaler Gewebe auf zellulärer Ebene.

#### 4.6 Mögliche klinische Bedeutung und Ausblick

Die akute Intoxikation mit Ecstasy, meist in Verbindung mit Alkohol, geht häufig mit schweren neurologischen Symptomen einher, kann zu lebensgefährlichen Krankheitsbildern führen und ist mit einer hohen Letalität assoziiert<sup>82</sup>. Die Therapie derart intoxikierter Patienten ist eine medizinische Herausforderung. Ein spezifisches Antidot, das die Wirkung halluzinogener Amphetaminderivate effektiv antagonisiert, ist aktuell nicht verfügbar. So erfolgt die Behandlung einer Ecstasy-Intoxikation im wesentlichen symptomorientiert. Im Vordergrund steht hierbei die Therapie potentiell vital gefährdender Zustände, wie beispielsweise dem Hyperthermie-Syndrom, das mit einer Rhabdomyolyse einhergehen kann, oder einem Symptomenkomplex, der an ein Serotonin-Syndrom oder ein malignes neuroleptisches Syndrom erinnert. Die medikamentöse Therapie mit Dantrolen<sup>®</sup>, einem Muskelrelaxanz, das die Kalziumfreisetzung am sarkoplasmatischen Retikulum hemmt, und bei der malignen Hyperthermie im Rahmen eines malignen neuroleptischen Syndroms indiziert ist, wird in der Literatur unterschiedlich gewertet<sup>188-191</sup>.

Mit der Anwendung von antioxidativen Substanzen gäbe es einen weiteren therapeutischen Ansatz, der in tierexperimentellen und Zellkulturstudien, wie auch in der vorliegenden Arbeit, vielversprechende Ergebnisse zur Reduktion der neurotoxischen und hepatotoxischen Wirkung von MDMA zeigt. Zur Therapie neurodegenerativer bzw. neuroinflammatorischer Erkrankungen, wie beispielsweise Morbus Alzheimer oder Multipler Sklerose werden antioxidative Substanzen bereits erfolgreich eingesetzt. Bei diesen Erkrankungen stellt, wie einleitend dargestellt, ebenfalls oxidativer Stress einen wesentlichen Pathomechanismus dar<sup>192-194</sup>. Berichte über den therapeutischen Einsatz von Antioxidantien bei Patienten mit akuter Ecstasy-Intoxikation oder chronischem Missbrauch liegen derzeit allerdings noch nicht vor. So existieren auch keine Empfehlungen zum Einsatz antioxidativer Substanzen bei der Therapie der akuten Ecstasy-Intoxikation, wie sie beispielsweise

für die Behandlung der Paracetamol-Intoxikation etabliert ist <sup>195</sup>. Hier bewirkt die Behandlung mit N-Acetylcystein eine Regeneration von hepatischem GSH und führt so unter anderem zur Reduktion von oxidativem Stress, der durch toxische Metabolite des Paracetamol entsteht <sup>196</sup>.

Das Verständnis der komplexen Schädigungsmechanismen von MDMA und anderen halluzinogenen Amphetaminen, insbesondere in Kombination mit Ethanol, ist von entscheidender Bedeutung für die Entwicklung neuer Therapien der akuten Ecstasy-Intoxikation und der Folgen des chronischen Konsums. Hierzu kann die vorliegende Arbeit wertvolle Erkenntnisse beisteuern. Die Ergebnisse sollten in weiteren Studien zur Neurotoxizität von halluzinogenen Amphetaminen und Ethanol bestätigt werden. Zudem sind Studien erforderlich, in denen die protektiven Effekte antioxidativer Substanzen weiter untersucht werden. Wünschenswert wäre außerdem die Untersuchung anderer zellulärer Schädigungsmuster (z. Bsp. Apoptose, Genexpression) sowie die Übertragung dieser Ergebnisse auf ein geeignetes Tiermodell, um schließlich vielleicht sogar ein klinisches Studienprogramm an Patienten umzusetzen.

## 5 Schlussfolgerung

Somit sind abschließend die in der Einleitung gestellten Fragen wie folgt zu beantworten:

1. Ethanol hat einen deutlichen zytotoxischen Effekt auf HT22 Zellen. Es kommt zur vermehrten Anfallen reaktiver Sauerstoffspezies. Das Auftreten von oxidativem Stress führt zu Zellvitalitätsverlusten der HT22 Neurone. Die Zugabe antioxidativer Substanzen verbessert die oxidative Situation der Zelle. Hierdurch können auch positive Wirkungen auf die Zellvitalität erzielt werden.
2. Auch die Belastung mit MDMA, MDA bzw. MDE bewirkt Zellvitalitätsverluste der Zelllinie HT22. Es sind vermehrt zelluläre Oxidationsprodukte nachweisbar, wobei Lipidperoxidationsprodukte eine ansteigende Tendenz ohne signifikante Veränderungen zeigen. Der oxidative Stress ist mitverantwortlich für die Zellvitalitätsverluste nach Belastung mit den genannten Amphetaminderivaten. Durch Zusatz antioxidativer Substanzen kann die Bildung zellulärer Oxidationsprodukte vermindert werden. Dies beeinflusst die Zellvitalität positiv.
3. Die Kombinationsbelastung mit Ethanol und MDMA führt zu stärkeren Vitalitätsverlusten, wobei diese nicht der Summe aus Ethanol- und MDMA-Toxizität entspricht. Der Zusatz antioxidativer Substanzen führt auch hier zu einem Anstieg der Zellzahl. Dieser Anstieg fällt allerdings geringer als in der Einzelbelastung aus.

Zukünftige Studien werden zeigen, welchen Stellenwert diese Erkenntnisse bei der Entwicklung einer Therapie der Ecstasy- sowie Mischintoxikation mit Alkohol haben.

## 6 Referenzen

1. Westermeyer, J., (1989): Cross-cultural studies on alcoholism. In Goedde, H. W. and Agarwal, D. P. [Hrsg]: *Alcoholism: Biomedical and genetic aspects.*, 1. Auflage, Pergamon Press, New York, NY. Seite 305 - 311.
2. Liappas, J. A., Lascaratos, J., Fafouti, S., and Christodoulou, G. N., (2003): Alexander the Great's relationship with alcohol. *Addiction*, 98(5): Seite 561-7.
3. DHS (2009): *Jahrbuch Sucht. Deutsche Hauptstelle für Suchtfragen e. V., Hamm*
4. Pabst, A. and Kraus, L., (2008): Alkoholkonsum, alkoholbezogene Störungen und Trends. *Ergebnisse des Epidemiologischen Suchtsurveys 2006. Sucht*, 54(Sonderheft 1): Seite 36-46.
5. John, U. and Hanke, M., (2003): Tobacco- and alcohol-attributable mortality and years of potential life lost in Germany. *Eur J Public Health*, 13(3): Seite 275-7.
6. Konnopka, A. and König, H. H., (2007): Direct and indirect costs attributable to alcohol consumption in Germany. *Pharmacoeconomics*, 25(7): Seite 605-18.
7. Grant, B. F. and Dawson, D. A., (1996): Alcohol and drug use, abuse, and dependence among welfare recipients. *Am J Public Health*, 86(10): Seite 1450-4.
8. BZGA (2004): *Drogenaffinität Jugendlicher in der BRD 2004. Bundeszentrale für gesundheitliche Aufklärung, Berlin*
9. Bundestag des Deutschen Volkes: *Jugendschutzgesetz (JuSchG) vom 23.07.2002 (zuletzt geändert durch Art. 3 Abs. 1 G v. 31.10.2008); Abschnitt 2, Jugendschutz in der Öffentlichkeit; § 9 Alkoholische Getränke; Abs. 1 Nr. 2.*
10. Löffler, G., (1998): Stoffwechsel der Kohlenhydrate. In Löffler, G. and Petrides, P. E. [Hrsg]: *Biochemie und Pathobiochemie*, 6. Auflage, Springer Verlag, Berlin. Seite 377-423.
11. Lieber, C. S., (2005): Metabolism of alcohol. *Clin Liver Dis*, 9(1): Seite 1-35.
12. Koop, D. R. and Tierney, D. J., (1990): Multiple mechanisms in the regulation of ethanol-inducible cytochrome P450IIE1. *Bioessays*, 12(9): Seite 429-35.
13. Lieber, C. S., (2004): The discovery of the microsomal ethanol oxidizing system and its physiologic and pathologic role. *Drug Metab Rev*, 36(3-4): Seite 511-29.
14. Thurman, R. G. and Handler, J. A., (1989): New perspectives in catalase-dependent ethanol metabolism. *Drug Metab Rev*, 20(2-4): Seite 679-88.
15. Petrides, P. E., (1998): Ernährung. In Löffler, G. and Petrides, P. E. [Hrsg]: *Biochemie und Pathobiochemie*, 6. Auflage, Springer Verlag, Berlin. Seite 707-728.
16. Nordmann, R., Ribiere, C., and Rouach, H., (1990): Ethanol-induced lipid peroxidation and oxidative stress in extrahepatic tissues. *Alcohol Alcohol*, 25(2-3): Seite 231-7.



17. Montoliu, C., Valles, S., Renau-Piqueras, J., and Guerri, C., (1994): Ethanol-induced oxygen radical formation and lipid peroxidation in rat brain: effect of chronic alcohol consumption. *J Neurochem*, 63(5): Seite 1855-62.
18. Nixon, K., (2006): Alcohol and adult neurogenesis: roles in neurodegeneration and recovery in chronic alcoholism. *Hippocampus*, 16(3): Seite 287-95.
19. Tupala, E. and Tiihonen, J., (2004): Dopamine and alcoholism: neurobiological basis of ethanol abuse. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 28(8): Seite 1221-47.
20. Vonghia, L., Leggio, L., Ferrulli, A., Bertini, M., Gasbarrini, G., and Addolorato, G., (2008): Acute alcohol intoxication. *Eur J Intern Med*, 19(8): Seite 561-7.
21. Schuckit, M. A., (2005): Alcohol and Alcoholism. In Kasper, D. L., Braunwald, E., Fauci, A. S., Hauser, S. L., Longo, D. L., and Jameson, J. L. [Hrsg]: *Harrison's Principles of Internal Medicine*, 16. Auflage, McGraw-Hill, New York. Seite 2562 - 2566.
22. Winstock, A. R., Griffiths, P., and Stewart, D., (2001): Drugs and the dance music scene: a survey of current drug use patterns among a sample of dance music enthusiasts in the UK. *Drug Alcohol Depend*, 64(1): Seite 9-17.
23. DHS (2005): *Jahrbuch Sucht*. Deutsche Hauptstelle für Suchtfragen e. V., Hamm
24. Drogenbeauftragte der Bundesregierung (2008): *Drogen- und Suchtbericht*. Bundesministerium für Gesundheit, Berlin
25. BKA (2007): *Polizeiliche Kriminalitätsstatistik 2007 - Bundesrepublik Deutschland*. Bundeskriminalamt, Wiesbaden
26. Hasler, R. (1998): *Rauschgiftlage 1997*. Deutsche Hauptstelle gegen die Suchtgefahren, Hamm
27. UNODC (2008): *2008 World Drug Report*. United Nations Office on Drugs and Crime, Vienna
28. Banken, J. A., (2004): Drug abuse trends among youth in the United States. *Ann N Y Acad Sci*, 1025: Seite 465-71.
29. Substance Abuse and Mental Health Services Administration (2008): *Results from the 2007 National Survey on Drug Use and Health: National findings (Office of Applied Studies, NSDUH Series H-34, DHHS Publications No. SMA 08-4343)*. Department of Health and Human Services, Rockville, MD
30. Johnston, L.D., O'Malley, P.M., Bachman, J.G. and Schulenberg, J.E. (2008): *Monitoring the Future national results on adolescent drug use: Overview of key findings, 2007 (NIH Publication No. 08-6418)*. National Institute on Drug Abuse, Bethesda, MD
31. EMCDDA (2008): *Amphetamine, Ecstasy and LSD*. European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction, Lisbon
32. Pfeiffer-Gerschel, T., Kipke, I., Lang, P., Spahlinger, P. and Bartsch, G. (2008): *Bericht zur Drogensituation in Deutschland 2007-2008*. Deutsche Beobachtungsstelle für Drogen und Drogensucht (DBDD), München
33. Kraus, L., Rösner, S., Baumeister, S. E., Pabst, A. and Steiner, S. (2008): *2006 Epidemiological Survey on Substance Abuse in Adolescents and Adults of Berlin*. IFT - Institut für Therapieforschung, München
34. Freudenmann, R. W., Oxler, F., and Bernschneider-Reif, S., (2006): The origin of MDMA (ecstasy) revisited: the true story reconstructed from the original documents. *Addiction*, 101(9): Seite 1241-5.

35. Pentney, A. R., (2001): An exploration of the history and controversies surrounding MDMA and MDA. *J Psychoactive Drugs*, 33(3): Seite 213-21.
36. Firma E. Merck in Darmstadt, (1912): Verfahren zur Darstellung von Alkyloxyaryl-, Dialkyloxyaryl- und Alkylendioxyarylamino- propanen bzw. deren am Stickstoff monoalkylierten Derivaten. Kaiserliches Patentamt des Deutschen Reiches: Patentschrift Nr. 274350.
37. Parrott, A. C., (2007): The psychotherapeutic potential of MDMA (3,4-methylenedioxy-methamphetamine): an evidence-based review. *Psychopharmacology (Berl)*, 191(2): Seite 181-93.
38. Molliver, M. E., Berger, U. V., Mamounas, L. A., Molliver, D. C., O'Hearn, E., and Wilson, M. A., (1990): Neurotoxicity of MDMA and related compounds: anatomic studies. *Ann N Y Acad Sci*, 600: Seite 649-61; discussion 661-4.
39. Green, A. R., Cross, A. J., and Goodwin, G. M., (1995): Review of the pharmacology and clinical pharmacology of 3,4-methylenedioxy-methamphetamine (MDMA or "Ecstasy"). *Psychopharmacology (Berl)*, 119(3): Seite 247-60.
40. Bundestag des Deutschen Volkes: Gesetz über den Verkehr mit Betäubungsmitteln (Betäubungsmittelgesetz BtmG) vom 28.07.1981 (zuletzt geändert durch Art. 1 und Art. 2 V. v. 18.02.2008); Anlage I (zu §1 Abs.1) - nicht verkehrsfähige Betäubungsmittel.
41. Check, E., (2004): Psychedelic drugs: the ups and downs of ecstasy. *Nature*, 429(6988): Seite 126-8.
42. Doblin, R., (2002): A clinical plan for MDMA (Ecstasy) in the treatment of posttraumatic stress disorder (PTSD): partnering with the FDA. *J Psychoactive Drugs*, 34(2): Seite 185-94.
43. Cole, J. C. and Sumnall, H. R., (2003): Altered states: the clinical effects of Ecstasy. *Pharmacol Ther*, 98(1): Seite 35-58.
44. Christophersen, A. S., (2000): Amphetamine designer drugs - an overview and epidemiology. *Toxicol Lett*, 112-113: Seite 127-31.
45. Gouzoulis-Mayfrank, E., Hermle, L., Kovar, K. A., and Sass, H., (1996): Entactogenic drugs "ecstasy" (MDMA), "eve" (MDE) and other ring-substituted methamphetamine derivatives. A new class of substances among illegal designer drugs? *Nervenarzt*, 67(5): Seite 369-80.
46. Felgenhauer, N. and Zilker, T., (1999): Poisoning with amphetamines and designer drugs. *Internist (Berl)*, 40(6): Seite 617-23.
47. Wichems, C. H., Hollingsworth, C. K., and Bennett, B. A., (1995): Release of serotonin induced by 3,4-methylenedioxy-methamphetamine (MDMA) and other substituted amphetamines in cultured fetal raphe neurons: further evidence for calcium-independent mechanisms of release. *Brain Res*, 695(1): Seite 10-8.
48. Gudelsky, G. A. and Yamamoto, B. K., (2008): Actions of 3,4-methylenedioxy-methamphetamine (MDMA) on cerebral dopaminergic, serotonergic and cholinergic neurons. *Pharmacol Biochem Behav*, 90(2): Seite 198-207.
49. Green, A. R., Mehan, A. O., Elliott, J. M., O'Shea, E., and Colado, M. I., (2003): The pharmacology and clinical pharmacology of 3,4-methylenedioxy-methamphetamine (MDMA, "ecstasy"). *Pharmacol Rev*, 55(3): Seite 463-508.

50. Iravani, M. M., Asari, D., Patel, J., Wieczorek, W. J., and Kruk, Z. L., (2000): Direct effects of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) on serotonin or dopamine release and uptake in the caudate putamen, nucleus accumbens, substantia nigra pars reticulata, and the dorsal raphe nucleus slices. *Synapse*, 36: Seite 275-85.
51. Morton, J., (2005): Ecstasy: pharmacology and neurotoxicity. *Curr Opin Pharmacol*, 5(1): Seite 79-86.
52. Schmidt, C. J., Levin, J. A., and Lovenberg, W., (1987): In vitro and in vivo neurochemical effects of methylenedioxymethamphetamine on striatal monoaminergic systems in the rat brain. *Biochem Pharmacol*, 36(5): Seite 747-55.
53. White, S. R., Obradovic, T., Imel, K. M., and Wheaton, M. J., (1996): The effects of methylenedioxymethamphetamine (MDMA, "Ecstasy") on monoaminergic neurotransmission in the central nervous system. *Prog Neurobiol*, 49(5): Seite 455-79.
54. Göthert, M., Bönisch, H., Schlicker, E., and Maier, W., (2004): Psychopharmaka - Pharmakotherapie psychischer Erkrankungen. In Forth, W., Henschler, D., and Rummel, W. [Hrsg]: *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*, 9. Auflage, Urban & Fischer, München, Jena. Seite 313-348.
55. McCann, U. D., Szabo, Z., Scheffel, U., Dannals, R. F., and Ricaurte, G. A., (1998): Positron emission tomographic evidence of toxic effect of MDMA ("Ecstasy") on brain serotonin neurons in human beings. *Lancet*, 352(9138): Seite 1433-7.
56. Ricaurte, G. A., Yuan, J., Hatzidimitriou, G., Cord, B. J., and McCann, U. D., (2002): Severe dopaminergic neurotoxicity in primates after a common recreational dose regimen of MDMA ("ecstasy"). *Science*, 297(5590): Seite 2260-3.
57. Green, A. R. and Goodwin, G. M., (1996): Ecstasy and neurodegeneration. *Bmj*, 312(7045): Seite 1493-4.
58. Henry, J. A., (1996): Ecstasy and serotonin depletion. *Lancet*, 347(9004): Seite 833.
59. Hiramatsu, M., Kumagai, Y., Unger, S. E., and Cho, A. K., (1990): Metabolism of methylenedioxymethamphetamine: formation of dihydroxymethamphetamine and a quinone identified as its glutathione adduct. *J Pharmacol Exp Ther*, 254(2): Seite 521-7.
60. Capela, J. P., Macedo, C., Branco, P. S., Ferreira, L. M., Lobo, A. M., Fernandes, E., Remiao, F., Bastos, M. L., Dirnagl, U., Meisel, A., and Carvalho, F., (2007): Neurotoxicity mechanisms of thioether ecstasy metabolites. *Neuroscience*, 146(4): Seite 1743-57.
61. Yamamoto, B. K. and Bankson, M. G., (2005): Amphetamine neurotoxicity: cause and consequence of oxidative stress. *Crit Rev Neurobiol*, 17(2): Seite 87-117.
62. Colado, M. I. and Green, A. R., (1995): The spin trap reagent alpha-phenyl-N-tert-butyl nitron prevents 'ecstasy'-induced neurodegeneration of 5-hydroxytryptamine neurones. *Eur J Pharmacol*, 280(3): Seite 343-6.
63. Colado, M. I., Camarero, J., Mechan, A. O., Sanchez, V., Esteban, B., Elliott, J. M., and Green, A. R., (2001): A study of the mechanisms involved in the

- neurotoxic action of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, 'ecstasy') on dopamine neurones in mouse brain. *Br J Pharmacol*, 134(8): Seite 1711-23.
64. Alves, E., Summavielle, T., Alves, C. J., Gomes-da-Silva, J., Barata, J. C., Fernandes, E., Bastos Mde, L., Tavares, M. A., and Carvalho, F., (2007): Monoamine oxidase-B mediates ecstasy-induced neurotoxic effects to adolescent rat brain mitochondria. *J Neurosci*, 27(38): Seite 10203-10.
  65. Mehan, A. O., Esteban, B., O'Shea, E., Elliott, J. M., Colado, M. I., and Green, A. R., (2002): The pharmacology of the acute hyperthermic response that follows administration of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, 'ecstasy') to rats. *Br J Pharmacol*, 135(1): Seite 170-80.
  66. Sugimoto, Y., Ohkura, M., Inoue, K., and Yamada, J., (2001): Involvement of serotonergic and dopaminergic mechanisms in hyperthermia induced by a serotonin-releasing drug, p-chloroamphetamine in mice. *Eur J Pharmacol*, 430(2-3): Seite 265-8.
  67. Burrows, K. B., Gudelsky, G., and Yamamoto, B. K., (2000): Rapid and transient inhibition of mitochondrial function following methamphetamine or 3,4-methylenedioxymethamphetamine administration. *Eur J Pharmacol*, 398(1): Seite 11-8.
  68. Orio, L., O'Shea, E., Sanchez, V., Pradillo, J. M., Escobedo, I., Camarero, J., Moro, M. A., Green, A. R., and Colado, M. I., (2004): 3,4-Methylenedioxymethamphetamine increases interleukin-1beta levels and activates microglia in rat brain: studies on the relationship with acute hyperthermia and 5-HT depletion. *J Neurochem*, 89(6): Seite 1445-53.
  69. Tucker, G. T., Lennard, M. S., Ellis, S. W., Woods, H. F., Cho, A. K., Lin, L. Y., Hiratsuka, A., Schmitz, D. A., and Chu, T. Y., (1994): The demethylenation of methylenedioxymethamphetamine ("ecstasy") by debrisoquine hydroxylase (CYP2D6). *Biochem Pharmacol*, 47(7): Seite 1151-6.
  70. de la Torre, R., Farre, M., Mathuna, B. O., Roset, P. N., Pizarro, N., Segura, M., Torrens, M., Ortuno, J., Pujadas, M., and Cami, J., (2005): MDMA (ecstasy) pharmacokinetics in a CYP2D6 poor metaboliser and in nine CYP2D6 extensive metabolisers. *Eur J Clin Pharmacol*, 61(7): Seite 551-4.
  71. Randall, T., (1992): Ecstasy-fueled 'rave' parties become dances of death for English youths. *Jama*, 268(12): Seite 1505-6.
  72. Nichols, D. E., (1986): Differences between the mechanism of action of MDMA, MBDB, and the classic hallucinogens. Identification of a new therapeutic class: entactogens. *J Psychoactive Drugs*, 18(4): Seite 305-13.
  73. Rittoo, D. B. and Rittoo, D., (1992): Complications of "ecstasy" misuse. *Lancet*, 340(8821): Seite 725-6.
  74. Henry, J. A., Jeffreys, K. J., and Dawling, S., (1992): Toxicity and deaths from 3,4-methylenedioxymethamphetamine ("ecstasy"). *Lancet*, 340(8816): Seite 384-7.
  75. Steele, T. D., McCann, U. D., and Ricaurte, G. A., (1994): 3,4-Methylenedioxymethamphetamine (MDMA, "Ecstasy"): pharmacology and toxicology in animals and humans. *Addiction*, 89(5): Seite 539-51.
  76. Liechti, M. E., Kunz, I., and Kupferschmidt, H., (2005): Acute medical problems due to Ecstasy use. Case-series of emergency department visits. *Swiss Med Wkly*, 135(43-44): Seite 652-7.

77. Williams, H., Dratcu, L., Taylor, R., Roberts, M., and Oyefeso, A., (1998): "Saturday night fever": ecstasy related problems in a London accident and emergency department. *J Accid Emerg Med*, 15(5): Seite 322-6.
78. Askew, B. M., (1962): Hyperpyrexia as a contributory factor in the toxicity of amphetamine to aggregated mice. *Bri Pharm Chemother*, 19: Seite 245-57.
79. Von Huben, S. N., Lay, C. C., Crean, R. D., Davis, S. A., Katner, S. N., and Taffe, M. A., (2007): Impact of ambient temperature on hyperthermia induced by (+/-)3,4-methylenedioxymethamphetamine in rhesus macaques. *Neuropsychopharmacology*, 32(3): Seite 673-81.
80. Karlsen, S. N., Spigset, O., and Slordal, L., (2008): The dark side of ecstasy: neuropsychiatric symptoms after exposure to 3,4-methylenedioxymethamphetamine. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 102(1): Seite 15-24.
81. Schifano, F., (2004): A bitter pill. Overview of ecstasy (MDMA, MDA) related fatalities. *Psychopharmacology (Berl)*, 173(3-4): Seite 242-8.
82. Dinse, H., (1997): Ecstasy (MDMA) intoxication. An overview. *Anaesthesist*, 46(8): Seite 697-703.
83. Henry, J. A., (1992): Ecstasy and the dance of death. *Bmj*, 305(6844): Seite 5-6.
84. de la Torre, R., Farre, M., Roset, P. N., Hernandez Lopez, C., Mas, M., Ortuno, J., Menoyo, E., Pizarro, N., Segura, J., and Cami, J., (2000): Pharmacology of MDMA in humans. *Ann N Y Acad Sci*, 914: Seite 225-37.
85. Löffler, G., (1998): Elektronentransport und oxidative Phosphorylierung. In Löffler, G. and Petrides, P. E. [Hrsg]: *Biochemie und Pathobiochemie*, 6. Auflage, Springer Verlag, Berlin. Seite 495-520.
86. Villeneuve, J. P. and Pichette, V., (2004): Cytochrome P450 and liver diseases. *Curr Drug Metab*, 5(3): Seite 273-82.
87. Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T., Mazur, M., and Telser, J., (2007): Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*, 39(1): Seite 44-84.
88. Droge, W., (2002): Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev*, 82(1): Seite 47-95.
89. Sies, H., (1991): Oxidative stress: from basic research to clinical application. *Am J Med*, 91(3C): Seite 31S-38S.
90. Giulivi, C. and Cadenas, E., (1998): The role of mitochondrial glutathione in DNA base oxidation. *Biochim Biophys Acta*, 1366(3): Seite 265-74.
91. Trounce, I., Byrne, E., and Marzuki, S., (1989): Decline in skeletal muscle mitochondrial respiratory chain function: possible factor in ageing. *Lancet*, 1(8639): Seite 637-9.
92. Nikolaus, T. and von Zglinicki, T., (2007): Alter und Altern. In Schmidt, R. F. and Lang, F. [Hrsg]: *Physiologie des Menschen*, 30. Auflage, Springer, Berlin. Seite 933-50.
93. Dean, R. T., Fu, S., Stocker, R., and Davies, M. J., (1997): Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochem J*, 324 ( Pt 1): Seite 1-18.
94. Levine, R. L., Garland, D., Oliver, C. N., Amici, A., Climent, I., Lenz, A. G., Ahn, B. W., Shaltiel, S., and Stadtman, E. R., (1990): Determination of

- carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol*, 186: Seite 464-78.
95. Grune, T., Reinheckel, T., and Davies, K. J., (1997): Degradation of oxidized proteins in mammalian cells. *Faseb J*, 11(7): Seite 526-34.
  96. Halliwell, B. and Gutteridge, J. M., (1984): Free radicals, lipid peroxidation, and cell damage. *Lancet*, 2(8411): Seite 1095.
  97. Grune, T. and Davies, K. J., (1997): Breakdown of oxidized proteins as a part of secondary antioxidant defenses in mammalian cells. *Biofactors*, 6(2): Seite 165-72.
  98. Hayes, J. D. and McLellan, L. I., (1999): Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a co-ordinately regulated defence against oxidative stress. *Free Radic Res*, 31(4): Seite 273-300.
  99. Packer, L., Roy, S., and Sen, C. K., (1997): Alpha-lipoic acid: a metabolic antioxidant and potential redox modulator of transcription. *Adv Pharmacol*, 38: Seite 79-101.
  100. Kagan, V. E., Serbinova, E. A., Forte, T., Scita, G., and Packer, L., (1992): Recycling of vitamin E in human low density lipoproteins. *J Lipid Res*, 33(3): Seite 385-97.
  101. Aguirre, N., Barrionuevo, M., Ramirez, M. J., Del Rio, J., and Lasheras, B., (1999): Alpha-lipoic acid prevents 3,4-methylenedioxy-methamphetamine (MDMA)-induced neurotoxicity. *Neuroreport*, 10(17): Seite 3675-80.
  102. Marangon, K., Devaraj, S., Tirosh, O., Packer, L., and Jialal, I., (1999): Comparison of the effect of alpha-lipoic acid and alpha-tocopherol supplementation on measures of oxidative stress. *Free Radic Biol Med*, 27(9-10): Seite 1114-21.
  103. Podda, M. and Grundmann-Kollmann, M., (2001): Low molecular weight antioxidants and their role in skin ageing. *Clin Exp Dermatol*, 26(7): Seite 578-82.
  104. Masalkar, P. D. and Abhang, S. A., (2005): Oxidative stress and antioxidant status in patients with alcoholic liver disease. *Clin Chim Acta*, 355(1-2): Seite 61-5.
  105. Carvalho, M., Remiao, F., Milhazes, N., Borges, F., Fernandes, E., Carvalho, F., and Bastos, M. L., (2004): The toxicity of N-methyl-alpha-methyldopamine to freshly isolated rat hepatocytes is prevented by ascorbic acid and N-acetylcysteine. *Toxicology*, 200(2-3): Seite 193-203.
  106. Ceconi, C., Curello, S., Cargnoni, A., Ferrari, R., Albertini, A., and Visioli, O., (1988): The role of glutathione status in the protection against ischaemic and reperfusion damage: effects of N-acetyl cysteine. *J Mol Cell Cardiol*, 20(1): Seite 5-13.
  107. Kelly, G. S., (1998): Clinical applications of N-acetylcysteine. *Altern Med Rev*, 3(2): Seite 114-27.
  108. Coyle, J. T. and Puttfarcken, P., (1993): Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. *Science*, 262(5134): Seite 689-95.
  109. Behl, C. and Holsboer, F., (1998): Oxidative stress in the pathogenesis of Alzheimer's disease and antioxidant neuroprotection. *Fortschr Neurol Psychiatr*, 66(3): Seite 113-21.
  110. Gonsette, R. E., (2008): Neurodegeneration in multiple sclerosis: the role of oxidative stress and excitotoxicity. *J Neurol Sci*, 274(1-2): Seite 48-53.

111. Ames, B. N., Shigenaga, M. K., and Hagen, T. M., (1993): Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90(17): Seite 7915-22.
112. Gilgun-Sherki, Y., Melamed, E., and Offen, D., (2001): Oxidative stress induced-neurodegenerative diseases: the need for antioxidants that penetrate the blood brain barrier. *Neuropharmacology*, 40(8): Seite 959-75.
113. Miranda, M., Bosch-Morell, F., Johnsen-Soriano, S., Barcia, J., Almansa, I., Asensio, S., Araiz, J., Messeguer, A., and Romero, F. J., (2007): Oxidative stress in rat retina and hippocampus after chronic MDMA ('ecstasy') administration. *Neurochem Res*, 32(7): Seite 1156-62.
114. Morimoto, B. H. and Koshland, D. E., Jr., (1990): Induction and expression of long- and short-term neurosecretory potentiation in a neural cell line. *Neuron*, 5(6): Seite 875-80.
115. Frederiksen, K., Jat, P. S., Valtz, N., Levy, D., and McKay, R., (1988): Immortalization of precursor cells from the mammalian CNS. *Neuron*, 1(6): Seite 439-48.
116. Khomenko, I. P., Bakhtina, L. Y., Zelenina, O. M., Kruglov, S. V., Manukhina, E. B., Bayda, L. A., and Malyshev, I. Y., (2007): Role of heat shock proteins HSP70 and HSP32 in the protective effect of adaptation of cultured HT22 hippocampal cells to oxidative stress. *Bull Exp Biol Med*, 144(2): Seite 174-7.
117. Teepker, M., Anthes, N., Fischer, S., Krieg, J. C., and Vedder, H., (2007): Effects of oxidative challenge and calcium on ATP-levels in neuronal cells. *Neurotoxicology*, 28(1): Seite 19-26.
118. Tan, S., Sagara, Y., Liu, Y., Maher, P., and Schubert, D., (1998): The regulation of reactive oxygen species production during programmed cell death. *J Cell Biol*, 141(6): Seite 1423-32.
119. Behl, C., Lezoualc'h, F., Trapp, T., Widmann, M., Skutella, T., and Holsboer, F., (1997): Glucocorticoids enhance oxidative stress-induced cell death in hippocampal neurons in vitro. *Endocrinology*, 138(1): Seite 101-6.
120. Davis, J. B. and Maher, P., (1994): Protein kinase C activation inhibits glutamate-induced cytotoxicity in a neuronal cell line. *Brain Res*, 652(1): Seite 169-73.
121. Clauwaert, K. M., Van Bocxlaer, J. F., and De Leenheer, A. P., (2001): Stability study of the designer drugs "MDA, MDMA and MDEA" in water, serum, whole blood, and urine under various storage temperatures. *Forensic Sci Int*, 124(1): Seite 36-42.
122. Stacey, A. and Doyle, A., (1997): Routine testing of cell cultures and their products for mycoplasma contaminations. In Pollard, J. W. and Walker, J. M. [Hrsg]: *Methods in Molecular Biology - Basic Cell Culture Protocols*, 2. Auflage, Humana Press, Totowa NJ. Seite 305 - 312.
123. Stumm, G., Schlegel, J., Schafer, T., Wurz, C., Mennel, H. D., Krieg, J. C., and Vedder, H., (1999): Amphetamines induce apoptosis and regulation of bcl-x splice variants in neocortical neurons. *Faseb J*, 13(9): Seite 1065-72.
124. Lindl, T., (2002): Methoden zur In-vitro-Toxizitätsprüfung. In Lindl, T. [Hrsg]: *Zell- und Gewebekultur*, 4. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg. Seite 210 - 218.
125. Beal, M. F., (2002): Oxidatively modified proteins in aging and disease. *Free Radic Biol Med*, 32(9): Seite 797-803.

126. Chevion, M., Berenshtein, E., and Stadtman, E. R., (2000): Human studies related to protein oxidation: protein carbonyl content as a marker of damage. *Free Radic Res*, 33 Suppl: Seite S99-108.
127. Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J., and Klenk, D. C., (1985): Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem*, 150(1): Seite 76-85.
128. Buss, H., Chan, T. P., Sluis, K. B., Domigan, N. M., and Winterbourn, C. C., (1997): Protein carbonyl measurement by a sensitive ELISA method. *Free Radic Biol Med*, 23(3): Seite 361-6.
129. Moore, K. and Roberts, L. J., 2nd, (1998): Measurement of lipid peroxidation. *Free Radic Res*, 28(6): Seite 659-71.
130. Wong, S. H., Knight, J. A., Hopfer, S. M., Zaharia, O., Leach, C. N., Jr., and Sunderman, F. W., Jr., (1987): Lipoperoxides in plasma as measured by liquid-chromatographic separation of malondialdehyde-thiobarbituric acid adduct. *Clin Chem*, 33(2 Pt 1): Seite 214-20.
131. Sommerburg, O., Grune, T., Klee, S., Ungemach, F. R., and Siems, W. G., (1993): Formation of 4-hydroxynonenal and further aldehydic mediators of inflammation during bromotrichloromethane treatment of rat liver cells. *Mediators Inflamm*, 2(1): Seite 27-31.
132. Lamarche, F., Signorini-Allibe, N., Gonthier, B., and Barret, L., (2004): Influence of vitamin E, sodium selenite, and astrocyte-conditioned medium on neuronal survival after chronic exposure to ethanol. *Alcohol*, 33(2): Seite 127-38.
133. Jia, Z., Zhu, H., Vitto, M. J., Misra, B. R., Li, Y., and Misra, H. P., (2009): Alpha-lipoic acid potently inhibits peroxynitrite-mediated DNA strand breakage and hydroxyl radical formation: implications for the neuroprotective effects of alpha-lipoic acid. *Mol Cell Biochem*, 323(1-2): Seite 131-8.
134. Vincent, A. M., Stevens, M. J., Backus, C., McLean, L. L., and Feldman, E. L., (2005): Cell culture modeling to test therapies against hyperglycemia-mediated oxidative stress and injury. *Antioxid Redox Signal*, 7(11-12): Seite 1494-506.
135. Barth, A., Barth, L., and Newell, D. W., (1996): Combination therapy with MK-801 and alpha-phenyl-tert-butyl-nitron enhances protection against ischemic neuronal damage in organotypic hippocampal slice cultures. *Exp Neurol*, 141(2): Seite 330-6.
136. Li, Y., Walker, D. W., and King, M. A., (2001): Peroxide mediates ethanol-induced cytotoxicity in PC12 cells. *Free Radic Biol Med*, 30(4): Seite 389-92.
137. Pirlich, M., Kiok, K., Sandig, G., Lochs, H., and Grune, T., (2002): Alpha-lipoic acid prevents ethanol-induced protein oxidation in mouse hippocampal HT22 cells. *Neurosci Lett*, 328(2): Seite 93-6.
138. Wu, D. and Cederbaum, A. I., (2003): Alcohol, oxidative stress, and free radical damage. *Alcohol Res Health*, 27(4): Seite 277-84.
139. Koch, O. R., Pani, G., Borrello, S., Colavitti, R., Cravero, A., Farre, S., and Galeotti, T., (2004): Oxidative stress and antioxidant defenses in ethanol-induced cell injury. *Mol Aspects Med*, 25(1-2): Seite 191-8.



140. Heaton, M. B., Mitchell, J. J., and Paiva, M., (2000): Amelioration of ethanol-induced neurotoxicity in the neonatal rat central nervous system by antioxidant therapy. *Alcohol Clin Exp Res*, 24(4): Seite 512-8.
141. Tindberg, N. and Ingelman-Sundberg, M., (1996): Expression, catalytic activity, and inducibility of cytochrome P450 2E1 (CYP2E1) in the rat central nervous system. *J Neurochem*, 67(5): Seite 2066-73.
142. Wu, D. and Cederbaum, A. I., (2005): Oxidative stress mediated toxicity exerted by ethanol-inducible CYP2E1. *Toxicol Appl Pharmacol*.
143. Ernst, A., Stolzing, A., Sandig, G., and Grune, T., (2004): Antioxidants effectively prevent oxidation-induced protein damage in OLN 93 cells. *Arch Biochem Biophys*, 421(1): Seite 54-60.
144. Rouach, H., Fataccioli, V., Gentil, M., French, S. W., Morimoto, M., and Nordmann, R., (1997): Effect of chronic ethanol feeding on lipid peroxidation and protein oxidation in relation to liver pathology. *Hepatology*, 25(2): Seite 351-5.
145. Gutierrez-Ruiz, M. C., Quiroz, S. C., Souza, V., Bucio, L., Hernandez, E., Olivares, I. P., Llorente, L., Vargas-Vorackova, F., and Kershenobich, D., (1999): Cytokines, growth factors, and oxidative stress in HepG2 cells treated with ethanol, acetaldehyde, and LPS. *Toxicology*, 134(2-3): Seite 197-207.
146. Weidauer, E., (2001): Der Einfluss von oxidativem Stress auf die antioxidativen Enzyme von Lungenzellen und Aspekte zum Mechanismus der Paraquattoxizität. in *Institut für Umwelttoxikologie*. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg: Halle-Wittenberg. Seite 99.
147. Muller, U. and Kriegelstein, J., (1995): Prolonged pretreatment with alpha-lipoic acid protects cultured neurons against hypoxic, glutamate-, or iron-induced injury. *J Cereb Blood Flow Metab*, 15(4): Seite 624-30.
148. Suresh, M. V., Menon, B., and Indira, M., (2000): Effects of exogenous vitamin C on ethanol toxicity in rats. *Indian J Physiol Pharmacol*, 44(4): Seite 401-10.
149. Mitchell, J. J., Paiva, M., and Heaton, M. B., (1999): The antioxidants vitamin E and beta-carotene protect against ethanol-induced neurotoxicity in embryonic rat hippocampal cultures. *Alcohol*, 17(2): Seite 163-8.
150. Sanchez-Moreno, C., Paniagua, M., Madrid, A., and Martin, A., (2003): Protective effect of vitamin C against the ethanol mediated toxic effects on human brain glial cells. *J Nutr Biochem*, 14(10): Seite 606-13.
151. Nakagawa, Y., Suzuki, T., Tayama, S., Ishii, H., and Ogata, A., (2009): Cytotoxic effects of 3,4-methylenedioxy-N-alkylamphetamines, MDMA and its analogues, on isolated rat hepatocytes. *Arch Toxicol*, 83(1): Seite 69-80.
152. Montiel-Duarte, C., Varela-Rey, M., Osés-Prieto, J. A., Lopez-Zabalza, M. J., Beitia, G., Cenarruzabeitia, E., and Iraburu, M. J., (2002): 3,4-Methylenedioxymethamphetamine ("Ecstasy") induces apoptosis of cultured rat liver cells. *Biochim Biophys Acta*, 1588(1): Seite 26-32.
153. Capela, J. P., Meisel, A., Abreu, A. R., Branco, P. S., Ferreira, L. M., Lobo, A. M., Remiao, F., Bastos, M. L., and Carvalho, F., (2006): Neurotoxicity of Ecstasy metabolites in rat cortical neurons, and influence of hyperthermia. *J Pharmacol Exp Ther*, 316(1): Seite 53-61.
154. Steranka, L. R. and Rhind, A. W., (1987): Effect of cysteine on the persistent depletion of brain monoamines by amphetamine, p-chloroamphetamine and MPTP. *Eur J Pharmacol*, 133(2): Seite 191-7.

155. Colado, M. I., O'Shea, E., Granados, R., Misra, A., Murray, T. K., and Green, A. R., (1997): A study of the neurotoxic effect of MDMA ('ecstasy') on 5-HT neurones in the brains of mothers and neonates following administration of the drug during pregnancy. *Br J Pharmacol*, 121(4): Seite 827-33.
156. Carvalho, M., Carvalho, F., Remiao, F., de Lourdes Pereira, M., Pires-das-Neves, R., and de Lourdes Bastos, M., (2002): Effect of 3,4-methylenedioxymethamphetamine ("ecstasy") on body temperature and liver antioxidant status in mice: influence of ambient temperature. *Arch Toxicol*, 76(3): Seite 166-72.
157. Camarero, J., Sanchez, V., O'Shea, E., Green, A. R., and Colado, M. I., (2002): Studies, using in vivo microdialysis, on the effect of the dopamine uptake inhibitor GBR 12909 on 3,4-methylenedioxymethamphetamine ('ecstasy')-induced dopamine release and free radical formation in the mouse striatum. *J Neurochem*, 81(5): Seite 961-72.
158. Jayanthi, S., Ladenheim, B., Andrews, A. M., and Cadet, J. L., (1999): Overexpression of human copper/zinc superoxide dismutase in transgenic mice attenuates oxidative stress caused by methylenedioxymethamphetamine (Ecstasy). *Neuroscience*, 91(4): Seite 1379-87.
159. Breen, C., Degenhardt, L., Kinner, S., Bruno, R., Jenkinson, R., Matthews, A., and Newman, J., (2006): Alcohol use and risk taking among regular ecstasy users. *Subst Use Misuse*, 41(8): Seite 1095-109.
160. Hernandez-Lopez, C., Farre, M., Roset, P. N., Menoyo, E., Pizarro, N., Ortuno, J., Torrens, M., Cami, J., and de La Torre, R., (2002): 3,4-Methylenedioxymethamphetamine (ecstasy) and alcohol interactions in humans: psychomotor performance, subjective effects, and pharmacokinetics. *J Pharmacol Exp Ther*, 300(1): Seite 236-44.
161. Boyd, C. J., McCabe, S. E., and d'Arcy, H., (2003): Ecstasy use among college undergraduates: gender, race and sexual identity. *J Subst Abuse Treat*, 24(3): Seite 209-15.
162. Schifano, F., Oyefeso, A., Corkery, J., Cobain, K., Jambert-Gray, R., Martinotti, G., and Ghodse, A. H., (2003): Death rates from ecstasy (MDMA, MDA) and polydrug use in England and Wales 1996-2002. *Hum Psychopharmacol*, 18(7): Seite 519-24.
163. Izco, M., Orio, L., O'Shea, E., and Colado, M. I., (2007): Binge ethanol administration enhances the MDMA-induced long-term 5-HT neurotoxicity in rat brain. *Psychopharmacology (Berl)*, 189(4): Seite 459-70.
164. Pontes, H., Duarte, J. A., de Pinho, P. G., Soares, M. E., Fernandes, E., Dinis-Oliveira, R. J., Sousa, C., Silva, R., Carmo, H., Casal, S., Remiao, F., Carvalho, F., and Bastos, M. L., (2008): Chronic exposure to ethanol exacerbates MDMA-induced hyperthermia and exposes liver to severe MDMA-induced toxicity in CD1 mice. *Toxicology*, 252(1-3): Seite 64-71.
165. Pacifici, R., Zuccaro, P., Hernandez Lopez, C., Pichini, S., Di Carlo, S., Farre, M., Roset, P. N., Ortuno, J., Segura, J., and Torre, R. L., (2001): Acute effects of 3,4-methylenedioxymethamphetamine alone and in combination with ethanol on the immune system in humans. *J Pharmacol Exp Ther*, 296(1): Seite 207-15.
166. Jang, G. R. and Harris, R. Z., (2007): Drug interactions involving ethanol and alcoholic beverages. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 3(5): Seite 719-31.

167. Das, S. K. and Vasudevan, D. M., (2007): Alcohol-induced oxidative stress. *Life Sci*, 81(3): Seite 177-87.
168. Pontes, H., Santos-Marques, M. J., Fernandes, E., Duarte, J. A., Remiao, F., Carvalho, F., and Bastos, M. L., (2008): Effect of chronic ethanol exposure on the hepatotoxicity of ecstasy in mice: an ex vivo study. *Toxicol In Vitro*, 22(4): Seite 910-20.
169. Upreti, V. V., Eddington, N. D., Moon, K. H., Song, B. J., and Lee, I. J., (2009): Drug interaction between ethanol and 3,4-methylenedioxymethamphetamine ("ecstasy"). *Toxicol Lett*, 188(2): Seite 167-72.
170. Pontes, H., Sousa, C., Silva, R., Fernandes, E., Carmo, H., Remiao, F., Carvalho, F., and Bastos, M. L., (2008): Synergistic toxicity of ethanol and MDMA towards primary cultured rat hepatocytes. *Toxicology*, 254(1-2): Seite 42-50.
171. Hamida, S. B., Tracqui, A., de Vasconcelos, A. P., Szwarc, E., Lazarus, C., Kelche, C., Jones, B. C., and Cassel, J. C., (2009): Ethanol increases the distribution of MDMA to the rat brain: possible implications in the ethanol-induced potentiation of the psychostimulant effects of MDMA. *Int J Neuropsychopharmacol*, 12(6): Seite 749-59.
172. Cassel, J. C., Riegert, C., Rutz, S., Koenig, J., Rothmaier, K., Cosquer, B., Lazarus, C., Birtheimer, A., Jeltsch, H., Jones, B. C., and Jackisch, R., (2005): Ethanol, 3,4-methylenedioxymethamphetamine (ecstasy) and their combination: long-term behavioral, neurochemical and neuropharmacological effects in the rat. *Neuropsychopharmacology*, 30(10): Seite 1870-82.
173. Zitzler, J., Link, D., Schafer, R., Liebetrau, W., Kazinski, M., Bonin-Debs, A., Behl, C., Buckel, P., and Brinkmann, U., (2004): High-throughput functional genomics identifies genes that ameliorate toxicity due to oxidative stress in neuronal HT-22 cells: GFPT2 protects cells against peroxide. *Mol Cell Proteomics*, 3(8): Seite 834-40.
174. Braun, S., Liebetrau, W., Berning, B., and Behl, C., (2000): Dexamethasone-enhanced sensitivity of mouse hippocampal HT22 cells for oxidative stress is associated with the suppression of nuclear factor-kappaB. *Neurosci Lett*, 295(3): Seite 101-4.
175. Tan, S., Wood, M., and Maher, P., (1998): Oxidative stress induces a form of programmed cell death with characteristics of both apoptosis and necrosis in neuronal cells. *J Neurochem*, 71(1): Seite 95-105.
176. Scheffel, U., Szabo, Z., Mathews, W. B., Finley, P. A., Dannals, R. F., Ravert, H. T., Szabo, K., Yuan, J., and Ricaurte, G. A., (1998): In vivo detection of short- and long-term MDMA neurotoxicity--a positron emission tomography study in the living baboon brain. *Synapse*, 29(2): Seite 183-92.
177. Fornai, F., Gesi, M., Lenzi, P., Ferrucci, M., Lazzeri, G., Pizzanelli, C., Pellegrini, A., Battaglia, G., Ruggieri, S., and Paparelli, A., (2004): Effects of repeated low doses of MDMA on EEG activity and fluoro-jade B histochemistry. *Ann N Y Acad Sci*, 1025: Seite 181-8.
178. Miki, T., Harris, S. J., Wilce, P. A., Takeuchi, Y., and Bedi, K. S., (2003): Effects of alcohol exposure during early life on neuron numbers in the rat hippocampus. I. Hilus neurons and granule cells. *Hippocampus*, 13(3): Seite 388-98.

179. Gouzoulis-Mayfrank, E. and Daumann, J., (2006): Neurotoxicity of methylenedioxyamphetamines (MDMA; ecstasy) in humans: how strong is the evidence for persistent brain damage? *Addiction*, 101(3): Seite 348-61.
180. Itzhak, Y. and Achat-Mendes, C., (2004): Methamphetamine and MDMA (ecstasy) neurotoxicity: 'of mice and men'. *IUBMB Life*, 56(5): Seite 249-55.
181. Stone, D. M., Hanson, G. R., and Gibb, J. W., (1987): Differences in the central serotonergic effects of methylenedioxymethamphetamine (MDMA) in mice and rats. *Neuropharmacology*, 26(11): Seite 1657-61.
182. Lyles, J. and Cadet, J. L., (2003): Methylenedioxymethamphetamine (MDMA, Ecstasy) neurotoxicity: cellular and molecular mechanisms. *Brain Res Brain Res Rev*, 42(2): Seite 155-68.
183. Ricaurte, G. A., Martello, A. L., Katz, J. L., and Martello, M. B., (1992): Lasting effects of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) on central serotonergic neurons in nonhuman primates: neurochemical observations. *J Pharmacol Exp Ther*, 261(2): Seite 616-22.
184. Insel, T. R., Battaglia, G., Johannessen, J. N., Marra, S., and De Souza, E. B., (1989): 3,4-Methylenedioxymethamphetamine ("ecstasy") selectively destroys brain serotonin terminals in rhesus monkeys. *J Pharmacol Exp Ther*, 249(3): Seite 713-20.
185. Buchert, R., Thomasius, R., Wilke, F., Petersen, K., Nebeling, B., Obrocki, J., Schulze, O., Schmidt, U., and Clausen, M., (2004): A voxel-based PET investigation of the long-term effects of "Ecstasy" consumption on brain serotonin transporters. *Am J Psychiatry*, 161(7): Seite 1181-9.
186. Cole, J. C., Bailey, M., Sumnall, H. R., Wagstaff, G. F., and King, L. A., (2002): The content of ecstasy tablets: implications for the study of their long-term effects. *Addiction*, 97(12): Seite 1531-6.
187. Mehan, A., Yuan, J., Hatzidimitriou, G., Irvine, R. J., McCann, U. D., and Ricaurte, G. A., (2006): Pharmacokinetic profile of single and repeated oral doses of MDMA in squirrel monkeys: relationship to lasting effects on brain serotonin neurons. *Neuropsychopharmacology*, 31(2): Seite 339-50.
188. Kunitz, O., Ince, A., Kuhlen, R., and Rossaint, R., (2003): [Hyperpyrexia and rhabdomyolysis after ecstasy (MDMA) intoxication]. *Anaesthesist*, 52(6): Seite 511-5.
189. Moon, J. and Cros, J., (2007): Role of dantrolene in the management of the acute toxic effects of Ecstasy (MDMA). *Br J Anaesth*, 99(1): Seite 146.
190. Duffy, M. R. and Ferguson, C., (2007): Role of dantrolene in treatment of heat stroke associated with Ecstasy ingestion. *Br J Anaesth*, 98(1): Seite 148-9.
191. Hall, A. P. and Henry, J. A., (2006): Acute toxic effects of 'Ecstasy' (MDMA) and related compounds: overview of pathophysiology and clinical management. *Br J Anaesth*, 96(6): Seite 678-85.
192. Gilgun-Sherki, Y., Melamed, E., and Offen, D., (2003): Antioxidant treatment in Alzheimer's disease: current state. *J Mol Neurosci*, 21(1): Seite 1-11.
193. Mirshafiey, A. and Mohsenzadegan, M., (2009): Antioxidant therapy in multiple sclerosis. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 31(1): Seite 13-29.
194. Salinthoné, S., Yadav, V., Bourdette, D. N., and Carr, D. W., (2008): Lipoic acid: a novel therapeutic approach for multiple sclerosis and other chronic inflammatory diseases of the CNS. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*, 8(2): Seite 132-42.

195. Heard, K. J., (2008): Acetylcysteine for acetaminophen poisoning. *N Engl J Med*, 359(3): Seite 285-92.
196. James, L. P., Mayeux, P. R., and Hinson, J. A., (2003): Acetaminophen-induced hepatotoxicity. *Drug Metab Dispos*, 31(12): Seite 1499-506.

## 7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Strukturformeln .....	17
Abbildung 2: Ecstasytabletten .....	17
Abbildung 3: Zellvitalität bei steigender Ethanolbelastung .....	48
Abbildung 4: Proteincarbonyle nach Ethanolbelastung .....	49
Abbildung 5: Malondialdehyd bei steigender Ethanolbelastung.....	50
Abbildung 6: Zellvitalität unter Antioxidantien .....	52
Abbildung 7: Zellvitalität unter $\alpha$ -Phenyl-N-butyl-Nitrone .....	53
Abbildung 8: Zellvitalität unter Liponsäure .....	54
Abbildung 9: Zellvitalität unter Ethanol und Liponsäure .....	56
Abbildung 10: Zellvitalität unter Ethanol und verschiedenen Antioxidantien.....	58
Abbildung 11: Proteincarbonyle unter Ethanol und Antioxidantien .....	59
Abbildung 12: Malondialdehyd unter Ethanol und Antioxidantien .....	61
Abbildung 13: Zellvitalität unter MDMA (A), MDA (B) bzw. MDE (C) .....	63
Abbildung 14: Proteincarbonyle unter MDMA (A), MDA (B) bzw. MDE (C) .....	65
Abbildung 15: Malondialdehyd unter MDMA (A), MDA (B) bzw. MDE (C).....	67
Abbildung 16: Zellvitalität unter MDMA (A), MDA (B) bzw. MDE (C) und Liponsäure	69
Abbildung 17: Zellvitalität unter MDMA (A), MDA (B) bzw. MDE (C) und Vitamin C.	71
Abbildung 18: Zellvitalität unter MDMA (A), MDA (B) bzw. MDE (C) und N-Ac .....	73
Abbildung 19: Proteincarbonyle unter MDMA (A), MDA (B) bzw. MDE (C) und Antioxidantien .....	75
Abbildung 20: Malondialdehyd unter MDMA (A), MDA (B) bzw. MDE (C) und Antioxidantien .....	77
Abbildung 21: Zellvitalität bei Kombinationsbelastung mit Ethanol und MDMA .....	79
Abbildung 22: Zellvitalität unter Kombinationsbelastung und Antioxidantien .....	81

## **8 Anhang**

### **Lebenslauf**

Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.





## Publikation

Abstract:

Neurosci Lett. 2002 Aug 9;328(2):93-6

### **Alpha-lipoic acid prevents ethanol-induced protein oxidation in mouse hippocampal HT22 cells.**

Pirlich M, Kiok K, Sandig G, Lochs H, Grune T

Department of Gastroenterology and Hepatology, University Hospital Charité, Humboldt-University Berlin, Schumannstr. 20/21, 10098, Berlin, Germany.

Oxidative stress is involved in a number of neurological disorders, including the neurotoxic effects of ethanol. Recent studies have described a neuroprotective potential of alpha-lipoic acid (LC) in several models of neuronal cell death related to oxidative stress. We tested the hypothesis that LC could be effective in preventing ethanol-induced neurotoxicity employing the clonal hippocampal cell line HT22. A 24 h incubation with ethanol 100-600 mM caused a dose-dependent loss of cell viability and a significant increase of the overall intracellular protein oxidation. Coincubation with LC 0.1 mM resulted in a significant decrease of ethanol-related neurotoxicity and a complete prevention of the ethanol-induced intracellular protein oxidation. These results indicate that the radical scavenging properties of LC are effective to ameliorate ethanol-induced neurotoxicity.

## **Erklärung**

Ich, Karoline Kiok, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema „Oxidativer Stress als Mechanismus der Neurotoxizität durch Ethanol und halluzinogene Amphetamine“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

19. Dezember 2009

Karoline Kiok

## **Danksagung**

Diese Arbeit ist mit der Unterstützung vieler Menschen entstanden, bei denen ich mich auf diesem Wege aufrichtig bedanken möchte.

Insbesondere Prof. Dr. Matthias Pirlich, meinem Doktorvater und Betreuer, gilt mein herzlichster Dank. Du hast mir immer Mut gemacht und mich mit gutem Rat und viel Motivation unterstützt.

Natürlich gilt dieser Dank auch Prof. Dr. Tilman Grune, der mich für die Arbeit an der Zellkultur begeisterte und mein Interesse an diesem Thema weckte.

Bei der Arbeit in der Zellkultur habe ich sehr von den Labormitarbeitern und deren Erfahrung profitiert. Vielen Dank für viele gute Ideen und Ratschläge.

Besonders wichtig ist mir an dieser Stelle der Dank an meine phantastische Familie und Dr. Clemens Fritsche. Diese Arbeit ist für Euch.