

**Entwicklung eines Systems zur Untersuchung der biologischen
Aktivität atmosphärischer Gase *in vitro***

Vom Fachbereich Chemie der Universität Hannover

zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften
Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation
von

Dipl. Chem. Detlef Ritter
geboren am 26.09.1969 in Hannover
2000

Referent: Prof. Dr. J. Alves

Koreferentin: Prof. Dr. M. Aufderheide

Tag der Promotion: 02.02.2000

Inhalt

1 EINLEITUNG	1
1.1 Aspekte toxikologischer Untersuchungen <i>in vitro</i>	1
1.1.1 Zielsetzung.....	5
1.2 Das Modell „oxidativer Streß“	6
1.2.1 Zielsetzung.....	10
1.3 Exposition von eukaryontischen Zellen gegen atmosphärische Gase.....	11
1.3.1 Theoretischer Ansatz.....	11
1.3.2 Etablierte Konzepte.....	15
1.3.3 Zielsetzung.....	21
1.4 Strategie und Gliederung der Arbeit.....	23
2 MATERIAL UND METHODEN	25
2.1 Zellkultur	25
2.1.1 Allgemeine Kulturbedingungen und Materialien.....	25
2.1.2 Verwendete Zellsysteme.....	25
2.1.3 Kulturbedingungen	27
2.2 Zellexpositionen.....	30
2.2.1 Expositionen gegen Modellgase nach gängigem air/liquid-Konzept	30
2.2.2 Expositionen gegen <i>tert.</i> -Butylhydroperoxid und Wasserstoffperoxid	32
2.2.3 Expositionen gegen Zigarettenrauchkondensat.....	33
2.2.4 Expositionen gegen Gase im neu entwickelten Expositionsaufbau	33
2.3 Analyse biochemischer Endpunkte	36
2.3.1 Reagenzien, Materialien und Geräte allgemeiner Verwendung	36
2.3.2 Durchführung der Analytik.....	37
2.4 Auswertung.....	47

3	ERGEBNISSE	49
3.1	Gasexpositionen nach dem gängigen air/liquid-Konzept	49
3.1.1	Expositionen gegen Reinluft	50
3.1.2	Exposition gegen Methylmethacrylat (MMA)	51
3.1.3	Expositionen gegen Stickstoffdioxid	52
3.1.4	Expositionen gegen Ozon	53
3.1.5	Expositionen gegen PAN (Peroxyacetyl-nitrat)	54
3.1.6	Exposition gegen Kohlenwasserstoff-Gemische.....	55
3.1.7	Abschätzung der Reproduzierbarkeit	56
3.1.8	Zusammenfassung.....	56
3.2	Zellkultur.....	58
3.2.1	Wachstumsverhalten unter proliferativen Bedingungen	59
3.2.2	Proliferative und nicht-proliferative Kulturführung im Vergleich	60
3.2.3	Einführung einer verlängerten proliferativen Vorkultur.....	61
3.2.4	Einführung einer Vorkultur mit Selenzusatz	63
3.2.5	Kultivierung mit Hepes-Zusatz, Zellsystem HFBE	64
3.2.6	Zusammenfassung.....	65
3.3	Etablierung analytischer Methoden.....	67
3.3.1	Messung des DNA-Gehaltes in adhärenenten Zellkulturaussaaten	68
3.3.2	Messung von Enzymaktivitäten des zellulären Energiestoffwechsels: Phosphofruktokinase, Enolase, Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase.....	71
3.3.3	Messung der Katalase-Aktivität.....	73
3.3.4	Messung der Aktivität der Glutathion-S-Transferasen.....	74
3.3.5	Messung der Glutathion-Reduktase-Aktivität	75
3.3.6	Messung der Glutathion-Peroxidase-Aktivität.....	75
3.3.7	Messung der Superoxid-Dismutase-Aktivität	78
3.3.8	Messung von Lipidperoxidationsprodukten	81
3.3.9	Messung von Glutathion	82
3.3.10	Messung von Adenosinphosphaten	88
3.3.11	Zusammenfassung.....	93
3.4	Expositionen gegen <i>tert.</i> -Butylhydroperoxid und Wasserstoffperoxid.....	95
3.4.1	Screening - Erarbeitung eines Behandlungsmodelles	95
3.4.2	Submerse Expositionen gegen tBuOOH und Wasserstoffperoxid	99
3.4.3	Zusammenfassung.....	105
3.5	Exposition gegen Zigarettenrauchkondensat.....	107
3.5.1	Screening und Behandlungsschema.....	107
3.5.2	Expositionen gegen Kondensat der Zigarette K1R4F	108
3.5.3	Zusammenfassung.....	115
3.6	Entwicklung eines Expositionsaufbaues zur Gasexposition <i>in vitro</i>	116
3.6.1	Strategie und Erfordernisse.....	116
3.6.2	Entwicklung des Gesamtaufbaus	117
3.6.3	Entwicklung eines Expositionsapparat-Oberteiles	118
3.6.4	Neuentwicklung eines Expositionsapparat-Unterteiles	126
3.6.5	Gesamtansicht des neu entwickelten Expositionsgerätes	128
3.6.6	Zusammenfassung.....	129
3.7	Expositionen gegen Modellgase im neu entwickelten Aufbau	130
3.7.1	Expositionen ohne Gasfluß: submers, air/liquid	131
3.7.2	Exposition mit Gasfluß: synthetische Luft.....	136
3.7.3	Exposition mit Gasfluß: Ozon	139
3.7.4	Expositionen mit Gasfluß: Stickstoffdioxid.....	144
3.7.5	Zusammenfassung.....	147

4 DISKUSSION.....	149
4.1 Das biologische Indikatorsystem.....	149
4.1.1 Auswahl des Zellsystems.....	149
4.1.2 Das Zellkultursystem humaner Lungenfibroblasten Lk004.....	151
4.1.3 Analytische Assays.....	156
4.1.4 Expositionen gegen Modellsubstanzen.....	162
4.1.5 Schlußfolgerung zum biologischen Indikatorsystem.....	175
4.2 Expositionen gegen atmosphärische Gase <i>in vitro</i>	177
4.2.1 Entwicklung eines Expositionsaufbaues zur Gasexposition <i>in vitro</i>	178
4.2.2 Expositionen gegen synthetische Luft <i>in vitro</i>	182
4.2.3 Expositionen gegen Ozon und Stickstoffdioxid.....	185
4.2.4 Zugänglichkeit der Untersuchung komplexer atmosphärischer Gasmischungen.....	192
4.2.5 Expositionen gegen atmosphärische Gase <i>in vitro</i> : Schlußfolgerung.....	193
5 SCHLUßFOLGERUNGEN UND AUSBLICK	195
6 ZUSAMMENFASSUNG	199
6.1.1 Stichworte.....	201
7 ABSTRACT.....	203
7.1.1 Keywords.....	204
8 ANHANG	205
8.1 Literatur.....	205
8.2 Aus der Arbeit hervorgegangene eigene Veröffentlichungen.....	215
8.3 Abkürzungen.....	217
8.4 Danksagung.....	219
8.5 Lebenslauf.....	221

1 Einleitung

1.1 Aspekte toxikologischer Untersuchungen *in vitro*

Die Durchführung toxikologischer Untersuchungen *in vitro* ist methodisch und thematisch in drei Teilbereiche zu gliedern:

- das biologische System
- die Exposition
- die Analyse des biologischen Systems nach der Exposition

Die Arbeit mit *in vitro*-kultivierten Geweben geht auf Entwicklungen zurück, die bereits Anfang dieses Jahrhunderts mit Untersuchungen an Nervengewebe des Frosches begannen (Harrison, 1907). 1922 wurden von Ebeling erstmals Epithelzellen kultiviert und ein Jahr später von Warburg wesentliche Arbeiten zur Studie der Zellphysiologie unter Verwendung von Gewebeschnitten durchgeführt (Zurlo *et al.*, 1994). Mittlerweile stehen Methoden zur Realisierung sehr unterschiedlicher biologischer Systeme zur Verfügung, die in die folgenden Gruppen eingeteilt werden können.

Die *Organkultur* ist eine dreidimensionale Form des Kultursystems. Ihr Vorteil liegt in der Erhaltung der strukturellen Integrität des Zellverbundes (Resau *et al.*, 1991). Da dieses System aber nur aus Frischmaterial gewonnen werden kann, zeigt es große Schwankungen, die durch individuelle Unterschiede von Spender zu Spender und Variationen in der Aufarbeitung bedingt sind. Gleichzeitig ist die Vitalität von Organkulturen zeitlich sehr begrenzt. Die Verwendung von Gewebeschnitten (tissue slices) stellt eine Weiterentwicklung dar, die durch eine Erhöhung der Probenanzahl aus einem einzigen Explantat das Problem der Reproduzierbarkeit unter Erhaltung eines gewissen Maßes an Gewebeorganisation und Zellkontakten zu lösen versucht (Bach *et al.*, 1996; Parrish *et al.*, 1995). In der *organotypischen Kultur* hingegen wird der Zusammenhang verschiedener Gewebebestandteile aus differenzierten Einzelzellen verschiedenen Typs rekonstruiert, wodurch individuelle Unterschiede von Spender-zu-Spender vermieden werden und so eine höhere Reproduzierbarkeit erreicht wird. Das Organ Haut ist ein Beispiel für eine Anwendung, für die sowohl Organkulturen als auch organotypische Kulturen realisiert wurden (Detmar *et al.*, 1993; Varani, 1998).

Die Verwendung von *Primärzellkulturen* beinhaltet die Kultivierung von Einzelzellen aus Frischmaterial nach der Auflösung des Gewebezusammenhanges. Sie gewährleistet somit die Erhaltung einiger Funktionen der differenzierten Zelle. Jedoch stellt sich wie bei Organkulturen auch hier das Problem einer hohen Streuung durch Variationen der Aufarbeitung und der biologischen Voraussetzungen des Spenders. Zudem kann schon nach kurzer Kulturdauer von 24 - 48 Stunden eine Dedifferenzierung einsetzen (MacDonald *et al.*, 1994).

Demgegenüber weist die Verwendung von *Zelllinien* Vorteile auf. Es steht eine große Anzahl verschiedener, unter unterschiedlichen Aspekten charakterisierter organ- und speziesspezifischer Zelllinien zur Verfügung (Hornhardt *et al.*, 1996). Viele Zelllinien können durch eine Kryokonservierung in großer Menge bevorratet und daher mit hoher Reproduzierbarkeit in zahlreichen unabhängigen Experimenten eingesetzt werden. Zu unterscheiden sind hier immortale Zelllinien und solche mit begrenzter Lebensdauer. Eine Immortalisierung ist entweder durch die Verwendung von Zellen aus humanem Krebsgewebe, von Nagetierzellen oder durch die Transformation von Zelllinien mit Onkogenen wie Polyoma- oder SV40-Viren erreicht worden (MacDonald *et al.*, 1994). Während mortale Zelllinien eine begrenzte Lebensdauer von etwa 10 bis 20 Passagen haben, können immortalisierte Zelllinien für nahezu unbegrenzte Zeit in Kultur gehalten werden. Die Aussagekraft derartiger biologischer Indikatorsysteme steht jedoch in der Diskussion, da bei diesen Zellen neben dem Verlust von Gewebeverbund und Differenzierung durch die Transformation wesentliche Kontrollmechanismen verloren gegangen sind. Ein Beispiel für den Verlust von Zelleigenschaften in Kultur, die bei der Bearbeitung der Frage nach der Eignung von Primärkulturen und Zelllinien häufig diskutiert wird, ist das Cytochrom-P-450-System. Diese enzymatischen Aktivitäten sind bei der Metabolisierung von Xenobiotika von großer Bedeutung. Sie sind in Primärzellkulturen für eine gewisse Kulturdauer vorhanden, gehen aber danach verloren (Paine, 1990). Die meisten Zelllinien zeigen gar keine Aktivitäten dieser Enzymsysteme. Zur Überwindung dieser Limitierung kann eine Inkubation mit einem aufgearbeiteten Leber-Homogenat (S9 Mix) durchgeführt werden (Balls *et al.*, 1992; Fry *et al.*, 1990). Ein anderer Lösungsansatz besteht darin, Zelllinien genetisch zu verändern und dadurch zur Expression der Cytochrom-P450-Aktivitäten zu befähigen (Crespi *et al.*, 1993; Doehmer, 1993; Sawada *et al.*, 1998).

Die Verwendung *subzellulärer Fraktionen* wie Mikrosomen, Mitochondrien, des Nukleus oder Lysosomen schränkt das biologische System so stark ein, daß nur noch sehr spezielle Fragestellungen damit untersucht werden können.

Niedere Organismen wie Evertebraten, Pflanzen, Pilze, Bakterien und Viren finden ebenfalls Verwendung als biologische Testsysteme. Der Ames Test ist ein Beispiel für einen weit verbreiteten und vom Gesetzgeber anerkannten Gentoxizitätstest unter Nutzung von Bakterienstämmen *Salmonella typhimurium* (Ames *et al.*, 1973; Ames *et al.*, 1975).

In Anbetracht der verschiedenen Möglichkeiten hinsichtlich des Einsatzes eines biologischen Systems ist die Auswahl desselben für eine toxikologische Untersuchung von zentraler Bedeutung. Unter den Gesichtspunkten Spezies- und Organrelevanz, Wirkort der zu untersuchenden Substanz unter Berücksichtigung der Toxikokinetik, auszuwählender Endpunkte und der Art der Untersuchung - exemplarische Einzeluntersuchung oder Routine-Testung einer großen Anzahl von Substanzen - muß hier die für die Beantwortung der Fragestellung relevante Lösung gefunden werden.

Die Exposition eines biologischen Systems gegen eine Testsubstanz wird durch zwei Gesichtspunkte bestimmt. Einerseits muß das biologische Testsystem mit der zu untersuchenden Substanz an einer möglichst großen, beschreibbaren Grenzfläche in Kontakt gebracht werden. Die Substanz selbst sollte dabei nicht oder nur in charakterisierbarer, definierter Weise in ihren chemisch/physikalischen Eigenschaften verändert werden. Andererseits darf das biologische Testsystem durch den eigentlichen Expositionsvorgang nicht geschädigt werden.

Der Aspekt der Exposition als wesentlicher Bestandteil einer toxikologischen Untersuchung wird häufig nicht mit der gleichen Aufmerksamkeit bedacht wie die beiden anderen Gesichtspunkte. So findet man in Übersichtsartikeln zum Thema (Balls *et al.*, 1992; Zucco *et al.*, 1998; Zurlo *et al.*, 1994) häufig die intensive Diskussion von Zellsystem und Endpunkten unter Auslassung des genannten Aspektes. Dies ist sicherlich darin begründet, daß im Mittelpunkt der meisten toxikologischen Untersuchungen *in vitro* wasserlösliche Substanzen stehen, die nach Lösung im Kulturmedium den üblicherweise submers, also flüssigkeitsüberschichtet kultivierten Zellen appliziert werden. Wasserunlösliche Substanzen können gegebenenfalls auch durch ein Detergens in Lösung gebracht werden. Doch auch hier müssen die oben genannten Gesichtspunkte wie die Frage nach der Wechselwirkung der zu untersuchenden Substanz mit Kulturmediumkomponenten - insbesondere bei Verwendung von Serum im Kulturmedium - und die Wirkung des eingesetzten Detergens auf das biologische System berücksichtigt werden.

Die Untersuchung von Substanzen in der Gasphase ist nur in speziellen Expositionssystemen zu realisieren, die einen unmittelbaren Kontakt derselben mit dem biologischen System gewährleisten. Die Frage nach den Eigenschaften des Expositionsvorganges ist hier eine wesentliche Komponente toxikologischer Studien. Die Erzeugung einer möglichst großen und definierten Grenzfläche zwischen Testsubstanz (Gas) und Testsystem (Zelle) unter Vitalitätserhalt des biologischen Systems ist die dabei zu erfüllende Bedingung für eine erfolgreiche Untersuchung. Detaillierte Ausführungen hierzu werden im Kapitel 1.3 der Einleitung vorgestellt.

Die Analyse des exponierten biologischen Systems dient der Charakterisierung der substanzinduzierten Effekte. Sie wird bestimmt durch die Zielrichtung der toxikologischen Untersuchung, die sich für den Bereich der Zelltoxizität in unterschiedliche Strategien aufteilen läßt (Ekwall, 1983).

Im Verlauf biochemischer Untersuchungen zu grundlegenden Fragen der Zellphysiologie werden seit Jahrzehnten sehr detaillierte mechanistische Untersuchungen wie z. B. Proteincharakterisierungen oder Genexpressionsstudien *in vitro* durchgeführt. Die dort verwendeten Methoden beinhalten zum Teil aufwendige Aufarbeitungen und Analysen. In Anlehnung an derartige experimentelle Strategien finden auch toxikologische Untersuchungen unter Verwendung differenzierter Zellsysteme zu organspezifischer Wirkung statt. Die Aufwendigkeit von Analyse- und Zellkultur-Methoden gestattet jedoch nur eine eingeschränkte Eignung für Screening-Untersuchungen (Ekwall, 1980). Es ist eine Strategie, die hauptsächlich für pharmakotoxikologische Fragestellungen von Interesse ist.

Eine andere Zielrichtung toxikologischer *in vitro*-Untersuchungen ist auf die Vorhersage der akuten Toxizität in tierexperimentellen Studien fokussiert (Halle, 1998). Es werden Screeningverfahren mit wenig aufwendigen Methoden zur Untersuchung einer großen Anzahl von Substanzen durchgeführt. Die Kultivierung, Exposition und Analyse von eukaryontischen Zellen z. B. in Mikrotiterplatten (Hasspieler *et al.*, 1996) gestattet dabei die Untersuchung einer großen Anzahl von Substanzen oder Konzentrationen bei geringem Kosten- und Zeitaufwand mit hoher Reproduzierbarkeit. Untersuchungsgegenstand ist dabei die toxikologische Wirkung der untersuchten Substanz auf grundlegende Zellfunktionen. Daher werden dort vorwiegend unspezifische Vitalitätsmarker wie Veränderungen der Zellzahl, des DNA-Gehaltes, der Trypan-Blau-Aufnahme und ähnliche analysiert (Clemedson *et al.*, 1996; Halle, 1998; Zucco *et al.*, 1998). Die wesentliche Fragestellung ist hier eher die Detektion des Zelltods und die Ermittlung einer dem LD50 Wert entsprechenden Klassifizierung als eine mechanistische Untersuchung.

Zwischen diesen beiden Extrema in der experimentellen Ausrichtung liegen Arbeiten, die durch die Kombination eines reproduzierbaren Zellsystems mit angepaßten analytischen Methoden für die Analyse spezifischer Endpunkte zu Screening-Verfahren geeignete Anwendungen darstellen, welche detailliertere Aussagen zu machen vermögen. So läßt die Untersuchung des zellulären ATP- und Glutathion-Gehaltes (Galli *et al.*, 1993) oder der Aktivität glykolytischer Enzyme (Andres *et al.*, 1996) allein zwar noch keine vollständige Interpretation der mechanistischen Wirkung einer Substanz zu, doch trifft sie eine Aussage in Verknüpfung mit einer definierten zellulären Funktion.

In Studien zu biologischen Effekten von Gasen wurden verschiedene Strategien angewandt. Es wurden sowohl sehr spezielle Wirkungen wie Untersuchungen zu Wachstumsfaktoren auf mRNA-Ebene (Lang *et al.*, 1998) oder zu Hitzeschock-Proteinen auf Protein-Ebene (Cardile *et al.*, 1995) als auch eher allgemeine Toxizitätsuntersuchungen wie die Untersuchung eines Tetrazoliumsalzumsatzes (Tarkington *et al.*, 1994) durchgeführt. Bisher veröffentlichte Arbeiten zu Untersuchungen von Gasen *in vitro* beschränken sich zumeist auf einfache Modellgasverdünnungen von Ozon, Stickstoffdioxid oder Schwefeldioxid. Gründe hierfür liegen einerseits in den Anforderungen an die Prüfbarkeit von Gasen, die es erschweren, direkt Proben aus der Umwelt zu nehmen (vgl. Kapitel 1.3). Andererseits stellt die Herstellung komplexer

Modellgasmischungen wie die Simulation von Photo-Smog oder die Untersuchung der photochemischen Alterung von Einzelsubstanzen (Shiraishi *et al.*, 1986) erhebliche Ansprüche an den experimentellen Aufbau. Einen Ansatz, derartige Schwierigkeiten zu überwinden, stellt z. B. die *in vitro*-Untersuchung der Metabolisierung flüchtiger organischer Substanzen der Umgebungsatmosphäre mit S9-Mixen aus Rattenleber dar (Mortensen *et al.*, 1998). Allerdings sind solche biologische Testsysteme eher in die Gruppe der subzellulären Fraktionen einzuordnen und können daher nicht mit der Exposition eukaryontischer Zellen *in vitro* verglichen werden.

1.1.1 Zielsetzung

Es soll ein biologisches Prüfsystem für atmosphärische Gase *in vitro* unter Berücksichtigung der drei folgenden Teilaspekte entwickelt werden.

Als biologisches Testsystem soll ein humanes, nicht-immortalisiertes Zellkultursystem der Lunge ausgewählt werden. Das Zellsystem soll in Mikrotiterplatten ebenso verwendbar sein wie zu einem späteren Zeitpunkt in Kulturgefäßen, die zur Exposition gegen Gase genutzt werden. Es soll eine nicht-proliferative Kultivierung ohne Serum erreicht werden. Der Serumentzug soll gleichzeitig dazu dienen, Wechselwirkungen mit Prüfsubstanzen zu unterbinden. Es soll gewährleistet sein, daß das Zellsystem trotz dieser Kulturbedingungen möglichst geringe Vitalitätseinbußen erleidet.

Es soll ein experimenteller Aufbau entwickelt werden, der eine Exposition von kultivierten Zellen gegen atmosphärische Gase *in vitro* erlaubt.

Es soll ein Reaktionsmodell ausgewählt werden, vor dessen Hintergrund die Analyse des Zellsystems nach dem Expositionsvorgang durchgeführt werden kann. Die dabei untersuchten Endpunkte sollen einerseits in Screening-Verfahren gemessen werden können, andererseits aber auch in einem engen mechanistischen Zusammenhang zueinander stehen. Sie sollen eine Relevanz für die biologische Wirkung von atmosphärischen Gasen haben.

1.2 Das Modell „oxidativer Streß“

Typische Wirkzusammenhänge aus dem Modell „oxidativer Streß“ werden diskutiert, in Zusammenhang mit dem Eintreten und der Manifestation vieler pathologischer und toxikologischer Phänomene zu stehen. Unter den Krankheiten, die hier zu nennen sind, stehen so schwerwiegende und weitverbreitete wie Herz-, Kreislauf- und Gefäß-erkrankungen (Chakraborti *et al.*, 1998), Diabetes (Baynes *et al.*, 1999), die Alzheimer Krankheit (Retz *et al.*, 1998), die Parkinsonsche Krankheit (Jenner *et al.*, 1998) sowie die Krebsentstehung (Klaunig *et al.*, 1998) und der Alterungsprozeß (Lenaz, 1998).

Das zentrale Ereignis in dem Wirkmodell ist die Verringerung des zellulären Reduktions-Oxidationsverhältnisses unter dem Einfluß eines metabolischen Druckes oder einer Substanz. Es kommt zum Abbau zellulärer Reduktionsäquivalente und bei weiterer Persistenz der Situation zu oxidativen Folgeschäden.

Derartige Situationen können durch verschiedene exo- oder endogene Faktoren eingeleitet werden.

Exogene Agentien wie z. B. Sauerstoff, Ozon, Stickstoffdioxid oder auch Zigarettenrauch in seinen Komponenten werden von außen an die Zelle herangetragen und haben ein im chemischen Sinn hohes oxidatives Potential. Aus den Reaktionen dieser Stoffe mit Zellkompartimenten können reaktive Zwischenprodukte wie Singulett-Sauerstoff, Wasserstoffperoxid, Superoxid-Radikale und verschiedene andere entstehen (Gille *et al.*, 1989). Stoffe wie Paraquat hingegen katalysieren unter Abbau von zellulären Reduktionsäquivalenten die gleichzeitige Produktion von Oxidationsäquivalenten (Redox-Cycling, (Comporti, 1989)). Reagentien wie z. B. Peroxyacetyl-Nitrat, ein luftgetragener Schadstoff, der bei der photochemischen Alterung von Autoabgasen entsteht, bilden zu zellschädigende Substanzen (Mudd, 1966; Mudd *et al.*, 1969). Metallsalze von Übergangsmetallen katalysieren die Bildung von Radikalen nach dem Schema der Fenton-Reaktion (Stohs *et al.*, 1995).

Endogene Quellen für die Entstehung oxidativen Stresses können sowohl inter- als auch intrazellulärer Natur sein. Aktivierte Alveolarmakrophagen geben Transmittersubstanzen wie Stickstoffmonoxid an das umgebende Gewebe ab. Im Falle einer pathologischen

Situation wie z. B. der „Partikelüberladung“ (Morrow, 1994) kommt es zum Fehlen einer Inaktivierung der Makrophagen und einer ständigen Ausschüttung der Substanzen, die in dieser Form oxidierend und zellschädigend wirken. Im Intrazellulären Raum sind ebenfalls verschiedene Quellen für reaktive oxidative Agentien zu nennen (Janssen *et al.*, 1993). Beispiele sind die mitochondriale Atmungskette, der Cyclooxygenase-Weg und zelluläre Enzyme wie Cytochrome-P450, die Xanthin-Oxidase oder die NADPH-Oxidase, bei denen entweder als Neben- oder Hauptprodukte innerhalb biochemischer Zusammenhänge hochreaktive Stoffe wie Singulett-Sauerstoff, Hydroxylradikale oder das Superoxid-Radikal $O_2^{\bullet-}$ entstehen. So werden an der mitochondrialen Atmungskette beispielsweise ständig 2-5 % des veratmeten Sauerstoffs nicht zu Wasser, sondern durch Nebenreaktionen über $O_2^{\bullet-}$ zu Wasserstoffperoxid umgesetzt (Chance *et al.*, 1979).

Oxidierende Agentien oder Radikale können nach Abbau der zellulären Reduktionsäquivalente oder deren lokalem Unterschub bzw. Fehlen am Wirkort Reaktionen mit nahezu allen Zellbestandteilen eingehen.

Reaktives Zentrum der Lipidverbindungen für derartige Reaktionen sind vor allem Doppelbindungen. Mehrfach ungesättigte Fettsäuren reagieren in Radikalkettenreaktionen über die Bildung von Hydroperoxiden und Peroxysäuren zu verschiedenen Produkten wie Aldehyden und Epoxiden (Esterbauer *et al.*, 1991). Eines der meistuntersuchten Reaktionsprodukte ist Malondialdehyd (MDA). Einige der Reaktionsprodukte wirken selbst toxisch auf die Zelle, wie z. B. 4-Hydroxynonenal (4-HNE) (Benedetti *et al.*, 1980).

Doppelbindungen und ihre elektronenreichen und weichen Thiol- und Disulfidgruppen machen Proteine ebenfalls zu einem gut geeigneten Reaktionspartner für oxidierende Substanzen. Fragmentierungen, der Verlust definierter Sekundär- und Tertiärstrukturen und dadurch bedingte Funktionsverluste sind die Folge (Pacifci *et al.*, 1991).

Die Reaktionen von Nukleinsäuren mit reaktiven oxidierenden Spezies führen zu Basenmodifikationen in Form von Oxidationen, Alkylierungen und Arylierungen. Eines der am eingehendsten untersuchten Produkte derartiger Reaktionen ist das 8-Hydroxydesoxyguanosin (8-OHdG). Auch DNA-Strangbrüche wurden in diesem Zusammenhang nachgewiesen (Latour *et al.*, 1995).

Zum intrazellulären Schutz gegen diese Ereignisse stehen der Zelle verschiedene Mechanismen zur Verfügung. Es handelt sich sowohl um enzymatische Aktivitäten wie der Superoxid-Dismutase oder Katalase, als auch um Biomoleküle wie Albumin, Bilirubin, Vitamin C, Vitamin E, Harnsäure, Transferrin usw. Deren Funktion besteht in der Bildung energiearmer Reaktionsprodukte oder der Reaktion zu resonanzstabilisierten Radikalen.

Ein zentraler Bestandteil der zellulären Mechanismen zur Kontrolle der Auswirkungen oxidativen Stresses sind Reaktionen in mittel- oder unmittelbarem Zusammenhang mit dem Tripeptid Glutathion und dem Glutathion-Redox-Zyklus.

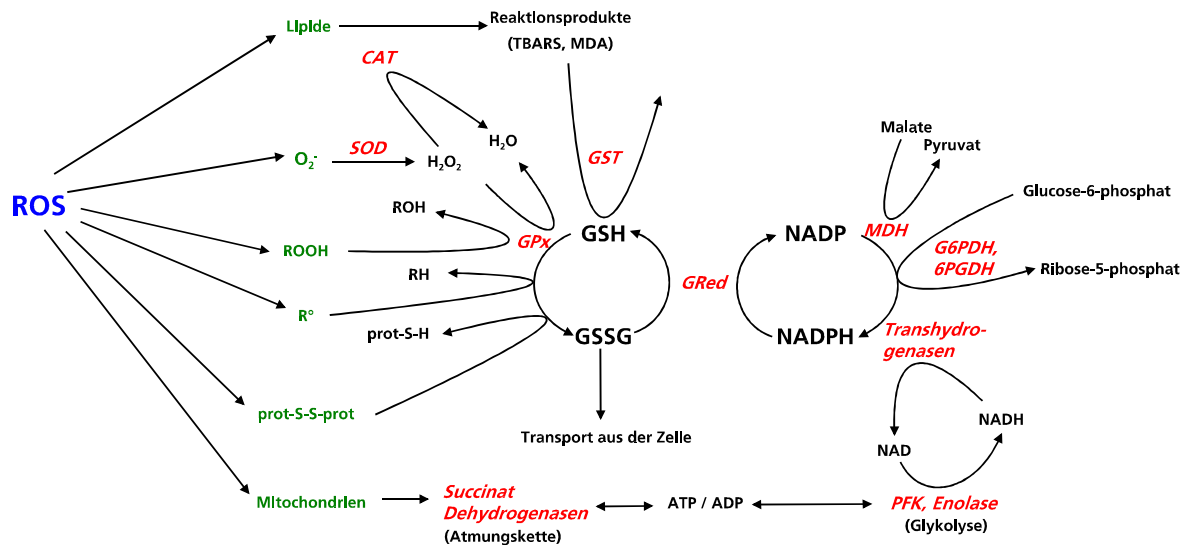


Abb. 1.1 Der Glutathion-Redox-Zyklus und verknüpfte Reaktionszusammenhänge als zelluläre Abwehrmechanismen gegen oxidativen Stress.

Die in der obigen Abbildung gezeigten Reaktionen repräsentieren den Ausschnitt zellulärer Vorgänge, die als Modell für diese Arbeit ausgewählt wurden. Sie beinhalten reaktive Sauerstoff Spezies ROS, welche direkt oder über Zwischenreaktionen verschiedene Radikale R^{\cdot} oder Superoxid-Radikalanionen $O_2^{\cdot-}$ bilden können. Sie reagieren mit Zellbestandteilen zu Hydroperoxiden (ROOH) und oxidieren Proteinthiole zu Disulfidverbindungen. Angriffspunkte sind weiterhin die Mitochondrien und die Lipide der biologischen Membranen. An den letztgenannten finden Reaktionen wie die Lipidperoxidation statt, die zu einer Mischung verschiedener Reaktionsprodukte führen. Wesentliche Reparatur- und Abwehrreaktionen der Zelle gegen diese Prozesse laufen im Glutathion-System zusammen. Reduziertes Glutathion (GSH) und oxidiertes Glutathion (GSSG) stehen in einem Konzentrationsgleichgewicht mit hohem Überschuss an reduziertem Glutathion in der unbelasteten Zelle. Über die Aktivität von Glutathion-S-Transferasen können Lipidperoxidationsprodukte an reduziertem Glutathion gekoppelt und dadurch aus der Zelle geschleust werden. Superoxidanionradikale ($O_2^{\cdot-}$) werden über die Superoxid-Dismutase zu Wasserstoffperoxid umgesetzt, welches durch die Katalase oder durch die Glutathion-Peroxidase mit reduziertem Glutathion unter dessen Oxidation zu Wasser reduziert wird. Die gleiche enzymatische Aktivität reduziert ebenfalls andere Hydroperoxide (ROOH) mit Glutathion (GSH) zu Alkoholen (ROH). Radikale (R^{\cdot}) und Protein-Disulfide können mit reduziertem GSH reagieren und letztere dadurch wieder zu Thiolen reduziert werden.

Für alle genannten Reaktionen ist die Gleichgewichtslage von GSH zu GSSG zugunsten der Konzentration des reduzierten Glutathions essentiell. Zur Aufrechterhaltung des Konzentrationsüberschusses an GSH verfügt die Zelle über verschiedene Mechanismen. Oxidiertes Glutathion kann in einer NADPH-abhängigen Reaktion unter Katalyse durch die Glutathion-Reduktase zu reduziertem Glutathion umgesetzt werden. Durch Ausschluß von oxidiertem Glutathion aus der Zelle wird ohne Veränderung der Konzentration an reduziertem Glutathion ebenfalls eine Erhöhung des

Konzentrationsverhältnisses vorgenommen. Die Biosynthese von Glutathion (nicht in der Abbildung) ist ebenfalls eine Möglichkeit der Steuerung des Konzentrationsverhältnisses. Die genannte Reaktion der Glutathion-Reduktase wiederum setzt das Vorhandensein eines Konzentrationsverhältnisses von NADPH zu NADP zugunsten der reduzierten Form des Koenzyms voraus. Dieses wird aufrechterhalten durch die Reaktionen der Malat-Dehydrogenase (MDH), des Pentose-Phosphat-Weges und der Transhydrogenasen, welche Protonen von NADH auf NADP übertragen. Durch die letztgenannte Reaktion ist eine Verbindung zu den glykolytischen Reaktionen gegeben, in denen die Phosphofruktokinase und die Enolase mitwirken. Die Glykolyse steht wiederum in Verbindung zum Konzentrationsverhältnis ATP/ADP und damit zur mitochondrialen Atmungskette, die selbst einen Angriffspunkt der ROS darstellt.

Die Zellkompartimente, in denen diese Reaktionen stattfinden, sind das Zytosol und die Mitochondrien mit voneinander getrennten Glutathion-Pools. Im Zytosol wird Glutathion nicht-ribosomal durch die Enzyme γ -Glutamyl-Cystein-Synthetase und Glutathion-Synthetase aus Glutamat, Cystein und Glycin synthetisiert, während in den Mitochondrien keine Synthese stattfindet. Damit hängt die Synthese von Glutathion vom Angebot an der Aminosäure Cystein ab, deren Konzentration nur ein Zehntel der restlichen Aminosäuren einnimmt. Der Glutathion-Redox-Zyklus ist in beiden Zellkompartimenten aktiv. Jedoch findet man beim Vergleich der daran gekoppelten Reaktionen Unterschiede. Die Katalase ist in den Mitochondrien nicht lokalisiert. Für Reaktionen mit Wasserstoffperoxid steht damit nur die Glutathion-Peroxidase zur Verfügung. Die Superoxid-Dismutase kommt als Mangan-Isoenzym in den Mitochondrien und als Kupfer-Zink-Isoenzym im Zytosol vor. Das Konzentrationsverhältnis zwischen Protein-Thiolen und Glutathion liegt in beiden Kompartimenten deutlich auf der Seite des Glutathions, ist aber ebenso wie die absolute Konzentration in den Mitochondrien in der Größenordnung von 100 % höher als im Zytosol. Die Aufrechterhaltung des Verhältnisses NADPH/NADP wird in den Mitochondrien durch Transhydrogenase-Aktivitäten gewährleistet, während im Zytosol hierfür der Pentose-Phosphat-Zyklus arbeitet. In Erythrozyten, welche keine Mitochondrien besitzen, kann eine ausreichende Reduktion von GSSG daher nur durch die Aktivität des Pentose-Phosphat-Zyklus gewährleistet sein.

In vitro-Experimente zur Untersuchung der Effekte von oxidativem Streß werden häufig unter Verwendung von Modellsubstanzen durchgeführt. Zum Teil werden hierfür organische Hydroperoxide eingesetzt. Man verwendet Benzoylhydroperoxid (Reed, 1990), Cumenhydroperoxid (Furuno *et al.*, 1994) und *tert.*-Butylhydroperoxid (Ochi, 1990) ebenso wie Wasserstoffperoxid (Gille *et al.*, 1989). Paraquat wird als eine Modellsubstanz für das Redox-Cycling (Brogaard *et al.*, 1997) genutzt, während das Enzymsystem Xanthin/Xanthin-Oxidase als Radikalerzeugungssystem für Superoxid-Radikale verwendet wird. Vorteile bei der Verwendung von organischen Hydroperoxiden als Modellsubstanzen liegen in ihrer Lipophilie, die sie die Zellmembranen leicht penetrieren läßt (Elliott *et al.*, 1995) ebenso wie in ihrer höheren chemischen Stabilität. Die Verwendung von Paraquatdichlorid setzt zur Bildung von Radikalen eine

Metabolisierung durch die NADPH-abhängige Cytochrom-P450-Reduktase voraus (Brogaard *et al.*, 1997), deren Aktivität in anderen als Primärzellkulturen nicht selbstverständlich ist. Ein Enzymsystem wie Xanthin/Xanthin-Oxidase als Quelle für $O_2^{\bullet-}$ -Radikale ist in sich wiederum ein von verschiedenen Faktoren wie pH-Wert, Anwesenheit von Inhibitoren und Temperatur abhängiges System.

1.2.1 Zielsetzung

Vor dem Hintergrund des vorgestellten Reaktionsmodelles sollen Methoden etabliert werden, die die Analyse von Parametern im Zusammenhang mit den Mechanismen des oxidativen Stresses erlauben. Die Bestimmungsmethoden für ausgewählte Endpunkte aus diesem Modell sollen nach ihrer Optimierung eine ausreichende Sensitivität zur Durchführung an kleinen Zellmengen in Mikrotiterplatten gewährleisten. In Expositionsexperimenten mit Modellsubstanzen soll die Sensitivität, Spezifität und Reproduzierbarkeit des biologischen Indikatorsystems, bestehend aus Zellsystem und biochemisch-analytischen Methoden, untersucht werden. Die Experimente haben zum Ziel, Erkenntnisse darüber zu gewinnen, ob mit dem System substanzspezifische biologische Effekte und Reaktionszusammenhänge im Sinne des vorgestellten Reaktionsmodelles detektiert werden können. Sie sollen zeigen, ob die Verwendung des Indikatorsystems auch in Untersuchungen zur biologischen Wirkung atmosphärischer Gase *in vitro* sinnvoll erscheint.

1.3 Exposition von eukaryontischen Zellen gegen atmosphärische Gase

1.3.1 Theoretischer Ansatz

Entsprechend den bereits vorgestellten Aspekten ist die Untersuchung atmosphärischer Gase mit Zellkulturen methodisch in 4 Bereiche zu gliedern:

- die Generierung, Probenahme und Analyse des *Untersuchungsgases*
- das eukaryontische *Zellkultursystem*
- die *Exposition*
- die *Analyse* des Zellstatus nach der Exposition

Die Bearbeitung des erstgenannten Punktes ist durch die Art des *Untersuchungsgases* bestimmt. Es sind die Situationen zu unterscheiden, in denen (1) das Gas entweder in Form einer Modellreaktion mit aufgereinigten Probegasen im Labor hergestellt werden kann, (2) das Gas nativ untersucht werden soll und in den Laborbereich transportiert werden kann oder aber (3) das Gas nativ untersucht werden soll, die Untersuchung aber im Bereich seines Entstehens stattzufinden hat. Diese Unterschiede haben im Hinblick auf den Expositionsaufbau weitreichende Folgen. So setzt ein Einsatz des Expositionsaufbaus außerhalb des Labors seine Mobilität voraus und die Möglichkeit, das Prüfgas ohne weitere Aufarbeitung für die Untersuchung einzusetzen. Dies sind die wesentlichen Leistungen, welche die Apparatur zum Einsatz im Biomonitoring z. B. im Bereich des Arbeitsschutzes oder der Umweltforschung leisten muß. Auf diesem Gebiet wurden bisher noch keine Arbeiten durchgeführt. Die Zielrichtung jedoch stellt sehr spezielle Anforderungen an die apparativen Gegebenheiten, die im folgenden beleuchtet werden sollen.

Die Gasanalyse ist hingegen für jede Art der Gasuntersuchung von Wichtigkeit und kann demzufolge getrennt hiervon behandelt werden.

Der zweite methodische Schwerpunkt wird durch das *Zellkultursystem* bestimmt. Hier gelten wiederum die schon genannten Gesichtspunkte hinsichtlich Spezies- und Organherkunft, biologischer/biochemischer Eigenschaften, Reproduzierbarkeit, etc.

Die *Exposition* selbst erfordert die Zusammenführung des biologischen Systems mit der zu untersuchenden Gaskomponente. Wie bereits angedeutet (vgl. Kapitel 1.1), kann der geforderte Kontakt nur unter bestimmten Bedingungen erfolgreich sein und die Grundlage für ein sinnvolles Prüfsystem ergeben. Die Erarbeitung dieser Bedingungen ergibt die theoretische Basis für den Entwurf der Expositionsapparatur und wird im folgenden dargestellt.

Die Exposition wird durch die *Analyse* biochemischer Endpunkte am biologischen Prüfsystem beurteilt. Auch hier gelten wiederum zunächst allgemeine Gesichtspunkte wie Relevanz des Endpunktes, Reproduzierbarkeit, Signifikanz und Interpretierbarkeit. Spezielle Anforderungen werden hier jedoch unter Umständen durch die Expositionsapparatur gestellt. So entsprechen die aus expositionstechnischen Gründen zu verwendenden Kulturgefäße häufig nicht den üblicherweise eingesetzten Materialien und erfordern daher eine Anpassung der Analytik unter Berücksichtigung einer zeitlich wie methodisch möglichst wenig aufwendigen Aufarbeitung der Zellen, um deren Status nach der Exposition nicht zu verändern.

Im einzelnen werden für den experimentellen Aufbau zur Exposition von eukaryontischen Zellen gegen atmosphärische Gase *in vitro* die folgenden Randbedingungen durch das Gas und die Zielrichtung Biomonitoring definiert:

- keine Einschränkungen hinsichtlich der Gasart
Zu berücksichtigen ist hier die mögliche Anwesenheit reaktiver Gase wie Ozon. Die erfolgreiche Untersuchung von Gasmischungen mit reaktiven Komponenten setzt einen Aufbau aus - im chemischen Sinne - inerten Materialien voraus. Alle mit dem Gas in Berührung kommenden Teile des Aufbaus sollten im Idealfall aus Materialien wie Teflon gefertigt sein und zusätzlich eine hohe Gasdichtigkeit gewährleisten.
- Einsatz von Gasen der Umgebungsatmosphäre
Diese Auswahl der Prüfsubstanz bedeutet einerseits, daß die zu erwartenden Konzentrationen an biologisch reaktiven Gaskomponenten wie Ozon, Stickstoffoxiden oder Kohlenwasserstoffen klein sind. Die Sensitivität des biologischen Systems muß daher sehr hoch sein. Andererseits werden durch den Einsatz nativen Gases der Umgebungsatmosphäre Vorgaben hinsichtlich des zu erwartenden Kohlendioxid-Gehaltes wie auch des Feuchtigkeitsanteiles gemacht. Der CO₂-Gehalt liegt bei 0,03 %, die relative Feuchte im Bereich 50-70 % rH/25 °C.
- gleichbleibende Gaskonzentration an der Kontaktfläche Gas/Zelle
Um eine möglichst geringe zeitliche Veränderung der am biologischen System wirkenden Gaskonzentration zu haben, muß mit einem flow-Reaktor gearbeitet werden. Das Prüfgas muß mit definiertem Fluß an die Zellen herangetragen und von dort abtransportiert werden. Entgegen einem batch-Reaktor, in welchen die

Prüfsubstanz durch einen einmaligen Eintrag in definiertem Volumen bzw. in definierter Konzentration transportiert würde, muß hier mit einem Gasfluß gearbeitet werden. Dadurch wird eine strömungstechnische Charakterisierung der Expositionsapparatur nötig. Für das Zellsystem stellt der stetige Gasstrom eine Belastung dar. Er wirkt einerseits rein physikalisch durch das Auftreffen der Gasmoleküle auf der Zelloberfläche und hat andererseits Auswirkungen auf die Befeuchtung der Zellen.

- unmittelbarer und definierter Gas/Zellkontakt

Eine Flüssigkeitsschicht zwischen dem Gas und den Zellen stellt eine sehr effektive Barriere für den Gas/Zellkontakt dar. Physikalisch wirkt sie als Trennschicht, die durch das Gas nur nach einem vorangegangenen Übertritt in die wässrige Phase durch Diffusionsprozesse überwunden werden kann. Handelt es sich bei der Flüssigkeitsschicht um Kulturmedium, so sind zusätzlich verschiedenste chemische Reaktionen des Gases mit Mediumkomponenten wie Vitaminen oder Glutathion möglich. Da es sich dabei um schnelle Reaktionen handelt und Gase zum Teil schlecht in der flüssigen Phase löslich sind, kann dies eine vollständige Abreaktion des Prüf gases bedeuten, ohne daß ein Gas-Zellkontakt stattgefunden hat. Für Ozon zeigen Modellrechnungen z. B., daß schon bei einer minimalen Schichtdicke von 0,1 µm Kulturmedium-ähnlicher Flüssigkeit mit einer vollständigen Abreaktion des Gases gerechnet werden muß (Pryor, 1992). Das Ergebnis eines solchen Experimentes würde daher nicht die Exposition des biologischen Systems gegen das Prüf gas sondern nur gegen die Produkte seiner Reaktionen mit Kulturmediumkomponenten widerspiegeln. Unter Umständen können in angemessenen experimentellen Zeiträumen auch keine signifikanten Ergebnisse erwartet werden, da die biologische Wirkung des Gases auf die Zellen durch die vorangegangenen Umsetzungen mit Kulturmedium vollständig unterdrückt wird.

Die Aufrechterhaltung der Vitalität des biologischen Prüfsystems verlangt jedoch eine gewisse Flüssigkeitsschichtdicke. Ziel muß es deshalb sein, diesen Parameter in einer reproduzierbaren Form einzustellen und dadurch eine möglichst genau definierte Expositionssituation zu gewährleisten.

Die Frage nach der Schichtdicke und chemisch-physikalischen Beschaffenheit eines möglichen Flüssigkeitsschicht über den Zellen ist von zentraler Bedeutung für die Exposition von *in vitro*-kultivierten Zellen gegen Gase. Die mögliche Übertragbarkeit der Ergebnisse auf *in vivo*-Bedingungen wird durch sie ebenfalls wesentlich bestimmt.

- Vermeidung eines Kontaktes zwischen Prüf gas und Kulturmedium

Eine Reaktion zwischen Gas und Kulturmedium findet unvermeidlich bei deren Kontakt statt. Er muß daher grundsätzlich durch apparative Gegebenheiten verhindert werden, um die Bildung daraus hervorgehender Reaktionsprodukte zu vermeiden. Sie könnten anderenfalls durch Diffusion im Kulturmedium zu den Zellen gelangen und die zelluläre Reaktion beeinflussen.

Diesen Gesichtspunkten gegenüber stehen die durch das Zellsystem definierten Randbedingungen:

- geringstmögliche Beeinflussung der Zellbiologie bzw. Zellvitalität durch den Expositionsvorgang
Dies ist dadurch zu erreichen, daß die Bedingungen während der Exposition möglichst den zellspezifischen Kulturbedingungen angepaßt werden. Das heißt im einzelnen:
 - ausreichende Versorgung mit Nährstoffen/Kulturmedium
 - ein definiertes Umgebungsmilieu der Zellen, gegeben durch pH-Wert, Temperatur und relativer Feuchte
 - Minimierung physikalischer Belastungen durch Gas- oder Flüssigkeitsströme
- längstmögliche Expositionszeit
Die Umsetzung dieser Forderung wird durch eine optimale Einstellung der genannten Randbedingungen erreicht.

Weiterhin müssen allgemeine Randbedingungen eingehalten werden, die zum Teil den üblichen Vorschriften für die Arbeit mit *in vitro*-kultivierten Zellen entsprechen.

- Sterilität/keimarme Exposition
Die Forderung nach der in der Zellkultur üblichen Sterilität muß hier berücksichtigt werden. Es ist jedoch absehbar, daß sie im Falle der Durchführung eines Biomonitorings nicht erfüllt werden kann, da eine Dekontamination der Prüfsubstanz, in diesem Falle des Gases, vor seinem Einsatz nicht möglich ist. Es muß daher mit einem Eintrag von Keimen während der Exposition gerechnet werden.
- einfache Bedienbarkeit des Aufbaus
Trotz der Komplexität der genannten Randbedingungen muß die Expositionsapparatur einfach bedienbar sein. Die Forderung nach dem Vitalitätserhalt der Zellen erlaubt keine aufwendigen Handhabungen beim Einbringen in die Apparatur. Ebenso wichtig ist die Möglichkeit einer schnellen Entfernung bzw. eines schnellen Wechsels der exponierten Zellen, um eine zügige Aufarbeitung und Analyse zu gewährleisten.
- Flexibilität/Mobilität des Aufbaus
Mit der Zielrichtung Biomonitoring muß der Expositionsaufbau flexibel und einfach aufbaubar und im günstigsten Fall mobil sein. Der wesentliche Gesichtspunkt hierbei ist, daß die Exposition vollständig außerhalb eines Inkubators stattfinden muß.

Vergleicht man die Randbedingungen, die durch Gas und Zellen definiert werden, so stellt sich hier der Widerspruch dar, der durch einen entsprechenden Expositionsaufbau gelöst werden muß:

Gas		Zellen
<ul style="list-style-type: none"> • Zellkontakt bei Bedingungen der <u>Umgebungsatmosphäre</u>: <ul style="list-style-type: none"> – rel. Feuchte: ca. 50-70 % rH/25 °C – CO₂-Gehalt: 0,03% 	↔	Vitalitätserhalt nur zu gewährleisten bei definiertem <u>Umgebungsmedium</u> : <ul style="list-style-type: none"> – Befeuchtung > 90 % rH – pH-Kontrolle des Mediums wird üblicherweise durch 5% CO₂ erreicht.
<ul style="list-style-type: none"> • <u>Gastransport</u> dicht an die Zelloberfläche 	↔	<u>keine physikalische Belastung</u>

1.3.2 Etablierte Konzepte

Zur Exposition von *in vitro*-kultivierten Zellen wurden bereits in den sechziger Jahren Experimente durchgeführt (Coffin *et al.*, 1968) und nach verschiedenen Konzepten weiterentwickelt. Zur Strukturierung publizierter Arbeiten lassen sich folgende Ansätze unterscheiden:

- submerse Expositionen
Zellen werden in Kulturmedium gegen Gase exponiert
- gemischt submerse - air/liquid-Expositionen
Zellen werden zeitweilig von Kulturmedium bedeckt und zeitweilig direkt gegen das Prüfgas exponiert
- air/liquid-Expositionen
Zellen werden ausschließlich direkt, d. h. ohne Flüssigkeitsüberschichtung gegen das zu untersuchende Gas exponiert.

1.3.2.1 Expositionsaufbauten zur submersen Exposition von Zellen gegen Gase *in vitro*

Den Reaktor eines derartigen Aufbaus stellt z. B. eine Gaswaschflasche dar. In dieser befindet sich die Zellsuspension, durch die das Gas hindurchgeleitet wird. Die folgende Abbildung zeigt einen Aufbau für die Exposition von Alveolar-Makrophagen des Meerschweinchens gegen Stickstoffdioxid (Voisin *et al.*, 1974), in dem das Prüfgas während der Exposition durch katalytische Umsetzung von Stickstoffmonoxid dargestellt wird.

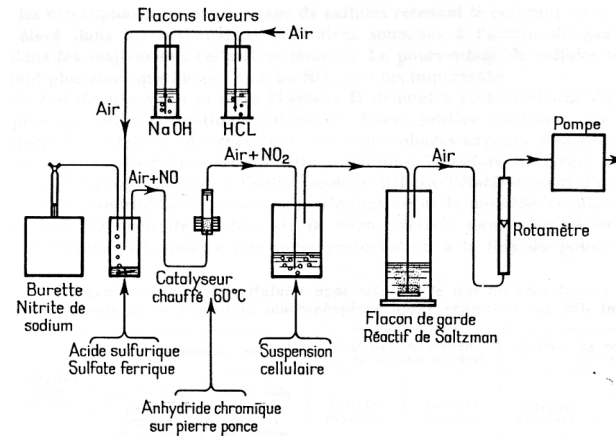


Abb. 1.2 Submerse Exposition von Alveolar Makrophagen gegen Stickstoffmonoxid (Voisin *et al.*, 1974).

Auch in aktuelleren Arbeiten findet dieses Konzept Verwendung. So wurde eine Untersuchung von humanen Blutzellen, bei der die Autoren Ozon zur Exposition der Zellen einmalig in das Kulturmedium gaben, danach durchgeführt (Cardile *et al.*, 1995). In einer anderen Studie wurde das Gas zur submersen Exposition über eine gerührte Zellsuspension geleitet (Van der Zee *et al.*, 1987).

1.3.2.2 Expositionsaufbauten zur gemischt submersen - air/liquid-Exposition

Adhärenzte Kultursysteme werden nach verschiedenen Konzepten periodisch mit Kulturmedium oder einer Ersatzflüssigkeit überspült. In der Zwischenzeit können sie ohne Flüssigkeitsüberstand gegenüber Gasen exponiert werden.

Bereits 1969 wurde dieses Konzept für Kulturflaschen, die im Wechsel mit Medium gefüllt und geleert werden, beschrieben. In der Expositionsphase wurde Ozon durch die Flaschen geleitet (Pace *et al.*, 1969). Das gleiche Konzept wurde zur Untersuchung flüchtiger Substanzen auch in einer aktuellen Arbeit eingesetzt (Muckter *et al.*, 1998).

Ebenfalls mit großen Kulturgefäßen wurde bei der Exposition von Rinder-Nierenzellen gegen Ozon gearbeitet (Bolton *et al.*, 1982). Man verwendete drehende Kulturflaschen, an deren Innenwänden adhärenzte Kulturen gezüchtet waren. Durch eine unvollständige Füllung der Flaschen lagen die Zellen während der Rotation für einen festen Zeitraum ohne Überschichtung.

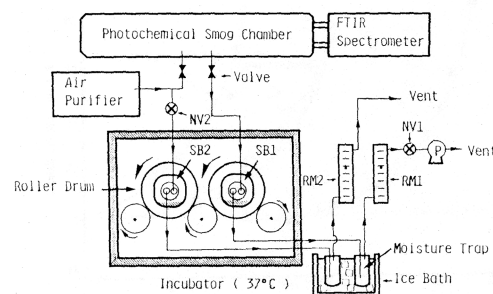


Abb. 1.3 Exposition in drehenden Kulturflaschen (Shiraishi *et al.*, 1986).

Kulturschalen finden in diesem Konzept ebenfalls als Expositionsgefäße Verwendung. Sie werden zum Teil mit Kulturmedium gefüllt. Eine zeitweilige Übersichtung der Zellen wird entweder durch Schwenken auf einer Rockerplattform oder durch Drehen der angewinkelten Schale erreicht (Rusznak *et al.*, 1996; Wenzel *et al.*, 1982; Wenzel *et al.*, 1979). Die Kulturgefäße befinden sich dabei in einer Expositionsbox oder einem modifizierten Brutschrank, durch den das Gas geleitet wird.

Das gleiche Prinzip wird auch für 6-Well- oder Mikrotiterplatten angewendet (Dumler *et al.*, 1994). Sie werden ebenfalls geschwenkt oder rotiert, um die Lage und Schichtdicke der überlagernden Flüssigkeit zu kontrollieren und zu verändern.

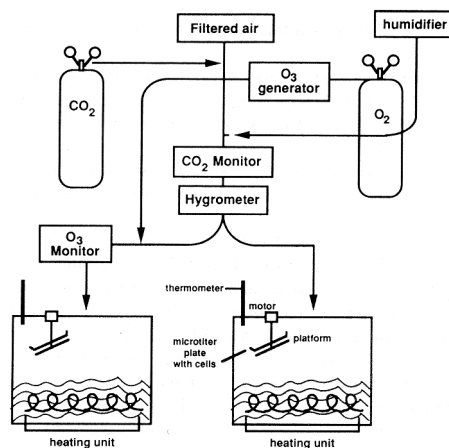


Abb. 1.4 Exposition auf Mikrotiterplatten (Dumler *et al.*, 1994).

Ein anderer Expositionsansatz wurde bei der Untersuchung der Wirkung von NO₂ auf A549-Zellen eingesetzt (Tu *et al.*, 1995). Die Zellen wurden dort in umgedrehten Kulturschalen exponiert, unter denen das Gas hindurchgeleitet wurde.

1.3.2.3 Expositionsaufbauten zur air/liquid-Exposition von Zellen gegen Gase *in vitro*

Ein einfacher und kostengünstiger Weg zur Realisierung einer Exposition, die im weitesten Sinne als air/liquid-System beschrieben werden kann, besteht in der Verwendung von Collagengel als Wachstumsoberfläche, welches durch Zusatz von Kulturmedium humifizierend und nutritifizierend wirkt (Jabbour *et al.*, 1998; Zamora *et al.*, 1986).

Unter dem Begriff der air/liquid-Kultur im engeren Sinne wird eine Kulturführung verstanden, bei der die Zellen an der Flüssigkeitsgrenze zwischen Gasphase und Kulturmedium liegen. Im Unterschied zu einer Kultur in Schalen oder Multi-Well Platten, bei denen das Kulturmedium entfernt wurde, findet hier jedoch weiterhin eine Versorgung der Zellen mit Kulturmedium statt. Dies wird üblicherweise durch Verwendung von mikroporösen Membranen erreicht, auf denen die Zellen adhärent wachsen und welche einen Stoffaustausch durch Diffusionsprozesse zulassen. Unter Verwendung eines solchen oder ähnlichen Konzeptes wurden verschiedene Aufbauten realisiert.

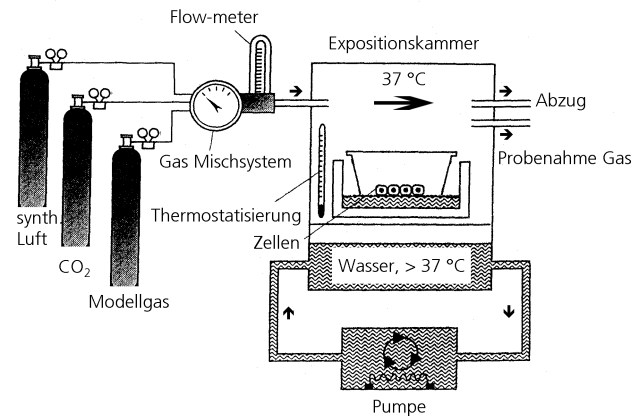


Abb. 1.7 Üblicher Aufbau zur air/liquid-Exposition von Zellkulturen gegen Gase ((Knorst *et al.*, 1996), verändert).

Es werden vorwiegend die Modellgase Schwefeldioxid, Stickstoffdioxid und Ozon verwendet, die in ihrer Konzentration durch Zumischung von synth. Luft (20,5 % O₂ in N₂) eingestellt werden. Zusätzlich wird Kohlendioxid zu einer Endkonzentration von 5 % beigemischt, welches der pH-Kontrolle des Kulturmedium dient.

Die Verdünnung des Modellgases wird über ein Gas-Mischsystem mittels flow-Meter kontrolliert und durch den vorhandenen Überdruck in eine Expositions-kammer transportiert. Als Expositions-kammern finden Standard-Zellkulturinkubatoren (Lang *et al.*, 1998) oder spezielle Expositionsboxen aus Glas (Wright *et al.*, 1994) oder Plexiglas (Gabrielson *et al.*, 1994) Verwendung. Ein Wasserbad thermostatisiert die Expositions-kammer auf 37 °C und befeuchtet die Gasmischung darin auf ca. 90 % rH/37 °C.

Die Zellen werden auf einer mikroporösen Membran kultiviert, liegen an der Gas/Flüssigkeitsgrenze apikal frei gegen das Gas und werden basal durch die Membran mit Medium oder Ersatzflüssigkeit versorgt. Membranen wurden für diesen Zweck zunächst in spezielle Konstruktionen eingebracht, um sie für die Zellkultur zugänglich zu machen (Rasmussen, 1984; Voisin *et al.*, 1977a; Voisin *et al.*, 1977b). Mittlerweile sind derartige Systeme kommerziell als „Transwell-Inserts“ in verschiedenen Variationen bzgl. Porendurchmesser, Wachstumsfläche und Beschichtung erhältlich (Falcon, Costar, Nunc und andere Firmen).



Abb. 1.8 Zellkultur-Insert (Transwell in 12-Well-Format, 1,09 cm², Fa. Falcon) mit einer Wachstumsfläche aus mikroporöser Membran.

Bei Benutzung derartiger Transwell-Systeme werden die Zellkultur-Inserts in dazugehörige Multiwell-Platten eingebracht („Compendium-Plates“). Als Kulturmedium wird mit Natriumhydrogencarbonat gepuffertes Standard-Kulturmedium verwendet (Kienast *et al.*, 1993). Häufig wird es auch vor der Exposition gegen eine Ersatzflüssigkeit getauscht (meist HBSS) (Dumler *et al.*, 1994; Gabrielson *et al.*, 1994; Mogel *et al.*, 1998).

Als biologische Testsysteme werden unterschiedlichste Zellen verwendet. Primärzellen (z. B. alveolare Typ II Zellen der Ratte (Cheek *et al.*, 1994)) ebenso wie Zelllinien (z. B. A549 (Wallaert *et al.*, 1996) oder BEAS 2B (Gabrielson *et al.*, 1994)) oder Makrophagen aus der bronchio-alveolären Lavage (z. B. der Spezies Rind (Hockele *et al.*, 1998)).

Die Zellen werden in der Expositions-kammer vertikal vom Gas überströmt. Die Strömungsgeschwindigkeiten liegen bei einer typischen Größe der Expositions-kammer von 2-3 l bei einem Volumenstrom von 1-1,5 l/min (Wright *et al.*, 1994).

Nach Durchströmen der Expositions-kammer wird das Gas in einen Abluftstrom geführt, in dem bei Bedarf eine Gasanalytik durchgeführt werden kann.

1.3.2.4 Schlußfolgerungen aus den etablierten Konzepten

Bewertet man die vorgestellten Arbeiten nach den vorangegangenen theoretischen Ansätzen, so gelangt man zu folgendem Resultat:

Expositions-aufbau	Vorteil	Nachteil
submerse Exposition	<ul style="list-style-type: none"> – einfacher Aufbau – vollständig zelltypspezifische Kulturbedingungen 	<ul style="list-style-type: none"> – <u>sehr schlechter Gas/Zellkontakt</u> – große Kontaktfläche zwischen Gas und Medium
gemischt	<ul style="list-style-type: none"> – konventionelle Kulturbedingungen – gute Befeuchtung der Zellen 	<ul style="list-style-type: none"> – <u>undefinierter Gas/Zellkontakt</u> – aufwendiger Aufbau mit mechanisch zu bewegenden Komponenten – große Kontaktfläche zwischen Gas und Medium
air/liquid-Exposition	<ul style="list-style-type: none"> – <u>bestmöglicher Gas/Zellkontakt</u> 	<ul style="list-style-type: none"> – Umstellung der Kulturführung auf Membranen notwendig – direkter Zellkontakt mit unphysiologischer CO₂-Konzentration (5%) kann zytotoxisch wirken – Anreicherung des Gases mit CO₂ und Befeuchtung lassen keinen nativen Einsatz des Prüfgases zu – Zellen sind der physikalischen Belastung durch den Gasstrom direkt ausgesetzt – bei unvollständiger Befeuchtung droht Austrocknen der Zellen (Zelltod) – unflexible, schwer bewegliche Aufbauten

Der wichtigste funktionelle Unterschied zwischen den genannten drei Expositions-prinzipien liegt in der Qualität des Kontaktes zwischen dem Untersuchungsgas und der Zelloberfläche. *Submerse Expositionen* scheiden unter diesem Gesichtspunkt völlig aus,

da die Gase hier ausschließlich über ihre Reaktionsprodukte mit der Kulturflüssigkeit reagieren können.

Der größte Nachteil der *gemischten submers - air/liquid-Expositionen* liegt in der nur schwer möglichen Quantifizierbarkeit des Gas/Zellkontaktes. Ein Teil des Gases reagiert in der Kulturflüssigkeit ab, die Reaktionsprodukte dieses Prozesses gelangen zu den Zellen. In der air/liquid-Phase liegt durch Adhäsionseffekte stets ein Flüssigkeitsfilm über den Zellen, dessen Dicke durch viele Parameter wie dem Flüssigkeitsstand, der Flüssigkeitsviskosität, der Größe und Art von Adhäsionseffekten und der Bewegung des Kulturgefäßes bestimmt ist. Das Auftreten des Flüssigkeitsfilmes demnach in einem derartigen Aufbau ist nicht zu vermeiden, er ist schwer in seinen Eigenschaften zu beschreiben und nicht reproduzierbar einzustellen.

Air/liquid-Expositionen erfordern den größten präparativen und apparativen Aufwand. Ihr Vorteil ist jedoch, daß es zur Zeit kein anderes Konzept gibt, durch das ein qualitativ besserer Gas/Zellkontakt möglich ist.

1.3.3 Zielsetzung

Die Betrachtung der unterschiedlichen Expositionskonzepte zeigt, daß die zentrale Fragestellung, die Realisation eines optimalen Kontaktes der Zellen mit dem Untersuchungsgas unter Beibehaltung der zellulären Vitalität, nur in einem air/liquid-System zu verwirklichen ist.

Daher soll zunächst die Durchführbarkeit derartiger Expositionen nach dem gängigen air/liquid-Konzept mit zur Verfügung stehenden Zellkultur- und Analysemethoden überprüft werden. Gleichzeitig soll dabei untersucht werden, ob neben der Studie einzelner Modellgase wie Ozon auch die Untersuchung der biologischen Wirkung komplexer Gasmischungen mit einem derartigen System zugänglich ist.

In der Fortführung der Arbeit sollen die beschriebenen Limitationen der bisher realisierten Aufbauten in einem neuen Konzept nach den dargestellten Vorgaben überwunden werden. Im einzelnen betrifft dies die folgenden Gesichtspunkte:

Charakteristika etablierter Konzepte	Zielsetzung
<ul style="list-style-type: none"> • Arbeit mit aufbereiteten Modellgasen <ul style="list-style-type: none"> – Befeuchtung > 90 % rH/37 °C – Beimischung CO₂ 5% 	⇒ <u>Gas der Umgebungsatmosphäre</u> <ul style="list-style-type: none"> – Befeuchtung ca. 50-70 % rH/25 °C – CO₂ 0,03%
<ul style="list-style-type: none"> • Vertikalstrom über Kulturgefäße • Verwendung von Ersatzflüssigkeit • teilweise große Wachstumsflächen • großer, fest installierter Aufbau 	⇒ <u>direktere Gasführung</u> über Zellrasen ⇒ Verwendung eines <u>Standard-Kulturmediums</u> ⇒ Adaption <u>kleiner Wachstumsflächen</u> ≈ 1 cm ² ⇒ kleiner, potentiell mobil einsetzbarer, <u>flexibler Aufbau</u>

Die Umsetzung soll nach folgendem Konzept geschehen (Abb. 1.9):

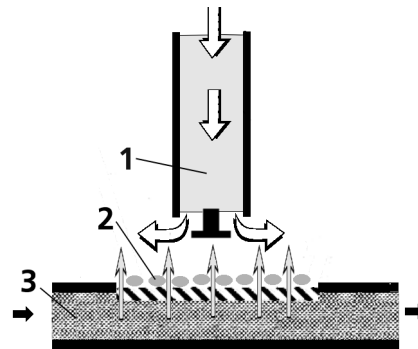


Abb. 1.9 Theoretisches Konzept für Expositionsaufbau. 1: Gasstrom 2: Zellen auf mikroporöser Membran 3: Kulturmediumstrom

Das Gas wird mit einem kleinen Fluß durch ein Leitungssystem aus inertem Material dicht an die Zellen geführt. Eine direkte Anströmung der Zellen soll dabei vermieden werden. Der Gasstrom soll nicht durch ein Überdruck-, sondern durch ein Unterdrucksystem erzeugt werden. Dadurch wird die Untersuchung druckloser Gasmischungen möglich.

Die Humifizierung und Nutrifizierung der Zellen wird durch Kulturmedium unterhalb der Membran realisiert. Durch Verdunstung und Kapillarkräfte soll damit ein Mikroklima geschaffen werden. Die Membran selbst wird kleinporig ($0,4 \mu\text{M}$) gewählt, um einem stärkeren Durchtritt von Kulturmedium entgegen zu wirken.

Durch vollständige Trennung von Gas- und Mediumstrom wird ein Kontakt der beiden Komponenten minimiert. Das Kulturmedium fließt unterhalb der mikroporösen Membran, um jegliche Aufkonzentrierung von Reaktionsprodukten darin und die Veränderung seines pH-Wertes zu verhindern. Auf diese Weise soll die Anreicherung des Untersuchungsgases um Kohlendioxid zur pH-Stabilisierung des Kulturmediums ebenso wie seine Befeuchtung überflüssig werden.

Entsprechend diesen Vorgaben soll ein Aufbau für die Exposition von eukaryontischen Zellen *in vitro* mit der Zielrichtung Biomonitoring entwickelt werden. In diesem soll das biologische Testsystem eingesetzt werden. Es soll der Einfluß darin durchzuführender Expositionen auf dessen Vitalität untersucht werden. Expositionen gegen Modellgase sollen der Untersuchung der Reproduzierbarkeit und Sensitivität des gesamten experimentellen Aufbaus aus Expositionssystem und biologischem Testsystem dienen.

1.4 Strategie und Gliederung der Arbeit

1) *Gasexpositionen nach dem gängigen air/liquid-Konzept*

Es wird ein Expositionsaufbau realisiert, mit dem nach dem Stand der Wissenschaft Gasexpositionen eukaryontischer Zellen in einem air/liquid-System möglich sind. Dabei werden ein zur Verfügung stehendes Zellsystem der Ratte und etablierte Analyse- und Zellkulturmethoden verwendet. Durch Zusammenarbeit mit der Abteilung Atmosphärische Chemie des Fraunhofer ITA werden dabei unter anderem Expositionen gegen komplexe und durch photochemische Reaktionen veränderte Gasgemische möglich.

Die Ergebnisse dieser Experimente sollen die verwendete Expositionstechnik auch unter praktischen Gesichtspunkten bewertbar machen und weitere Aspekte offenlegen, die bei der Realisation eines endgültigen Expositionsaufbaus wichtig sind. Sie sollen die Durchführbarkeit derartiger Expositionen und die Zugänglichkeit der Untersuchung komplexer Gasmischungen charakterisieren.

2) *Einzeletablierungen spezieller Lösungen für die Bereiche Zellkultur und Analysemethoden*

Ein humanes Zellkultursystem der Lunge soll für den Einsatz in der Exposition gegen Gase vorbereitet werden. Dazu wird die Kulturführung entsprechend den Zielsetzungen verändert und das Zellsystem hinsichtlich seiner Wachstumseigenschaften charakterisiert.

Im Rahmen des gewählten toxikologischen Modells „oxidativer Streß“ werden Methoden zur Analyse biochemischer Parameter an kultivierten Zellen erarbeitet. Sie stützen sich auf auszuwählende etablierte Methoden, die für die Anwendung an Zellaussaaten kleiner Zellmenge und die Verwendung in der Routine-Testung modifiziert werden. Diese Methoden werden ebenfalls zur Charakterisierung des nicht exponierten Zellsystems angewendet.

3) *Untersuchung des Zellmodells, bestehend aus Zellkultursystem und den etablierten Analysemethoden, in submersen Modellexpositionen*

Zur Validierung der biologischen Relevanz von Zellsystem und Analysemethodik sollen Expositionen gegen die einfachen Modellsubstanzen Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und *tert.*-Butylhydroperoxid (tBuOOH) durchgeführt werden. Es soll ein Mikrotiterplatten Testsystem erarbeitet werden, welches sowohl konzentrationsabhängige Effekte untersucht als auch deren Kinetiken charakterisiert.

Daran anschließend folgen Experimente zur submersen Exposition des Zellsystems gegen Zigarettenrauchkondensat als Modellsubstanz für komplexe Stoffgemische. Sie sollen zeigen, inwieweit die Reproduzierbarkeit, Vitalität und Funktion des Zellmodells die Detektion konzentrations-, und zeitabhängiger Effekte sowie mechanistischer Zusammenhänge im Bereich der untersuchten Parameter zulassen.

4) *Realisation und Charakterisierung eines Expositionsaufbaus, der grundlegende Anforderungen für ein *in vitro*-Biomonitoring erfüllen soll*

Es soll ein Expositionsaufbau erarbeitet werden, der die in der Einleitung vorgestellten Überlegungen in eine praktikable Lösung umsetzt. Dazu werden auch Experimente zur einfachen strömungstechnischen Charakterisierung des Aufbaus durchgeführt.

5) *Zusammenführung des Zellmodells mit dem Expositionsaufbau und Untersuchung des gesamten Systems in Expositionen gegen Modellgase*

Das Zellmodell wird in air/liquid-Expositionen im Expositionsaufbau eingesetzt. Expositionen ohne Gasfluß, gegen synthetische Luft unter Variation der Befeuchtung und der Größe des Gasflusses, gegen Stickstoffdioxid und Ozon sollen die zelluläre Reaktion auf die Gasexposition charakterisieren. Weiterhin soll versucht werden, die Schichtdicke des Flüssigkeitsfilms über den Zellen zu beeinflussen. Das Testsystem soll durch eine Erweiterung um ein zweites humanes Zellsystem validiert werden. Gleichzeitig werden dadurch entwickelten Methoden auf ihre Übertragbarkeit auf zuvor weniger eingehend charakterisierte Kultursysteme überprüft.

Nach Abschluß dieser Experimente soll die Grundlage für die Bewertung des vollständigen Systems zur Untersuchung der biologischen Wirkung atmosphärischer Gase *in vitro* gegeben sein. Es sollen Ergebnisse für die Charakterisierung aller drei methodischer Aspekte vorliegen, des Zellsystems, der Expositionstechnik und der anschließenden Analytik.

2 Material und Methoden

2.1 Zellkultur

2.1.1 Allgemeine Kulturbedingungen und Materialien

Es wurde nach allgemeinen Richtlinien der Zellkulturführung (Freshney, 1990) unter sterilen Bedingungen gearbeitet. Im Verlauf der Arbeiten wurden folgende Materialien eingesetzt:

Brutschränke	Begasungsbrutschrank Cytoperm 8080	Heraeus
Gewebekulturflaschen	Wachstumsfläche 175 cm ² Wachstumsfläche 75 cm ²	Becton Dickinson Becton Dickinson
Mikrotiterplatten	Mikro Test III	Becton Dickinson
Zellkultur-Inserts	12-Well-Format 0,4 µM Porengröße 6-Well-Format alle Inserts mit dazu gehörigen Compendium- Plates	Falcon 3181 Becton Dickinson
Kulturmedien und Reagenzien	Feinchemikalien, allg. RPMI 1640 fetales Kälberserum FeSO ₄ x 7 H ₂ O Trypsin, 0,25 %	sofern nicht genannt: Fa. Sigma Biochrom/Seromed Boehringer, Mannheim Merck Biochrom/Seromed
Zellzählung	elektronisches Zellzählgerät CASY	Schärfe Systeme

2.1.2 Verwendete Zellsysteme

Bei den in der Arbeit genutzten Zellkulturen handelt es sich um etablierte Zellsysteme mit folgenden Spezifikationen:

2.1.2.1 Zellsystem R3/1

(Emura *et al.*, 1995; Emura *et al.*, 1990; Jacob *et al.*, 1995; Knebel *et al.*, 1994)

Herkunft/Spezies:	Ratte (Wistar), fetal		
Organ:	Bronchialgewebe		
Histologischer Typ:	Epithelzelle		
Karyotyp:	männlich, modale Chromosomenanzahl 42		
Zytoskelettkomponenten:	Aktin, Tubulin, Vimentin, Zytokeratin 8		
Enzymatisches Profil:	Ratte		
Mykoplasmen:	negativ		
Bakt. Infektionserreger:	negativ		
Pilze:	negativ		
Virales Profil:	negativ		
Populationsverdopplungszeit:	ca. 16,6 h		
Kulturmedium:	RPMI 1640		
(Anzucht)	NaHCO ₃	2	g/l
	FKS	20	%
	Brenztraubensäure (Natrium Salz)	138	mg/l
	Vitamin B12	1,5	mg/l
	FeSO ₄ x 7 H ₂ O	570	µg/l
Kulturmedium (Exposition):	RPMI 1640 (kein NaHCO ₃)		
Kulturmedium:	RPMI 1640		
(Inkubatorkontrolle)	NaHCO ₃	2	g/l
	FKS	20	%
	Brenztraubensäure (Natrium Salz)	138	mg/l
	Vitamin B12	1,5	mg/l
	FeSO ₄ x 7 H ₂ O	570	µg/l
Inkubation (Anzucht):	95% rH/37 °C, 10 % CO ₂		
Passage des Prüfpools:	6		

Das Zellsystem fand in dieser Arbeit ausschließlich im Teil „Gasexpositionen nach dem gängigen air/liquid-Konzept“ (vgl. Kapitel 2.2.1 und 3.1) Verwendung.

2.1.2.2 Zellsystem LK004

(Aufderheide *et al.*, 1999; Ritter *et al.*, 1999)

Herkunft/Spezies:	human, adult		
Organ:	Lunge		
Histologischer Typ:	Fibroblast		
Karyotyp:	männlich, modale Chromosomenzahl 46		
Mykoplasmen:	negativ		
Bakt. Infektionserreger:	negativ		
Pilze:	negativ		
Virales Profil:	negativ		
Populationsverdopplungszeit:	ca. 24 h		
Kulturmedium:	RPMI 1640		
(Anzucht)	NaHCO ₃	2	g/l
	FKS	20	%
	Brenztraubensäure (Natrium Salz)	138	mg/l
	Vitamin B12	1,5	mg/l
	FeSO ₄ x 7 H ₂ O	570	µg/l
Inkubation (Anzucht):	95% rH/37 °C, 5 % CO ₂		
Passage des Prüfpools:	5		

Mit diesem Zellsystem wurden sämtliche Etablierungen und Optimierungen von Zellkultur- und Analysemethoden sowie Expositionen gegen Modellsbstanzten und die Gasexpositionen im neu entwickelten Expositionsaufbau durchgeführt.

2.1.2.3 Zellsystem HFBE

(Emura *et al.*, 1995; Ochiai *et al.*, 1991)

Herkunft/Spezies:	human, fetal		
Organ:	Lunge		
Histologischer Typ:	Epithelzelle		
Karyotyp:	weiblich, modale Chromosomenzahl 46		
Mykoplasmen:	negativ		
Bakt. Infektionserreger:	negativ		
Pilze:	negativ		
Virales Profil:	negativ		
Populationsverdopplungszeit:	ca. 24 h		
Kulturmedium (Anzucht):	RPMI 1640		
(Anzucht)	NaHCO ₃	2	g/l
	FKS	20	%
	Brenztraubensäure (Natrium Salz)	138	mg/l
	Vitamin B12	1,5	mg/l
	FeSO ₄ x 7 H ₂ O	570	µg/l
Inkubation (Anzucht):	95% rH/37 °C, 10 % CO ₂		
Passage des Prüfpools:	6		

Das Zellsystem fand Verwendung in Teil „Expositionen gegen Modellgase im neu entwickelten Aufbau“, wo es unter den für das Zellsystem LK004 erarbeiteten Kulturbedingungen eingesetzt wurde .

2.1.3 Kulturbedingungen

Aus einem kryokonserviertem Stammpool wurden Prüfpools in der angegebenen Passage für jedes Zellsystem angelegt. Hierzu wurden $5 \cdot 10^5$ Zellen/ 0,5 ml Kulturmedium mit einem Zusatz von 8% DMSO in Kryoröhrchen verbracht und in flüssigem Stickstoff gelagert. Sämtliche Untersuchungen wurden mit diesen Zellpools durchgeführt.

Für jedes Experiment wurden Zellen aus den charakterisierten Prüfpools entnommen und in 75 cm² Gewebekulturflaschen angezchtet. Die Qualität jeder Zellpräparation wurde mikroskopisch beurteilt. Zum Zeitpunkt der Subkonfluenz wurden die Zellen trypsinisiert und ihre Anzahl und Qualität mittels elektronischer Zellzählung und -größenverteilung bestimmt. Aus dem Trypsinat wurde eine Zellverdünnung in gewünschter Konzentration hergestellt, die zur Einsaat in die benötigten Kulturgefäße bereitgestellt wurde.

Es wurden Einsaaten in Mikrotiterplatten und Transwells im 6-Well- sowie im 12-Well-Format durchgeführt. Die verwendete Zellzahl variierte bei der Untersuchung von Wachstumkinetiken in Mikrotiterplatten. Sie ist den folgenden Ausführungen zu entnehmen.

2.1.3.1 Zellsystem R3/1: Anzucht auf Transwells im 6-Well-Format

R3/1-Zellen wurden in einer Zelldichte von $1,5 \times 10^5$ Zellen/ $4,2 \text{ cm}^2$ zur Konfluenz auf Zellkulturinserts in Anzuchtmedium (mit 20% FKS) ausgesät. Nach 18stündiger Anheftungsphase wurde das Kulturmedium entfernt, der Zellrasen zweifach mit PBS gespült und Expositionsmedium (ohne FKS, NaHCO_3 , Zusätze) oder Inkubatorkontrollmedium (ohne FKS, mit NaHCO_3 und Zusätzen) in die Compendium-Plates unter die Inserts gegeben. Damit standen die Zellen zur Verwendung im Experiment bereit.

2.1.3.2 Zellsystem HFBE: Anzucht auf Transwells im 12-Well-Format

Für die Verwendung in Expositionen gegen Gase (vgl. Kapitel 3.7) wurden HFBE-Zellen subkonfluent in einer Dichte von $2,0 \times 10^4$ Zellen/ $1,07 \text{ cm}^2$ in Zellkulturinserts (Falcon 3181) in Anzuchtmedium (10% FKS) ausgesät. Nach 72 Stunden erreichten sie unter diesen Bedingungen Konfluenz. Zu diesem Zeitpunkt wurde das Anzuchtmedium gegen Medium RPMI 1640 (ohne FKS) mit 25 mM HEPES, NaHCO_3 und Zusätzen getauscht. Die Zellen wurden so 24 Stunden im Brutschrank unter zelltypspezifischen Bedingungen weiter kultiviert und standen dann für die Expositionsexperimente bereit. Zur Exposition und Nachinkubation wurde das genannte Kulturmedium mit Gentamycin in einer Konzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$ versetzt.

2.1.3.3 Zellsystem LK004: Anzucht in Mikrotiterplatten

Für die Etablierung verschiedener Zellkulturmethoden und Verwendung des Zellsystems in submersen Modellexperimenten wurden verschiedene Zellkulturprotokolle erarbeitet:

- Kultur unter proliferativen Bedingungen
Lk004-Zellen wurden in Dichten von 1250 bis 40000 Zellen/MTP-Well in Anzuchtmedium eingesät. Nach einer Anheftungsphase von 2 Stunden standen sie für Experimente bereit.
- Kultur unter nicht-proliferativen Bedingungen
Lk004-Zellen wurden in Dichten von 1250 bis 40000 Zellen/MTP-Well in Anzuchtmedium eingesät. Nach 6 Stunden wurde ein Mediumwechsel zu RPMI 1640 ohne FKS (mit NaHCO_3 , Zusätzen) durchgeführt. Nach weiteren 18 Stunden wurden sie für die Experimente eingesetzt.
- Kultur unter nicht-proliferativen Bedingungen mit proliferativer Vorkultur
Lk004-Zellen wurden in Dichten bis 5000 Zellen/MTP-Well in Anzuchtmedium eingesät. Nach 72 Stunden hatten sie unter diesen Bedingungen Konfluenz erreicht. Es wurde ein Mediumwechsel zu RPMI 1640 ohne FKS (mit NaHCO_3 , Zusätzen) durchgeführt. 24 Stunden später wurden die Zellen für Untersuchungen eingesetzt.

- Kultur unter nicht-proliferativen Bedingungen mit proliferativer Vorkultur und Selen-Zusatz
Im Unterschied zum vorhergehenden Protokoll wurde dem Anzuchtmedium hier Na_2SeO_3 in einer Endkonzentration von 60 nM zugesetzt. Beim folgenden Mediumwechsel wurde weiterhin Selenit-freies Medium verwendet.
- Kultur unter nicht-proliferativen Bedingungen mit proliferativer Vorkultur mit Selen-Zusatz und Wechsel zu HEPES-gepuffertem Medium
Im Unterschied zum vorhergehenden Protokoll wurde nach der Vorkultur zu RPMI 1640 Medium mit HEPES (25 mM) und NaHCO_3 , Zusätzen ohne FKS gewechselt.

Für die Aussaat in Mikrotiterplatten wurden die zur Verfügung stehenden 96 Wells nach folgendem Schema aufgeteilt:

V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
V	B	MK	LK	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	V
V	B	MK	LK	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	V
V	B	MK	LK	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	V
V	B	MK	LK	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	V
V	B	MK	LK	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	V
V	B	MK	LK	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	V
V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V

Kürzel	Inhalt	Beschreibung
V	Verdunstungsschutz	Kulturmedium ohne Zellen
B	Blank	Kulturmedium ohne Zellen
MK	Medium-Kontrolle	nicht-exponierte Zellen in Kulturmedium
LK	Lösungsmittel-Kontrolle (optional)	nicht-exponierte Zellen in Kulturmedium + Lösungsmittel der Prüfsubstanz
P[1..7]	Prüfsubstanz [Konzentration 1 bis 7]	Zellen exponiert gegen Prüfsubstanz der Konzentration 1 bis 7 mit Lösungsmittel (Konzentration des Lösungsmittels konstant über alle Prüfsubstanzkonzentrationen)

2.1.3.4 Zellsystem LK004: Anzucht auf Transwells im 12-Well-Format

Das Protokoll für diese Kulturführung entsprach den letztgenannten Bedingungen für die Anzucht in Mikrotiterplatten. Es wurde eine Zellzahl von $3,5 \times 10^4$ Zellen/ $1,07 \text{ cm}^2$ Wachstumsfläche (Transwell-Inserts Fa. Falcon 3181) in Anzuchtmedium unter Selenit Zusatz eingesät. Nach 72 Stunden wurde das Medium über dem dann konfluenten Zellrasen zu HEPES-RPMI Medium gewechselt. Weitere 24 Stunden später standen die Zellen für Experimente zur Verfügung. Zur Exposition und Nachinkubation wurde das genannte Kulturmedium mit Gentamycin in einer Konzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$ versetzt.

2.2 Zellexpositionen

Die in diesem Abschnitt beschriebenen Methoden stellen die Routine-Durchführungen nach entsprechender Optimierung dar. Eine Beschreibung der Variationen, etwa bei der Durchführung von Screening-Experimenten oder bei der Entwicklung des Gasexpositionsaufbaus finden sich bei der Darstellung der Ergebnisse (vgl. Kapitel 3).

2.2.1 Expositionen gegen Modellgase nach gängigem air/liquid-Konzept

2.2.1.1 Aufbau

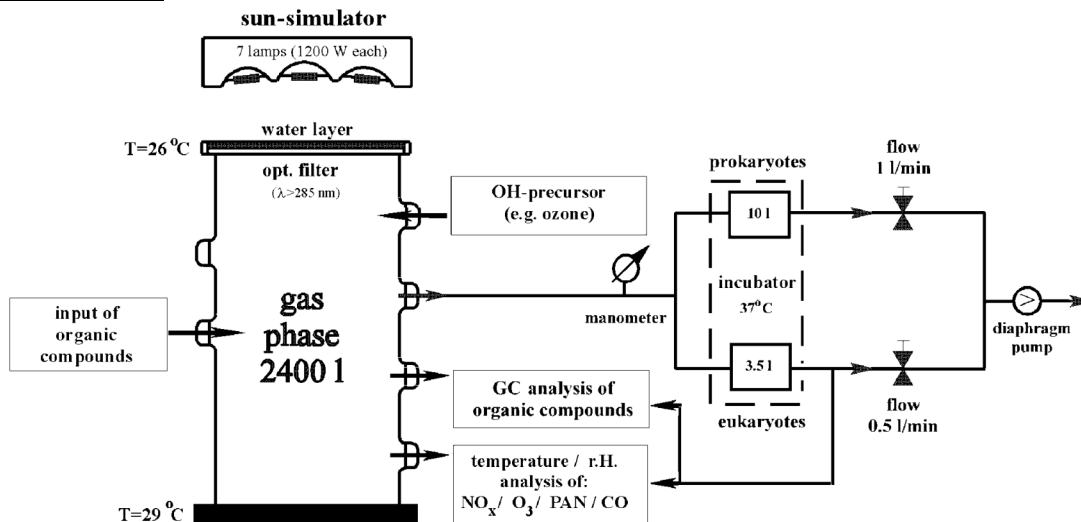


Abb. 2.1 Aufbau zur Exposition von eukaryontischen Zellen *in vitro* gegen Gase (Palm *et al.*, 1998)

Der experimentelle Aufbau bestand aus einer Smogkammer (Behnke *et al.*, 1988) (2400 l) zur Darstellung und Konditionierung der Gasmischungen. Über der Kammer befand sich ein Sonnensimulator (7 Lampen, jeweils 1200W, Osram, Metallogen-HMI, optischer Filter, Duran-Glas), mit dem die Gase mit Wellenlängen > 285 nm bestrahlt werden konnten. Druck, Temperatur und relative Feuchte konnten innerhalb der Kammer kontrolliert werden. Die Gase wurden für die Bedingungen 25 +/- 2 °C (Dunkelreaktion), 28 +/- 2 °C (Hellreaktion), und 45 +/- 5% rH konditioniert. Zur

Analyse der Gaskomponenten wurden NO_x- (UPK, Modell 01C), Ozon- (Beckmann, Modell RGA2) und PAN (Scintrex, verändertes Modell LPA-4) Analysatoren und ein Gaschromatograph (Sichromat I, Siemens) genutzt. Die Analyse wurde durch Probenahme aus der Gasreaktionskammer und aus dem Gasstrom hinter der Expositionsbox durchgeführt. Angegebene Gaskonzentrationen beziehen sich auf Analysen aus der Smogkammer. Die Gasmischungen wurden mit Hilfe einer Diaphragmapumpe mit einem Volumenstrom von 0,5 l/min durch die Expositionsbox transportiert. Die Expositionsbox (Methylmethacrylat) hatte ein Volumen von 3,5 l und stand zur Thermostatisierung bei 37 °C in einem modifizierten Inkubator. In der Expositionsbox fanden 4 6-Well Platten zur Aufnahme von eukaryontischen Zellen auf Transwells im 6-Well-Format Platz. Drei Transwells je Platte wurden dabei gegen den Gasstrom mit einer halben Deckelplatte abgedeckt und dienten als Kontrolle (hier genannt: „REFERENZ-Zellen“).

2.2.1.2 Expositions-gase /-gasmischungen

Die Bereitstellung und Analyse der Expositions-gase sowie die Realisation des Expositions-aufbaus wurde von der Abteilung Atmosphärische Chemie des Fraunhofer ITA geleistet.

Expositions-gas	Konzentration [ppb]	Nebenbestandteile [ppb]
Reinluft	-	aufgearbeitete Umgebungsluft, neben den üblichen Konzentrationen von O ₂ , N ₂ CO ₂ und Edelgasen: CO (30), N ₂ O (180), H ₂ (500), CH ₄ (1400), NO, NO ₂ , Ozon , (jeweils < 1), 1,6 % (v/v) H ₂ O
Methacrylsäure-methylester	1000	vor RL-Matrix, zusätzlich: Ethanol (4800)
Ozon	235, 500, 941	vor RL-Matrix
Stickstoffdioxid	89, 186, 359	vor RL-Matrix, zusätzlich: NO (2)
PAN	20, 88, 183	NO (< 1), NO ₂ (5-10), O ₃ (60-180), Ethylnitrit (2-10), Acetaldehyd (13,6-170), CO (91-200)
KW	Mischung aus Kohlenwasserstoffen	Acetaldehyd (11,3-12,5), Butan (200-208), Pentan (130-134), Isopren (5-7,6), Hexan (115-117), Benzol (59-61), Toluol (97-99), CO (52-101), NO, NO ₂ , PAN (jeweils < 1), Ozon (< 3)
KW, hell	Mischung aus Kohlenwasserstoffen	Bestrahlung der KW Mischung während der Exposition mit Sonnensimulator
KW, hell, NO ₂	Mischung Zusatz NO ₂ 12,5	PAN (102), Ozon (613)
	Mischung Zusatz NO ₂ 31,5	PAN (219), Ozon (986)

2.2.1.3 Exposition

Es wurden R3/1-Rattenlungenzellen auf Transwells im 6-Well-Format verwendet. Frühestens 18 Stunden nach der Aussaat wurden diese zweimal mit PBS gespült. Danach wurde Expositionsmedium (ohne FKS, NaHCO₃, Zusätze, („REFERENZ“ , „GAS“)) oder Inkubator-kontrollmedium (ohne FKS, mit NaHCO₃ und Zusätzen, „INKUBATOR“) in die Compendium-Plates unter die Inserts gegeben. INKUBATOR-Zellen wurden unter zelltypspezifischen Bedingungen für 3 Stunden air/liquid im Brutschrank inkubiert.

Referenz- und Gas-Zellen wurden in Compendium-Plates in die Expositionsbox gebracht, wobei die Referenz-Zellen mit einem halben Compendium-Plate Deckel gegen den Gasstrom abgeschirmt wurden. Nach einer Konditionierungszeit von 5 Minuten betrug die Expositionszeit 3 Stunden. Im Anschluß an die Exposition wurden die Transwells der Expositionsbox entnommen und direkt zur Analytik aufgearbeitet. Es wurden die Parameter DNA, Tetrazoliumsalzumsatz (WST-1), Aktivität unspezifischer Esterasen, Aktivität der Glutathion-S-Transferasen, BrdU-Einbau und Lactat-Dehydrogenase-Freisetzung in das Kulturmedium gemessen.

2.2.2 Expositionen gegen *tert*-Butylhydroperoxid und Wasserstoffperoxid

Zur submersen Exposition von Lk004-Zellen in Mikrotiterplatten gegen Verdünnungen von *tert*-Butylhydroperoxid und Wasserstoffperoxid wurden Zellaussaten entsprechend der Kulturführung unter nicht-proliferativen Bedingungen mit proliferativer Vorkultur verwendet. Es wurden 11-fach konzentrierte Behandlungslösungen von tBuOOH und H₂O₂ in Wasser zum Erhalt der angegebenen Endkonzentrationen hergestellt.

Substanz	Endkonzentrationen im Behandlungsansatz [mM]								
tBuOOH	0,01	0,1	0,3	0,5	0,7	0,9	1,1	1,5	
H ₂ O ₂	0,05	0,2	0,35	0,5	0,65	0,8	0,95	1,1	

24 Stunden nach der Umstellung der Kultur auf nicht-proliferative Bedingungen durch Wechsel des Zellkulturmediums zu FKS-freiem Zellkulturmedium wurde mit der Exposition begonnen. Dazu wurden unter sterilen Bedingungen 10 µl der 11-fach konzentrierten Behandlungslösung zu 100 µl Zellkulturmediumüberstand pipettiert. Bei diesem Vorgang fand kein Mediumwechsel statt. Nach einer Expositionszeit von zwei Stunden wurde das Medium gegen frisches Kulturmedium ohne Behandlungssubstanz (NaHCO₃, Zusätze, kein FKS) getauscht. Nach der angegebenen Zeit fand die Aufarbeitung der Zellen zur Analyse statt. Es wurden die Parameter entsprechend der folgenden Tabelle gemessen.

Substanz	Zeitpunkt [h]	Parameter
tBuOOH, H ₂ O ₂	1 - 24 Stunden variabel	Gesamtglutathion Glutathion-Peroxidase Glutathion-Reduktase ATP/ADP
H ₂ O ₂	24 Stunden	DNA-Gehalt Tetrazoliumsalzumsatz (WST-1)
tBuOOH	24 Stunden	DNA-Gehalt Tetrazoliumsalzumsatz (WST-1) Katalase LDH (Medium) Phosphofruktokinase Enolase Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase Superoxid-Dismutase

Die Zellen wurden für den Expositionszeitraum wie auch für die Nachinkubationszeit unter zelltypspezifischen Bedingungen im Brutschrank inkubiert.

2.2.3 Expositionen gegen Zigarettenrauchkondensat

Für die Exposition gegen Zigarettenrauchkondensat wurde Rauchkondensat der Studienzigarette „K1R4F“ verwendet. Die Zigarette K1R4F ist ein durchschnittlicher full-flavor low-tar Zigarettentyp für den amerikanischen Zigarettenmarkt und wurde als Referenz-Standard für Forschungszwecke entwickelt (Steele *et al.*, 1995).

Lk004-Zellen wurden entsprechend der Kulturführung unter nicht-proliferativen Bedingungen mit proliferativer Vorkultur und Selenzusatz vorbereitet. 24 Stunden nach Wechsel zu FKS-freiem Medium wurden 10 µl 11-fach konzentrierter Lösungen von Zigarettenrauchkondensat in DMSO zu 100 µl Zellkulturmediumüberstand gegeben. Die erhaltenen Endkonzentrationen für das Kondensat waren dabei 2,5 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml, 25 µg/ml, 50 µg/ml, 75 µg/ml, 100 µg/ml. Die Endkonzentration für den Lösungsvermittler DMSO lag unabhängig von der Kondensatkonzentration bei 1%. Für diese Experimente wurde eine Lösungsmittelkontrolle (DMSO, 1 %) mitgeführt, die als Bezugsgröße für die Berechnung der %-Kontrolle aller Meßwerte eingesetzt wurde. Bei dieser Exposition wurde kein Mediumwechsel durchgeführt, sondern die Behandlungssubstanz in Kulturmedium/DMSO (1%) für maximal 24 Stunden über den Zellen belassen. Nach 1,5 Stunden und 24 Stunden Inkubationszeit wurden die Parameter DNA-Gehalt und Tetrazoliumsalzumsatz (WST-1) bestimmt. Zu diesen Zeitpunkten und zusätzlich zu dem Zeitpunkt 6 Stunden Inkubation fand eine Analyse der Parameter Phosphofruktokinase-Aktivität, Enolase-Aktivität, ATP-Gehalt (Luminometrie), ADP/ATP-Gehalt (HPLC), Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase-Aktivität, Glutathion-Peroxidase-Aktivität, Glutathion-S-Transferase-Aktivität, Katalase-Aktivität, Superoxid-Dismutase-Aktivität, Glutathion-Reduktase-Aktivität, Gesamtglutathion-Gehalt, Gehalt an reduziertem Glutathion, Gehalt an oxidiertem Glutathion und Lactat-Dehydrogenase-Freisetzung in das Kulturmedium statt.

2.2.4 Expositionen gegen Gase im neu entwickelten Expositionsaufbau

2.2.4.1 Aufbau

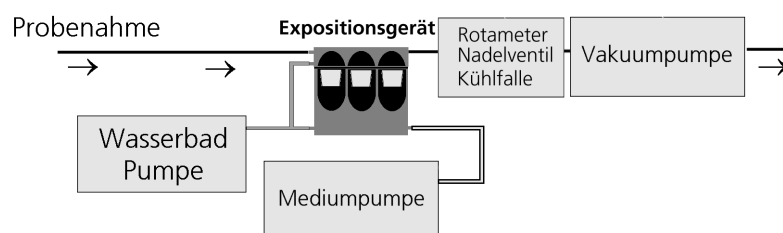


Abb. 2.2 Aufbau zur Gasexposition in neu etabliertem Expositionsaufbau

Zentraler Bestandteil des Aufbaus war die Expositionseinheit. Sie bestand aus einem Unterteil, welches der Aufnahme und Thermostatisierung von 3 Transwells im 12-Well-Format mit Hilfe eines Wasserbades mit Pumpe diente. Die Transwells wurden darin durch ein Leitungssystem mit Medium versorgt. Dieses wurde durch eine peristaltische Mediumpumpe mit dem Fluß 1 ml/min zu- und abgepumpt. Das Oberteil beinhaltete ein ebenfalls durch das Wasserbad thermostatisiertes Leitungssystem für das Expositionsgas, welches mit Hilfe einer Vakuumpumpe, Rotameter und Nadelventil mit dem Fluß 25 ml/min durch die Expositionseinheit gezogen wurde. Die Umsetzung der Entwürfe zur Entwicklung der Expositionseinheit wurde in Zusammenarbeit mit der Glastechnischen Werkstatt der Medizinischen Hochschule Hannover durchgeführt. Die Expositionseinheit wird detailliert in Kapitel 3.6 beschrieben.

2.2.4.2 Expositionsgase

Die Kalibrierung der Expositionsgaskonzentrationen für Ozon und Stickstoffdioxid wurde durch die Abteilung Atmosphärische Chemie am Fraunhofer ITA durchgeführt.

Expositionsgas	Konzentrationen [ppb]	Zusammensetzung, Darstellung
synthetische Luft	-	Sauerstoff (20,5%), Stickstoff (79,5 %) Druckflasche (Messer-Griesheim)
Stickstoffdioxid	75 - 1200	Vermischung mit synth. Luft Druckflasche
Ozon	125 - 2250 ppb	Photoreaktion durch Bestrahlung der synthetischen Luft im Durchfluß mit Penray- Lampe (Oriol Sarl, Paris) und Vermischung mit synth. Luft

Die Vermischung der Gase mit synthetischer Luft wurde durch die Verwendung von Mass Flow Controllern (Tylan, FC-260, FC-280, FC-2900) gesteuert. Zur teilweise durchgeführten Befeuchtung der synthetischen Luft wurde diese durch eine mit Wasser gefüllte Gaswaschflasche geleitet. Aus einem Gasstrom (Fluß > 0,1 l/min) wurde mittels eines T-Stückes ein kleinerer Strom (25 ml/min) zur Zellexposition abgezogen (vgl. Abb. 2.2: Punkt „Probenahme“).

2.2.4.3 Quantifizierung der Expositionsgase in Transwell-Inserts

Ozon-Reagenz: gesättigte Stärke-Lösung (25 °C), KI (0,1M) in Wasser
 NO₂-Reagenz: Sulfanilsäure (5 g/l), N-[Naphtyl-(1)]-ethylendiammoniumdichlorid (50 mg/l),
 Eisessig (50 ml/l) in Wasser (Bestimmung nach Saltzman)
 Standards (NO₂): Natriumnitrit (2 - 20 µM) in Wasser

Es wurden jeweils 140 µl des Meßreagenzes in ein Transwell gegeben. Nach Ablauf der Expositionszeit (variabel, vgl. Kapitel 3.6.3.2) wurden 100 µl Wasser zugegeben, vermischt und 100 µl der Mischung in eine Mikrotiterplatte überführt, in der die Absorption im Mikrotiterplatten-Reader bei den Wellenlängen 562 nm (Ozon) bzw. 550 nm (Stickstoffdioxid) gemessen wurde.

2.2.4.4 Exposition

Es wurden Lk004-Zellen und HFBE-Zellen auf Transwells im 12-Well-Format verwendet. 24 Stunden nach Umstellung auf FKS-freie Kulturführung wurden die Zellen mit PBS gespült und in die Expositionseinheit eingebracht. Nach Abschluß der Exposition wurden sie unter zelltypspezifischen Bedingungen submers nachinkubiert und standen dann zur Aufarbeitung zur Analytik bereit. Die Expositions- und Nachinkubationszeiten variierten im Bereich von von wenigen Minuten bis 4 Stunden bzw. 2 bis 24 Stunden und sind bei den entsprechenden Ergebnissen angegeben. Es wurden die Parameter Zellzahl, Tetrazoliumsalzumsatz (WST-1), oxidiertes und reduziertes Glutathion und Gehalt an ADP und ATP gemessen.

2.3 Analyse biochemischer Endpunkte

Die in diesem Abschnitt beschriebenen Methoden stellen jeweils das Ergebnis der Etablierungen der Assays dar, welche nach ihrer Validierung in die Routine-Anwendung übernommen wurden. Die einzelnen Etablierungsschritte oder Assayvariationen, welche der Optimierung oder Validierung dienten, werden ebenso wie Methoden, welche sich als weniger geeignet für den geplanten Einsatz erwiesen, im Abschnitt „Ergebnisse“ genannt.

Wird eine Methode zur Analytik in Mikrotiterplatten beschrieben, so beziehen sich Volumenangaben, wenn nicht anders genannt, immer auf ein einzelnes Well.

Die Assays wurden für eine Anwendung in der Routine-Testung etabliert. Es wird daher eine „Kit“-artige Durchführung der Methoden beschrieben. Dazu gehört die Formulierung der Reaktionskomponenten in ein „Extraktionsreagenz“, einen „Premix“ und ein „Start-Reagenz“. Während der Durchführung werden mit dem Extraktionsreagenz die Enzymaktivitäten freigestellt oder Metaboliten zur Analyse aufbereitet. Das Premix wird dann für eine Konditionierungsphase des Assays (Temperatur, Gleichgewichtseinstellung) auf die Zellaussaten gegeben. Es folgt die Zugabe des Start-Reagenzes, welches die Meßreaktion in Gang setzt, und unmittelbar darauf die Messung im Mikrotiterplatten Meßgerät. Die für die Zusammensetzung der Assay-Komponenten (Extraktionreagenz, Premix, Start-Reagenz) angegebenen Konzentrationen verstehen sich als Konzentrationen in diesen Formulierungen.

2.3.1 Reagenzien, Materialien und Geräte allgemeiner Verwendung

HPLC-Anlage

Degasser GT 154
Probengeber SIL-10Advp
Säulenofen CTO-10A
Systemcontroller SCL-10A
2 Pumpen mit hochdruckseitiger
Mischung LC-10AT
Diodenarray-Detektor SPD-M10Avp
Auswerte-Software Class VP 4.2

Shimadzu
(alle Geräte HPLC)

MTP-Luminometer	Luminoskan RS	Labsystems
MTP-Fluoreszenzmeßgerät	Fluoroskan Ascent	Labsystems
MTP-UV/Vis Photometer	Elx808	BioTek
Küvetten-Spektrophotometer	UV-2101PC	Shimadzu
Küvetten-Spektrofluorophotometer	RF-1501	Shimadzu
Mikrotiterplatten-Schüttler (heizbar)	SH-26	CAT
Mikrotiterplatten-Schüttler	MS1	IKA
Mikrotiterplatten-Washer	M8/4R	Tecan
Absaugkamm für MTP	Immuno-Wash 12	Nunc
elektronische Zellzählung	CASY	Schärfe Systeme
Reagenzien (soweit nicht anders genannt)		Sigma

2.3.2 Durchführung der Analytik

2.3.2.1 Bestimmung der Zellzahl auf 12-Well-Transwell-Inserts durch elektronische Zellzählung

Der Überstand von Zellaussaaten in Transwells wurde durch Abgießen entfernt. Die Zellen wurden bei 37 °C für 4 Minuten mit 500 µl Trypsinlösung (0,25% Trypsin, 0,02 % EDTA in PBS, Biochrom/Seromed) inkubiert. Die abgekugelten Zellen wurden nach Ablauf dieser Zeit unter lichtmikroskopischer Kontrolle mit der Pipette vorsichtig vollständig suspendiert. 100 µl der Zellsuspension wurden abgenommen und im elektronischen Zellzählgerät nach Herstellerangaben auf Zellzahl und Größenverteilung analysiert.

2.3.2.2 Messung des DNA-Gehaltes von Zellen in Mikrotiterplatten mit PicoGreen®

Mit dem MTP-Washer oder dem Absaugkamm wurde der Mediumüberstand von Zellaussaaten in MTP entfernt. Die Zellen wurden durch 5minütiges Einwirken von 100 µl Ethanol (abs.) bei Raumtemperatur fixiert. Der Überstand wurde abgesaugt und die Zellen weitere 5 Minuten mit 100 µl TNE (10 mM TRIS, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, pH 7,4) inkubiert. Es wurden 100 µl PicoGreen Gebrauchslösung (Molecular Probes, PicoGreen Verdünnung 1:200 in TNE) hinzugefügt. Nach 10minütiger Reaktionszeit bei Raumtemperatur unter Schütteln der MTP wurde die Fluoreszenz bei den Wellenlängen 485nm (Anregung)/538 nm (Emission) im Mikrotiterplatten-Fluoreszenzreader gemessen. Die Analyse konnte direkt nach einer Untersuchung des Tetrazoliumsalzumsatzes (WST-1) an denselben Zellen vorgenommen werden.

2.3.2.3 Messung des DNA-Gehaltes von Zellen in 6-Well-Transwell-Inserts mit PicoGreen®

Die Methode basierte auf der DNA-Messung in Mikrotiterplatten. Verändert wurden die Volumen aller Lösungen von 100 µl auf 3 ml. Die Messung fand nach Anpassung des Meßfeldes des Fluoreszenzreaders ebenfalls direkt an den auf der Membran adhärenen Zellen statt. Auch diese Messung wurde direkt nach der Bestimmung des Tetrazoliumsalzumsatzes an denselben Zellen durchgeführt.

2.3.2.4 Messung des DNA-Gehaltes von Zellen in Mikrotiterplatten mit Hoechst 33258

Von Zellaussaten in Mikrotiterplatten wurde der Mediumüberstand entfernt. Es wurden 100 µl Fixierungsreagenz (Methanol/Eisessig 3+1) zugegeben und die Zellen damit 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Das Fixierungsreagenz wurde entfernt und der Vorgang einmalig wiederholt. Nach einer 10minütigen Inkubation bei RT wurde das Fixierungsreagenz von neuem entfernt und die MTP auf dem heizbaren Mikrotiterplatten-Schüttler bei 37 °C getrocknet. Nach ca. 10 Minuten wurden 100 µl einer Hoechst-Gebrauchslösung (Farbstoff Hoechst 55238 10 µg/ml in NaCl/TNE (2M NaCl in TNE)) zugegeben. Nach einer Reaktionszeit von genau 10 Minuten unter Schütteln auf dem Mikrotiterplatten-Schüttler wurde 3 mal mit je 100µl NaCl/TNE gewaschen und jedes Well mit 50 µl NaCl/TNE aufgefüllt. Im Fluoreszenz-Mikrotiterplatten-Reader wurde sofort eine Messung bei den Wellenlängen 355 nm (Anregung)/485 nm (Emission) durchgeführt.

2.3.2.5 Messung des Protein-Gehaltes von Zellen in Mikrotiterplatten

Es wurde der „Fluoreporter Colorimetric Cell Protein Assay Kit“ (Molecular Probes) nach Angaben des Herstellers verwendet. Die Fluoreszenzmessung wird im Mikrotiterplatten-Fluoreszenz-Reader durchgeführt.

2.3.2.6 Messung der Lactat-Dehydrogenase-Freisetzung von Zellen in MTP und Transwells

Zur Messung der Lactat-Dehydrogenase-Freisetzung wurde die Aktivität des Enzyms im Kulturmedium bestimmt. Dazu wurden in Mikrotiterplattenaussaaten jeweils 50 µl aus 3 parallel behandelten Wells abgenommen und getrennt analysiert. Zur Messung in Transwells wurden 150 µl Medium je Insert abgenommen und ebenfalls in 50 µl Aliquots geteilt. Zur Aktivitätsbestimmung wurde der „Cytotoxicity Detection Kit (LDH)“ (Boeringer, Mannheim) nach Angaben der Herstellers verwendet. Die photometrische Messung fand nach 20minütiger Reaktionszeit bei RT im Mikrotiterplatten-Reader bei den Wellenlängen 490 nm/630 nm statt.

2.3.2.7 Messung des Tetrazoliumsalzumsatzes (WST-1) von Zellen in MTP und Transwells

Mikrotiterplatten

Zum Meßzeitpunkt wurden zu 100 µl Kulturmedium Überstand 10 µl WST-1 Farbstoff gegeben. Die Zellen wurden 60 Minuten unter zelltypspezifischen Bedingungen im Brutschrank inkubiert. Danach wurde die Kulturmedium-Farbstofflösung vorsichtig durchmischt und bei Schaumbildung gegebenenfalls mit 10 µl Ethanol (abs.) versetzt. Die Messung der Absorption wurde im Mikrotiterplatten-Reader bei den Wellenlängen 450 nm/ 630 nm durchgeführt. Nach der Messung wurde die Kulturmedium-Farbstofflösung abgenommen und dieselben Zellen für die Analyse des DNA-Gehaltes bereitgestellt.

Transwells im 6-Well-Format

Das Expositionsmedium wurde gegen 1 ml RPMI 1640 mit NaHCO₃, Zusätzen, ohne FKS getauscht. Es wurden 100 µl WST-1 Farbstoff (Boehringer, Mannheim) zugesetzt und mit dem Medium vermischt. Die Zellen wurden 60 Minuten unter zelltypspezifischen Bedingungen im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Nach dieser Zeit wurde der Mediumüberstand vorsichtig durchmischt und in 6 x 100 µl in eine Mikrotiterplatte aliquotiert. Die Messung wurde im Mikrotiterplatten-Reader bei den Wellenlängen 450 nm/ 630 nm durchgeführt. Nach der Messung wurde das Farbstoff/Medium-Gemisch abgenommen und dieselben Zellen für die Analyse des DNA-Gehaltes bereitgestellt.

Transwells im 12-Well-Format

Es wurden 50 µl Farbstoff WST-1 zu 500 µl Mediumüberstand in die Inserts gegeben. Die Zellen wurden 60 Minuten unter zelltypspezifischen Bedingungen bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Nach dieser Zeit wurde der Mediumüberstand vorsichtig durchmischt und in 3 x 100 µl in eine Mikrotiterplatte aliquotiert. Die Messung wurde im Mikrotiterplatten-Reader bei den Wellenlängen 450 nm/ 630 nm durchgeführt. Nach der Messung wurde das Kulturmedium-Farbstofflösung abgenommen und dieselben Zellen für die elektronische Zellzahlbestimmung und -größenverteilung bereitgestellt.

2.3.2.8 Messung des Tetrazoliumsalzumsatzes (MTT) von Zellen in Mikrotiterplatten

Es wurden 15 µl Dye-Solution (Cell Titer 96 Non-Radioactive Proliferation Assay, Promega) in 100 µl Zellkulturmedium Überstand gegeben. Die Zellen wurden eine Stunde unter zelltypspezifischen Bedingungen bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Danach wurden 100 µl Solubilization-Solution dazugegeben und die Platte eine weitere Stunde unter den gleichen Bedingungen inkubiert. Anschließend wurde die Farbstofflösung im Well vorsichtig durchmischt. Bei Schaumbildung wurde diese durch Zusatz von 10 µl Ethanol (abs.) entfernt. Es folgte eine Absorptionmessung bei 562 nm/630 nm im Mikrotiterplatten-Reader.

2.3.2.9 Bestimmung der BrdU-Einbaurrate von Zellen in Transwells im 6-Well-Format

Es wurde ein ELISA-Assay mit colorimetrischer Detektion verwendet (Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric), Boehringer, Mannheim). Das Expositionsmedium über den Zellen wurde gegen RPMI 1640 mit NaHCO₃, Zusätzen, ohne FKS getauscht. Danach wurden die Zellen 2 Stunden unter zelltypspezifischen Bedingungen inkubiert und entsprechend den Angaben des Herstellers weiterbehandelt. Die Absorptionmessung fand bei den Wellenlängen 450 nm/630 nm im Mikrotiterplatten-Reader statt.

2.3.2.10 Messung der Aktivität unspesz. Esterasen in Transwells im 6-Well-Format

Nach Entfernung des Expositionsmediums wurden die Zellen 10 Minuten in einer 4-Methylumbelliferyl-heptanoat-Lösung in PBS (0,2 mM) bei Raumtemperatur behandelt. Die Fluoreszenz wurde nach Anpassung des Meßfeldes direkt auf den

Transwells bei den Wellenlängen 355 nm (Anregung) und 460 nm (Emission) im Mikrotiterplatten-Reader gemessen (Dotsika *et al.*, 1987).

2.3.2.11 Messung der Aktivität der Phosphofruktokinase in Mikrotiterplatten

Extraktionsreagenz: 0,5 % Triton X-100 in PBS
 Premix: KCl (67 mM), ATP (2,7 mM), MgSO₄ (6,7 mM), Fruktose-6-Phosphat (2,7 mM), NADH (0,21 mM), Dithioerythritol (1,3 mM) in TRIS (44mM) pH 8,0
 Startreagenz: GDH/TIM (10 units bzw. 100 units/ml), Aldolase (13 U/ml) in 1 TRIS (11 mM)

Der Mediumüberstand von Zellaussaaten in MTP wurde entfernt. Die Zellen wurden zweimal mit PBS gespült. Es wurde eine Enzymextraktion durch 15minütige Inkubation in 50 µl Extraktionsreagenz bei Raumtemperatur durchgeführt. Es wurden 138 µl Premix zugegeben und der Assay 5 Minuten bei 37 °C auf dem heizbaren Mikrotiterplattenschüttler vorinkubiert. Die Reaktion wurde mit 12 µl Startreagenz in Gang gebracht. Die Absorptionsänderung wurde bei 37 °C im Mikrotiterplatten-Reader kinetisch in 40 Messungen mit Intervallen von 15 s unter Schütteln der MTP bei 340 nm verfolgt.

2.3.2.12 Messung der Aktivität der Enolase in Mikrotiterplatten

Extraktionsreagenz: 0,5 % Triton X-100 in PBS
 Premix: NADH (0,3 mM), ADP (3,1 mM), 2-Phosphoglycerinsäure (1,6 mM) in Puffer (104,1 mM KCl, 10,3 mM MgSO₄, 4,4 mM EDTA, 74,4 mM Imidazol, pH 7,5)
 Startreagenz: Pyruvat Kinase (26 U/ml), Lactat-Dehydrogenase (380 U/ml) in Puffer (s. Premix) (Durchführung vgl. Kapitel 2.3.2.11 Messung der Aktivität der Phosphofruktokinase in Mikrotiterplatten)
 Extraktion: 50 µl Extraktionsreagenz, 15 min., RT
 Premix: 140 µl, 5 min, 37 °C
 Messung: 10 µl Startreagenz, 37 °C, 40 x, 15 s Intervalle, Schütteln, 340 nm im Mikrotiterplatten-Reader

2.3.2.13 Messung der intrazellulären Aktivität von Glutathion-S-Transferasen

Extraktionsreagenz: 0,5 % Triton X-100 in PBS
 Premix: 1-Chlor-2,4-dinitrophenol (1 mM) in Puffer (72 mM Kaliumphosphat pH 6,5)
 Startreagenz: Glutathion, reduziert (16 mM) in Puffer, pH 6,5

Mikrotiterplatte

(Durchführung vgl. Kapitel 2.3.2.11 Messung der Aktivität der Phosphofruktokinase in Mikrotiterplatten)

Extraktion: 10 µl Extraktionsreagenz, 15 min., RT
 Premix: 140 µl, 5 min, 37 °C
 Messung: 10 µl Startreagenz, 37 °C, 40 x, 15 s Intervalle, Schütteln, 340 nm im Mikrotiterplatten-Reader

Transwells im 6-Well-Format

Zur Extraktion wurden die Zellen auf Transwells 15 Minuten mit 500 µl Extraktionsreagenz inkubiert. Der Extrakt wurde in 50 µl Aliquots in die Mikrotiterplatte überführt und von dort an entsprechend dem Vorgehen bei der Untersuchung von Zellaussaaten in Mikrotiterplatten behandelt.

2.3.2.14 Messung der Aktivität der Glutathion-Reduktase in Mikrotiterplatten

Extraktionsreagenz:	0,5 % Triton X-100 in PBS
Premix:	5,5'-Dithio-bis-(2-nitrobenzoesäure) (DTNB, Ellmann's Reagenz, 0,75 mM), Glutathion, oxidiert (2,5 mM) in Puffer (100 mM KH_2PO_4 , 1mM EDTA, pH 7,5)
Startreagenz:	NADPH (3,5 mM) in Puffer (s. Premix)
(Durchführung vgl. Kapitel 2.3.2.11 Messung der Aktivität der Phosphofruktokinase in Mikrotiterplatten)	
Extraktion:	50 μl Extraktionsreagenz, 15 min., RT
Premix:	140 μl , 5 min, 37 °C
Messung:	10 μl Startreagenz, 37 °C, 40 x, 30 s Intervalle, Schütteln, 405 nm im Mikrotiterplatten-Reader

2.3.2.15 Messung der Aktivität der Glutathion-Peroxidase in Mikrotiterplatten

Extraktionsreagenz:	0,5 % Triton X-100 in PBS
Premix:	NADPH (0,25 mM), Glutathion, reduziert (1,6 mM) pH 7,0, Glutathion-Reduktase (1,25 U/ml) in Puffer (100 mM KH_2PO_4 , 1mM EDTA, pH 7,0)
Startreagenz:	<i>tert.</i> -Butylhydroperoxid (22,5 mM) in H_2O
(Durchführung vgl. Kapitel 2.3.2.11 Messung der Aktivität der Phosphofruktokinase in Mikrotiterplatten)	
Extraktion:	50 μl Extraktionsreagenz, 15 min., RT
Premix:	120 μl , 5 min, 37 °C
Messung:	10 μl Startreagenz, 37 °C, 40 x, 30 s Intervalle, Schütteln, 340 nm im Mikrotiterplatten-Reader

2.3.2.16 Messung der Aktivität der Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase in MTP

Extraktionsreagenz:	0,5 % Triton X-100 in PBS
Premix I:	Glucose-6-Phosphat (3,77 mM) in Puffer (57 mM TRIS, 7 mM MgCl_2 , pH 7,5)
Premix II:	Glucose-6-Phosphat (3,77 mM), Maleinimid (5,7 mM) in Puffer (57 mM TRIS, 7 mM MgCl_2 , pH 7,5)
Startreagenz:	NADP (8,6 mM) in H_2O

Der Mediumüberstand von Zellaussaaten in MTP wurde entfernt. Die Zellen wurden zweimal mit PBS gespült. Es wurde eine Enzymextraktion durch 15minütige Inkubation in 25 μl Extraktionreagenz bei Raumtemperatur durchgeführt. In die oberen drei Reihen Zellaussat wurden 165 μl Premix I zugegeben (gemeinsame Aktivitäten der Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase und der 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase). In die unteren drei Reihen Zellaussat wurden 165 μl Premix II zugegeben (Aktivität der Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase). Der Assay wurde 5 Minuten bei 37 °C auf dem heizbaren Mikrotiterplattenschüttler vorinkubiert. Die Reaktion wurde mit 10 μl Startreagenz in Gang gebracht. Die Absorptionsänderung wurde bei 37 °C im Mikrotiterplatten-Reader kinetisch in 40 Messungen mit Intervallen von 15 s unter Schütteln der MTP bei 340 nm verfolgt.

2.3.2.17 Messung der peroxidativen Katalase-Aktivität in Zellaussaaten in Mikrotiterplatten

Extraktionsreagenz:	0,5 % Triton X-100 in PBS
Premix:	Methanol (5,5 M), H_2O_2 (0,4 mM) in Puffer (250mM KH_2PO_4 , pH 7,0)
Purpald-Lösung:	Purpald (22,8 mM) in KOH (2M)
Kaliumperjodat-Lsg.:	KIO_4 (65,2 mM) in KOH (0,5 M)

Der Mediumüberstand von Zellaussaaten in MTP wurde entfernt. Die Zellen wurden zweimal mit PBS gespült. Es wurde eine Enzymextraktion durch 15minütige Inkubation in 40 µl Extraktionsreagenz bei Raumtemperatur durchgeführt. Es wurden 88 µl Premix zugegeben und 20 Minuten auf dem Mikrotiterplatten-Schüttler bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte die Zugabe von 120 µl Purpald-Lösung gefolgt von einer weiteren Inkubation für 20 Minuten bei Raumtemperatur unter Schütteln. Danach wurden 40 µl Kaliumperiodat-Lösung zugesetzt und der Reaktionsansatz mindestens 10 Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt. Eine eventuell vorhandene Schaumbildung wurde durch Zugabe von 10 µl Ethanol (abs.) entfernt. Innerhalb der nächsten 4 Stunden wurde eine photometrische Messung der Absorption im Mikrotiterplatten-Reader bei den Wellenlängen 565 nm/630 nm durchgeführt.

2.3.2.18 Messung der intrazellulären Aktivität der Superoxid-Dismutasen in Mikrotiterplatten

Extraktionsreagenz:	0,5 % Triton X-100 in PBS
Premix:	Lucigenin (210 µM), Xanthin Oxidase (20 mU/ml) in Puffer (0,1 M Glycin, 1 mM EDTA, 1 mM Natrium Salicylat, pH 9,0)
Startreagenz:	Hypoxanthin (25 µM) in Puffer (0,1 M Glycin, 1 mM EDTA, 1 mM Natrium Salicylat, pH 9,0)
Standards:	Ascorbinsäure ([1,2,4,8] nMole/50 µl) in Triton X-100 (0,165 % in PBS)

Vor der Messung wurde das Mikrotiterplatten-Luminometer durch Aufwärmen, sowie Befüllen und Primen des automatischen Dispensers mit Startreagenz vorbereitet.

Der Mediumüberstand von Zellaussaaten in MTP wurde entfernt. Die Zellen wurden zweimal mit PBS gespült. Es wurde eine Enzymextraktion durch 15minütige Inkubation in 25 µl Extraktionsreagenz bei Raumtemperatur durchgeführt. Danach wurden 50 µl PBS zugegeben und mit dem Triton X-100 Extrakt vermischt. Von diesem Gemisch und von den Standards wurden 50 µl in eine undurchsichtige, weiße Mikrotitermeßplatte (Labsystems) überführt. Nach Zugabe von 100 µl Startreagenz wurde die Platte in das Mikrotiterplatten-Luminometer überführt und gemessen. Dazu wurden 100 µl Startreagenz durch den automatischen Dispenser eingefüllt, die Platte 2 Sekunden bei maximaler Geschwindigkeit geschüttelt und eine Lumineszenzkinetik mit 5 Meßpunkten und einer Integrationszeit von 0,1 Sekunden aufgenommen. Der in dieser Zeit erhaltene maximale Meßwert war das Ergebnis der Analytik. Die erhaltenen Meßwerte in RLU wurden über eine getrennt gemessene Eichgerade mit Verdünnungen von SOD in die korrelierende Enzymmasse in der Einheit ng/Probe umgerechnet. Die mit jeder Analyse gleichzeitig gemessenen Standards dienten der Validierung und zeigten die Vergleichbarkeit jeder einzelnen Analyse mit der getrennt gemessenen Eichreihe.

2.3.2.19 Messung der Lipidperoxidationsprodukte in Mikrotiterplatten (MPI-Assay)

Extraktionsreagenz:	0,5 % Triton X-100 in PBS
Reagenz I:	1-Methyl-2-phenylindol (10,3 mM) in Acetonitril
Reagenz II:	Methansulfonsäure (15,4 M), gebrauchsfertig
Reagenz III:	Salzsäure (37 %) gebrauchsfertig

Zur Bestimmung der extrazellulären Lipidperoxidationsprodukte wurden 50 µl Kulturmedium Zellüberstände abgenommen und in eine zweite Meßplatte überführt.

Zur Analyse der intrazellulären Produkte wurde das Kulturmedium abgenommen und die Zellen zweimal mit PBS gespült. Danach folgte eine 5minütige Inkubation bei Raumtemperatur mit 50 µl Extraktionreagenz. Auf die so erhaltenen Proben wurde 160 µl Reagenz I gegeben. Es wurden entweder zur Bestimmung der Summe von MDA und 4-HNE 40 µl Reagenz II zugesetzt oder zur Bestimmung von MDA 40 µl Reagenz III. Im ersten Fall wurde 40 Minuten im zweiten Fall 60 Minuten bei 45 °C auf dem heizbaren Mikrotiterplatten-Schüttler inkubiert. Die Proben wurden mit Eis auf Raumtemperatur abgekühlt und die Absorption im Mikrotiterplatten-Reader bei den Wellenlängen 590 nm/630 nm gemessen.

2.3.2.20 Messung extrazell. Lipidperoxidationsprodukte von Zellen in MTP (TBARS - Assay)

Reagenz: 0,75 % Thiobarbitursäure in LM (15 % TCA in 0,25 M HCl)

Standards: Tetraethoxypropan in Kulturmedium, angesäuert 5 % HPO₃

Es wurden 90 µl Kulturmediumüberstand abgenommen und in eine zweite MTP überführt. Die Proben wurden mit gleichem Volumen Reagenz gemischt und 40 Minuten auf dem heizbaren Mikrotiterplatten-Schüttler bei 60 °C inkubiert. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur wurde die Absorption im Mikrotiterplatten-Reader bei der Wellenlänge 530 nm gemessen.

2.3.2.21 Messung des Gesamtglutathion-Gehaltes von Zellen in MTP und 12-Well-Transwells

Extraktionsreagenz: meta - Phosphorsäure (5%), EDTA (4 mM), Phosphat (80 mM), Triton (0,1%)

Premix: 5,5'-Dithio-bis-(2-nitrobenzoesäure) (DTNB, Ellmann's Reagenz, 2 mM), NADPH (0,7 mM)

Startreagenz: Glutathion-Reduktase (1,2 U/ml, Sigma Type III)

Standards: Glutathion, reduziert (2..20 µM) + Glutathion, oxidiert (0,125..1 µM) in Extraktionsreagenz

Extraktion aus Mikrotiterplatten

Der Mediumüberstand von Zellaussaaten in MTP wurde entfernt. Die Zellen wurden zweimal mit PBS gespült. Es wurde eine saure Extraktion durch 15minütige Inkubation in 25 µl Extraktionsreagenz bei Raumtemperatur unter Schütteln durchgeführt. Der erhaltene Extrakt 6 gleichartig behandelte Wells wurde gepoolt und zur Messung eingesetzt. Das restliche Volumen konnte bis zur Analyse des reduzierten und oxidierten Glutathions per HPLC bei -70 °C konserviert werden. Es konnte auch eine Analyse direkt in der Zellkulturplatte stattfinden. In diesem Fall wurde der Extrakt nicht gepoolt, sondern in den Wells belassen und man fuhr wie im Abschnitt „Messung“ beschrieben fort.

Extraktion aus 12-Well-Transwells

Der Mediumüberstand aus Transwells wurde entfernt. Die Zellen wurden zweimal mit PBS gespült. Es wurde 15 Minuten bei Raumtemperatur mit 75 µl Extraktionsreagenz extrahiert. Der Extrakt konnte zur Analyse des Gesamtglutathion-Gehaltes oder der Analyse von oxidiertem und reduziertem Glutathion per HPLC genutzt werden.

Messung

Für jede Probe wurden 3 Aliquots 20 µl eingesetzt und in eine Mikrotiter Meßplatte gegeben. Gleichzeitig wurden Standards der angegebenen Konzentrationen gemessen. Hiervon wurden ebenfalls 20 µl eingesetzt. Es wurden 70 µl Premix zugegeben und der Assay 5 Minuten bei 37 °C auf dem heizbaren Mikrotiterplatten-Schüttler inkubiert. Die Reaktion wurde mit 20 µl Startreagenz in Gang gebracht und sofort die Absorptionsveränderung kinetisch mit Meßintervallen von 8 s in 40 Messungen bei der Wellenlänge 405 nm im Mikrotiterplatten-Reader verfolgt.

2.3.2.22 Messung des oxidierten und reduzierten Glutathions von Zellen in MTP und 12Well TWs*Extraktion*

Die Extraktion wurde nach dem für die Bestimmung des Gesamtglutathions beschriebenen Verfahren für Mikrotiterplatten und Transwells im 12-Well-Format durchgeführt.

Derivatisierung

Reagenzien: Jodessigsäure (400 mM) in H₂O
 NaHCO₃ (fest, gepulvert)
 Fluordinitrobenzol (1 %) in Ethanol (abs.)

Es wurden 80 µl Probe (Zelleextrakt oder Standard) eingesetzt. Dazu wurden 20 µl Jodessigsäure gegeben und die Mischung mit ca. 20 mg NaHCO₃ bis zum Verbleiben eines Bodensatzes neutralisiert. Es wurde unter Schütteln eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Danach folgte die Zugabe von 100 µl Fluordinitrobenzol und eine weitere Inkubation für fünf Stunden unter Schütteln bei Raumtemperatur und Lichtabschluß. Das Gemisch wurde 5 Minuten bei 13000 rpm zentrifugiert und 150 µl Überstand wurden abgenommen. Diese wurden mit 150 µl Wasser verdünnt und nochmals unter gleichen Bedingungen zentrifugiert. Vom Überstand wurden wiederum mindestens 250 µl abgenommen und in gasdichte Probenfläschen für die HPLC überführt. In dieser Form konnten die Proben bei - 70 °C konserviert werden.

HPLC-Analyse

HPLC-Säule: LiChroCART 125-4, LiChrospher 100 NH₂ (5µm) (Merck)
 Eluent A: Methanol/Wasser 4+1
 Eluent B: Methanol/Natrium Acetat (2 M, pH 4,6) 64+36

Es wurden 150 µl Derivatisierungsprodukt auf die bei 41 °C thermostatisierte HPLC-Säule aufgetragen. Es wurde eine Gradientenelution nach folgendem Ablauf durchgeführt:

Zeit [min]	Puffer B
0 - 7	15 %
- 18	linearer Gradient auf 85 %
- 20	85 %
- 23	linearer Gradient auf 15 %
- 35	15 %

Die Detektion erfolgte mit dem Diodenarray-Detektor im Wellenlängenbereich von 250 nm - 400 nm in der Zeit von 0 Minuten bis 25 Minuten. Es wurde das Chromatogramm bei der Wellenlänge 355 nm ausgewertet. Es wurde eine 4-Punkt-Kalibrierung mit Mischungen aus Standards GSH und GSSG durchgeführt.

2.3.2.23 Messung des ATP-Gehaltes von Zellen in Mikrotiterplatten und 12-Well-Transwells

Extraktionsreagenz:	Trichloressigsäure (2,5 %), EDTA (1mM), Triton (0,1 %) in H ₂ O
Verdünnungspuffer:	Hepes (25 mM), MgSO ₄ (10 mM), KOH (15 mM), pH 7,45
Startreagenz:	BSA (0,075 %), Magnesium Acetat (8,3 mM), Luziferin (0,0025 mg/ml), Luziferase (0,67 mU/ml), TRIS (11 mM) EDTA (0,32 mM), Dithioerythritol (9,5 µM) in Verdünnungspuffer
Standards:	Verdünnungen ATP (30 - 3 µM), ADP (8 - 1 µM), AMP (4 - 0,5 µM) in Extraktionspuffer. Zur Messung Verdünnung 1+7 in Verdünnungspuffer

Extraktion aus Mikrotiterplatten-Aussaaten

Es wurden die Kulturmediumüberstände abgenommen und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. 20 µl Extraktionsreagenz wurden auf den Zellrasen gegeben und die Mikrotiterplatte 15 Minuten auf dem Mikrotiterplattenschüttler inkubiert. Nach der Zugabe von 140 µl Verdünnungspuffer standen die Proben bereit zur Analyse des ATP-Gehaltes per Lumineszenzmessung, konnten direkt für die HPLC Analyse von AMP, ADP und ATP eingesetzt, oder in dieser Form bei -70 °C konserviert werden.

Extraktion aus Transwells im 12-Well-Format

Die Kulturmedienüberstände wurden abgenommen und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Die Extraktion wurde unter Variation des Volumens auf 75 µl Extraktionsreagenz bzw. 525 µl Verdünnungspuffer wie für die Mikrotiterplatten beschrieben vorgenommen.

Lumineszenz-Messung

Vor der Messung wurde das Mikrotiterplatten-Luminometer durch Aufwärmen, sowie Befüllen und Primen des automatischen Dispensers mit Startreagenz vorbereitet.

Es wurden 50 µl Verdünnungspuffer in eine weiße, undurchsichtige Mikrotiter Meßplatte (Labsystems) vorgelegt. Dazu wurden 10 µl Probe oder Standard gegeben. Danach fand die luminometrische Messung im Mikrotiterplatten-Luminometer statt. Dazu wurden bei 25 °C 240 µl Startreagenz durch den automatischen Dispenser eingefüllt. Jedes Well wurde mit einer Integrationszeit von 10 Sekunden nach 2 Sekunden Schütteln einzeln gemessen. Die erhaltenen Meßwerte in RLU wurden über die gleichzeitig gemessenen Standard-Verdünnungen in Konzentrationen umgerechnet.

2.3.2.24 Messung des ATP, ADP und AMP -Gehaltes von Zellen in MTP und 12-Well-Transwells

Extraktion

Die Extraktion wurde wie für die luminometrische Messung des ATP-Gehaltes durchgeführt.

HPLC-Analyse

HPLC-Säule: LiChroCART 125-4, LiChrospher 100 RP-18 (5 µm) (Merck)
Eluent A: KH_2PO_4 (80 mM), Tetrabutylammonium Hydrogensulfat (5 mM), pH 6,0
Eluent B: Acetonitril

Es wurden 300 µl Probe oder Standard bei einer Säulentemperatur von 37 °C aufgetragen und nach folgenden Schema eluiert:

Zeit [min]	Puffer B
0	0
- 10	linearer Gradient auf 3 %
- 18	linearer Gradient auf 11 %
- 20	linearer Gradient auf 15 %
- 25	15 %
- 27	linearer Gradient auf 0 %
- 35	0 %

Die Detektion wurde mit dem Diodenarray-Detektor im Wellenlängenbereich von 190 nm - 300 nm durchgeführt. Das Chromatogramm bei der Wellenlänge 259 nm wurde zur quantitativen Auswertung genutzt. Es wurde eine 4-Punkt-Kalibrierung mit Mischungen aus Standards AMP, ADP und ATP durchgeführt.

2.4 Auswertung

Anzahl unabhängiger Experimente

In den durchgeführten Routine-Experimenten wurden nach Möglichkeit mindestens 3 unabhängige Experimente n durchgeführt. Vorexperimente oder Experimente zur Optimierung von Assays oder dem experimentellen Ablauf fanden meist einmalig statt. Unter unabhängigen Experimenten n wurde bei dem Gebrauch von Zellen in Mikrotiterplatten die Anzahl der Wiederholungen mit unabhängig voneinander kultivierten Zellaussaaten verstanden. Das bedeutet, jedes n beinhaltete üblicherweise sechs unabhängige Messungen, welche den gleichartig behandelten Wells auf einer Mikrotiterplatte entsprach (vgl. Kapitel 2.1.3.3). Bei der Arbeit mit Transwells entsprach n der Anzahl verwendeter Transwells. Diese konnten aus einem oder mehreren getrennten gleichartigen experimentellen Zusammenhängen stammen.

Umrechnung der Einheiten von Meßergebnissen

Ergebnisse der elektronischen Zellzählungen in Transwells wurden als Zellen pro Transwell angegeben. Ergebnisse der Messungen ATP (Lumineszenz), AMP, ADP, ATP (HPLC), Gesamtglutathion und oxidiertes, reduziertes Glutathion (HPLC) wurden aus den Einheiten der Rohdaten (RLU, PF, mO.D./s. und PF) über gleichzeitig gemessene Verdünnungen von Standards in mikromolare Konzentrationen (μM) umgerechnet. Die Ergebnisse aus Messungen der Superoxid-Dismutase-Aktivität in der Einheit RLU wurden über eine getrennt davon gemessene Enzym-Eichverdünnung in Massenkonzentrationen der Einheit ng/Probe umgerechnet. Alle anderen Meßergebnisse wurden zur weiteren Auswertung in ihren ursprünglichen Einheiten (Enzymaktivitäten: O.D. oder mO.D./s bei kinetischen Messungen, DNA/Proteingehalt: RFU) belassen.

Verrechnung von Meßergebnissen miteinander: „Normierung“ und „%-Kontrolle“

Nach Möglichkeit wurde in Experimenten einer der Parameter Zellzahl, DNA-Gehalt oder Proteingehalt zur Zellzahlquantifizierung gemessen. Zur Normierung auf die zum Zeitpunkt der Analyse vorhandene Zellmenge wurden dann die Ergebnisse der Einzelmessungen zu anderen Endpunkten durch diesen Wert dividiert. Diese normierten Ergebnisse der Einzelexperimente konnten dann durch relativen Bezug in prozentualer Einheit auf eine nicht-behandelte Kontrolle (Medium-Kontrolle oder Lösungsmittel-Kontrolle) betrachtet werden. Die Werte „%-Kontrolle“ aus den normierten Meßwerten stellten dann das Ergebnis eines unabhängigen Einzelexperimentes dar.

Die Ergebnisse aus Experimenten mit Transwell-Kulturen wurden nicht auf Zellzahl oder DNA-Gehalt normiert.

Rechnerische Zusammenfassung von Einzelexperimenten

Einzelmessungen aus Experimenten mit Mikrotiterplatten wurden durch Mittelwertbildung zusammengefaßt und gingen so als unabhängiges Einzelexperiment n in die Gesamtauswertung ein. In der Gesamtauswertung wurden unabhängige Einzelexperimente n durch Mittelwertbildung zusammengefaßt. Zur Abschätzung des Streubereiches der Experimente wurde im Falle von $n \geq 3$ die Näherungsstandardabweichung S.D. (Kaiser *et al.*, 1983) berechnet. Im Falle von $n = 2$ wurde die halbe Differenz zwischen beiden Werten als min/max benannt und eingetragen. Im Falle von $n = 1$ fand keine Abschätzung des Streubereiches statt. Mittelwerte wurden mit den abgeschätzten Streubereichen als Fehlerbalken in den Grafiken dargestellt. Bei $n \geq 4$ konnte maximal ein Ausreißer identifiziert werden. Kriterium hierfür war, daß er nicht im Bereich der Näherungsstandardabweichung um den Mittelwert der anderen Einzelexperimente lag.

3 Ergebnisse

3.1 Gasexpositionen nach dem gängigen air/liquid-Konzept

Es wurden Gasexpositionen nach dem gängigen Konzept zur air/liquid-Exposition von eukaryontischen Zellen durchgeführt. Die Experimente sollten mit einem zur Verfügung stehenden Zellkultursystem der Ratte und etablierten Analysemethoden die Durchführbarkeit derartiger Expositionen charakterisieren. Sie sollten weiterhin zeigen, ob auch die Untersuchung der biologischen Effekte komplexer Gasmischungen mit einem solchen System möglich ist.

Dazu wurden R3/1-Rattenzellen in einem experimentellen Aufbau mit Smogkammer (Behnke *et al.*, 1988), Sonnensimulator, umfassender Gasanalytik und Expositionsbox für eukaryontische Zellen auf Transwells im 6-Well-Format gegen verschiedene atmosphärische Gase exponiert (vgl. Kapitel 2.2.1).

Es wurden Expositionen gegen Reinluft, Methylmethacrylat, Stickstoffdioxid, Ozon, PAN und Kohlenwasserstoffgemische durchgeführt. Kohlenwasserstoffe wurden entweder nativ eingesetzt („dunkel“) oder unter Bestrahlung durch den Sonnensimulator („hell“). Weiterhin wurde dem Gemisch zur Simulation einer Photosmog-ähnlichen Expositionsatmosphäre in zwei Hellexpositionen Stickstoffdioxid zugesetzt. Die Gaszusammensetzungen orientierten sich dabei an der Zusammensetzung von Gasen der Umgebungsatmosphäre. So wurde mit einer relativen Feuchte im Bereich von 40 - 50 % (25 °C) und einem CO₂-Gehalt von 0,03 % gearbeitet. Die Konzentrationsbereiche für die Prüfgase wurden so gewählt, daß die kleinste untersuchte Konzentration jeweils im oberen Bereich umweltrelevanter Werte lag. Die exakten Konzentrationswerte wurden durch apparative Gegebenheiten erhalten.

Zellen wurden entweder innerhalb der Expositionsbox gegen das Untersuchungsgas exponiert („GAS“) oder lagen abgedeckt als Expositionskontrolle darin vor („REFERENZ-Kontrolle“). Zur Vermeidung von pH-Effekten wurde für diese Zellen Kulturmedium ohne Zusatz von NaHCO₃ verwendet. Zusätzlich wurden Zellen unter air/liquid- und zelltypspezifischen Bedingungen im Brutschrank inkubiert („INKUBATOR-Kontrolle“).

Der Status der exponierten Zellen wurde durch Messung (1) des DNA-Gehalts zur Zellzahlbestimmung, (2) des Tetrazoliumsalzumsatz (WST-1) als Marker für die mitochondriale Aktivität, (3) der LDH-Freisetzung in das Kulturmedium als Zytotoxizitätsmarker, sowie (4) der Aktivität unspezifischer Esterasen, (5) der Aktivität der Glutathion-S-Transferasen (nicht bei Reinluft-Expositionen) und (6) des Bromdesoxyuridin-Einbaus als allgemeine Vitalitätsmarker charakterisiert.

Es wurden 5 unabhängige Experimente zur Exposition gegen Reinluft durchgeführt. Da es sich um orientierende Experimente handelte, wurden Zellen gegen die Gase Stickstoffdioxid, Ozon, PAN und Methylmethacrylat in Einzelexperimenten ohne Wiederholung gegen jeweils drei Gaskonzentrationen exponiert. Expositionen gegen Kohlenwasserstoffgemische wurden für die genannten 4 Situationen (dunkel, hell, NO₂-Zusatz in 2 unterschiedlichen Konzentrationen) ebenfalls in Einzelexperimenten durchgeführt.

3.1.1 Expositionen gegen Reinluft

In der folgenden Abbildung sind die Ergebnisse der fünf unabhängigen Experimente für die gegen Reinluft exponierten Zellen relativ zu denen der im Brutschrank inkubierten Zellen dargestellt.

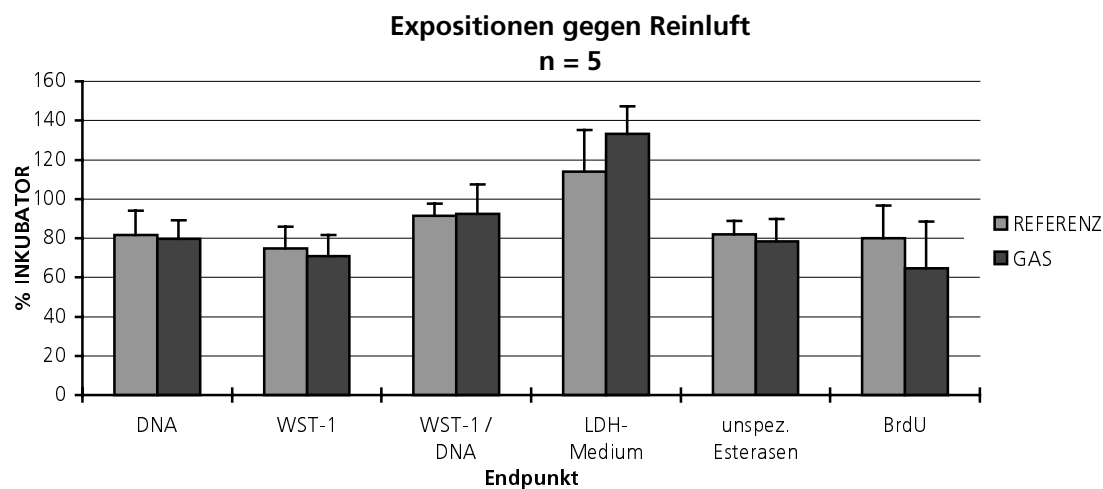


Abb. 3.1 Ergebnisse der Expositionen von R3/1-Zellen gegen Reinluft

Die Ergebnisse lassen für alle untersuchten Endpunkte einen leichten Vitalitätsverlust der exponierten Zellen gegenüber den INKUBATOR-Zellen erkennen. DNA-Gehalt, Tetrazoliumsalzumsatz (WST-1), die Aktivität unspezifischer Esterasen und der BrdU-Einbau waren leicht verringert. Auch der Tetrazoliumsalzumsatz pro DNA-Gehalt zeigte diese Tendenz. Die Lactat-Dehydrogenase-Freisetzung in das Kulturmedium dagegen war auf maximal 130 % der Inkubator Kontrolle erhöht, was im Vergleich zu Expositionen gegen Stickstoffdioxid, Ozon und PAN (vgl. Kapitel 3.1.3, 3.1.4, 3.1.5) ebenfalls für eine leichte Zellschädigung spricht.

Der Unterschied zwischen den dem Gasstrom exponierten Zellen („GAS“) und den als „REFERENZ“ abgedeckten Zellen hingegen war kleiner als der Unterschied beider Behandlungsgruppen zur INKUBATOR-Kontrolle. Dennoch dokumentiert sich für die GAS-Zellen bei allen untersuchten Parametern eine etwas stärkere Schädigung als für die REFERENZ-Zellen. Die Standardabweichungen lagen mit Ausnahme der Analyse des BrdU-Gehaltes (GAS 36 %) in der Größenordnung von 15 %.

3.1.2 Exposition gegen Methylmethacrylat (MMA)

Dieses Experiment wurde durchgeführt, um die Toxizität des Materials der Expositionsbox Methylmethacrylat (MMA) für das verwendete Zellsystem zu untersuchen. Die eingesetzte Konzentration MMA von 1000 ppb war deutlich höher als diejenige, die durch Ausdünstungen des Materials der Expositionsbox hervorgerufen sein konnte. Die Ergebnisse der Exposition sind prozentual zur INKUBATOR-Kontrolle im Vergleich zu den Ergebnissen aus Reinluft-Experimenten dargestellt.

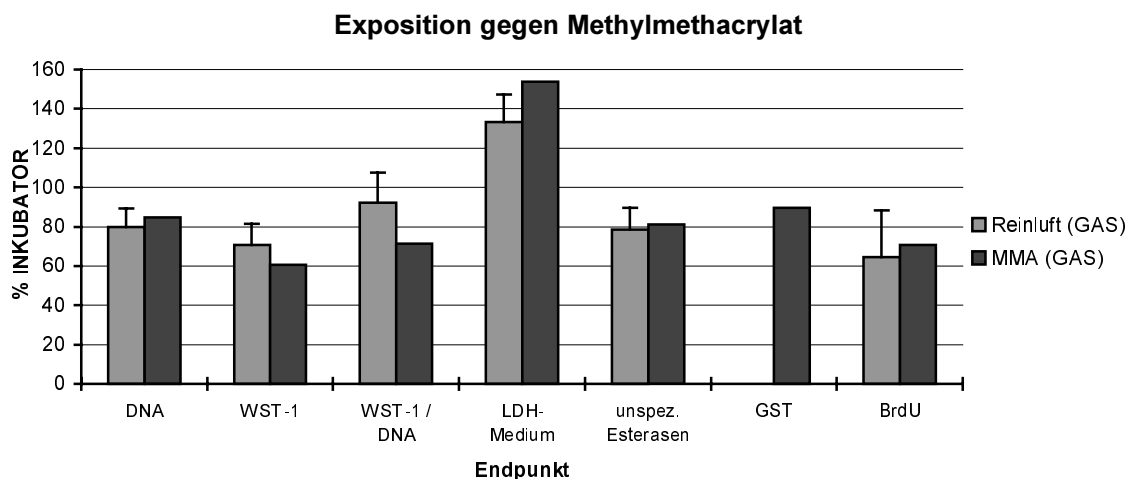


Abb. 3.2 Ergebnisse der Expositionen von R3/1-Rattenzellen gegen Methylmethacrylat

Die Ergebnisse zeigen für die Exposition gegen MMA keine deutlichen Unterschiede zur Reinluft-Exposition. Für die Endpunkte DNA, Tetrazoliumsalzumsatz, Esterase-Aktivität und BrdU-Einbau lagen die Meßwerte im Schwankungsbereich der Reinluftexpositionen, wengleich sie jedoch eine etwas stärkere Toxizität andeuten. Die LDH-Freisetzung in das Kulturmedium lag außerhalb des Schwankungsbereiches höher als bei der Reinluftexposition, doch betrug der Unterschied nur wenige Prozent. In Anbetracht auch der unrealistisch hohen eingesetzten Konzentration wurde das Material der Expositionsbox nach diesen Ergebnissen als geeignet eingestuft.

3.1.3 Expositionen gegen Stickstoffdioxid

Es wurden Expositionen von R3/1-Rattenzellen gegen Gasmischungen mit Stickstoffdioxid-Beimengungen in den Konzentrationen 89 ppb, 186 ppb und 359 ppb durchgeführt. Die Ergebnisse der GAS-Zellen sind im Vergleich zu Reinluft-Expositionen relativ zu der jeweils mitgeführten REFERENZ in der folgenden Grafik dargestellt.

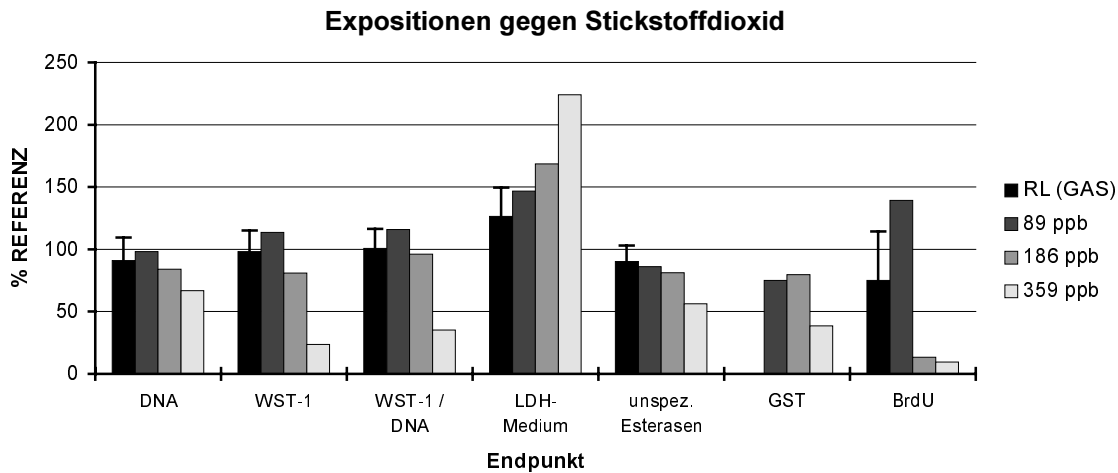


Abb. 3.3 Ergebnisse der Expositionen von R3/1-Zellen gegen Stickstoffdioxid

In allen drei Experimenten ist eine in Abhängigkeit von der NO_2 -Konzentration zunehmende Toxizität zu erkennen. Dies gilt für alle Parameter mit Ausnahme der Glutathion-S-Transferase-Aktivität, bei der dieser Trend bei Gaskonzentrationen von 89 ppb und 186 ppb nicht bestätigt wurde. Im Vergleich zu den Reinluft-Expositionen lagen die Ergebnisse für die beiden kleineren Konzentrationen bei den Parametern DNA-Gehalt, Tetrazoliumsalzumsatz und Aktivität unspezifischer Esterasen im Schwankungsbereich der Reinluft-Ergebnisse. Die höchste Konzentration zeigte jedoch durchgängig deutlich unterscheidbare Ergebnisse. Dabei fällt auf, daß die kleinste Konzentration in den Parametern DNA-Gehalt, Tetrazoliumsalzumsatz und BrdU-Einbau im Vergleich zu Reinluft-Expositionen Meßwerte lieferte, die auf eine geringere Toxizität schließen lassen. DNA-Gehalt, Tetrazoliumsalzumsatz und BrdU-Einbau waren höher als in der Reinluftexposition.

3.1.4 Expositionen gegen Ozon

Für die Expositionsexperimente wurden Ozonkonzentrationen von 235 ppb, 500 ppb und 941 ppb eingesetzt. Die Ergebnisse sind wiederum relativ zur mitgeführten REFERENZ im Vergleich zu den Reinluft-Expositionen in der folgenden Grafik dargestellt.

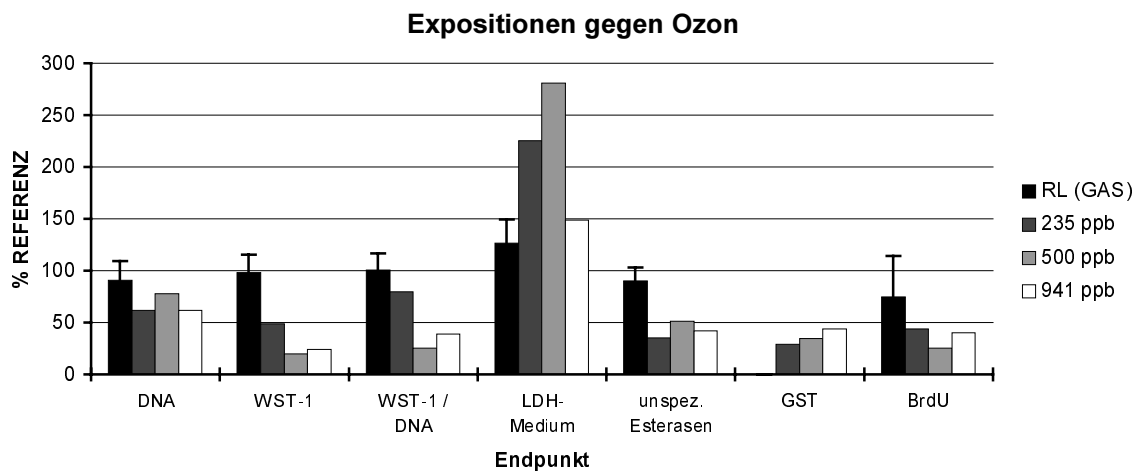


Abb. 3.4 Ergebnisse der Expositionen von R3/1-Zellen gegen Ozon

Bereits für die kleinste eingesetzte Ozonkonzentration von 235 ppb wurden bei den Endpunkten DNA-Gehalt, Tetrazoliumsalzumsatz, Lactat-Dehydrogenase-Freisetzung in das Kulturmedium und der Aktivität unspezifischer Esterasen Daten erhalten, die außerhalb des Schwankungsbereiches der Reinluftexperimente lagen. Mit steigender Gaskonzentration auf 500 ppb dokumentieren die Parameter Tetrazoliumsalzumsatz, LDH-Freisetzung und BrdU-Einbau eine zunehmende toxische Wirkung auf die Zellen, während beim DNA-Gehalt, den unspezifischen Esterasen und der Glutathion-S-Transferase-Aktivität kein Unterschied zur kleineren Gaskonzentration im Sinne dieses Trends zu erkennen war. Für die Exposition gegen die höchste Konzentration, 941 ppb Ozon zeigte keiner der gemessenen Parameter einen Wert an, der im Zusammenhang mit der konzentrationsabhängigen Veränderung der Ergebnisse bei den kleineren Konzentrationen sinnvoll zu interpretieren ist. Besonders deutlich wird dies am Ergebnis der LDH-Freisetzung in das Kulturmedium. Hier dokumentiert sich eine deutliche konzentrationsabhängige Toxizitätszunahme für die beiden Konzentrationen 235 ppb und 500 ppb, während die höchste Konzentration wieder nahezu auf dem Niveau der Reinluftkontrolle liegt. Es wird vermutet, daß die REFERENZ-Zellen bei dieser Konzentration ebenfalls durch das Ozon geschädigt wurden, da es sich bei der verwendeten Abdeckung um einen Compendium-Plate-Deckel handelte, der eine gewisse Ventilation zuließ. Die Auswertung als %-REFERENZ ließ dann keine Zunahme erkennen, da es sich nicht mehr um eine unbehandelte Kontrolle handeln konnte (vgl. Kapitel 3.1.5).

3.1.5 Expositionen gegen PAN (Peroxyacetyl-nitrat)

Es wurden Expositionen gegen PAN in den Konzentrationen 20 ppb, 88 ppb und 183 ppb durchgeführt. Bedingt durch die Darstellung der Substanz (Photolyse aus Ethylnitrit, Abt. Atmosphärische Chemie, Fraunhofer ITA) lag der Stoff dabei nicht rein in der Reinluft-Matrix vor. Neben PAN waren in den Gasmischungen bis zu 180 ppb Ozon und 200 ppb CO enthalten (vgl. Kapitel 2.2.1.2). In der folgenden Grafik sind wiederum die Meßergebnisse für GAS exponierte Zellen im Verhältnis zur mitgeführten REFERENZ-Kontrolle und im Vergleich zu entsprechenden Ergebnissen aus Reinluft-Expositionen dargestellt.

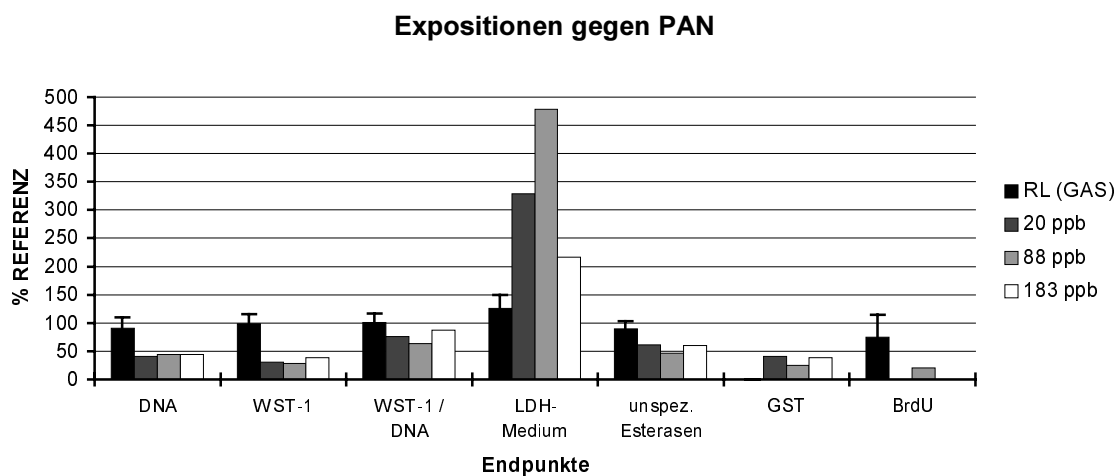


Abb. 3.5 Ergebnisse der Expositionen von R3/1-Zellen gegen PAN

Es ist eine von der PAN-Konzentration abhängige Toxizität in den Meßergebnissen für die Parameter Tetrazoliumsalzumsatz, Tetrazoliumsalzumsatz (normiert), Aktivität unspezifischer Esterasen und Glutathion-S-Transferasen für die beiden kleineren Konzentrationen zu erkennen. Bemerkenswert sind die extrem hohen Werte - nahezu 500 % der REFERENZ - für die LDH-Freisetzung in das Kulturmedium. Ebenso dokumentiert der Tetrazoliumsalzumsatz, welcher schon bei der kleinsten Konzentration von nur 20 ppb PAN auf 30 % gegenüber der REFERENZ sank, die starke Toxizität dieser Gasmischung. Der DNA-Gehalt ließ eine ähnliche Beobachtung zu, wie sie schon bei den Expositionen gegen Ozon zu machen war. Bereits die kleinste untersuchte Konzentration induzierte eine starke Abnahme, die sich mit zunehmender Gaskonzentration nicht veränderte. Die Expositionen bei der höchsten Gaskonzentration von 183 ppb PAN ergaben ein Ergebnis, das dem der Exposition gegen die höchste eingesetzte Ozonkonzentration von 941 ppb vergleichbar war. Die Toxizität der Gasmischung war nicht größer als die der nächst kleineren. Auch hier wird die Undichtigkeit der Abdeckung der REFERENZ-Zellen dafür verantwortlich gemacht.

3.1.6 Exposition gegen Kohlenwasserstoff-Gemische

Zur Exposition der Zellen wurde ein Kohlenwasserstoffgemisch dargestellt (Abteilung Atmosphärische Chemie, Fraunhofer ITA, Zusammensetzung siehe Material und Methoden), mit dem in vier Experimenten auch photochemische Reaktionen simuliert wurden. Das Gasmisch wurde unbestrahlt eingesetzt (KWs, dunkel), nach Bestrahlung durch den Sonnensimulator (KWs, hell), und bestrahlt nach Zusatz von NO_2 in zwei unterschiedlichen Konzentrationen als Radikalstarter für photochemische Reaktionen (KWs, 12,5 ppb NO_2 (A) bzw. KWs, 31,5 ppb NO_2 (B)). Die zwei letztgenannten Mischungen simulierten eine innerstädtische Photosmog-Situation. Aufgrund der aus Ozon- und PAN-Expositionen erhaltenen Ergebnisse (Schädigung der REFERENZ bei hohen Gas-Konzentrationen, vgl. Kapitel 3.1.4 und 3.1.5) wurden die Ergebnisse dieser Experimente in der folgenden Grafik im Verhältnis zur INKUBATOR-Kontrolle im Vergleich zu Reinluft-Expositionen dargestellt:

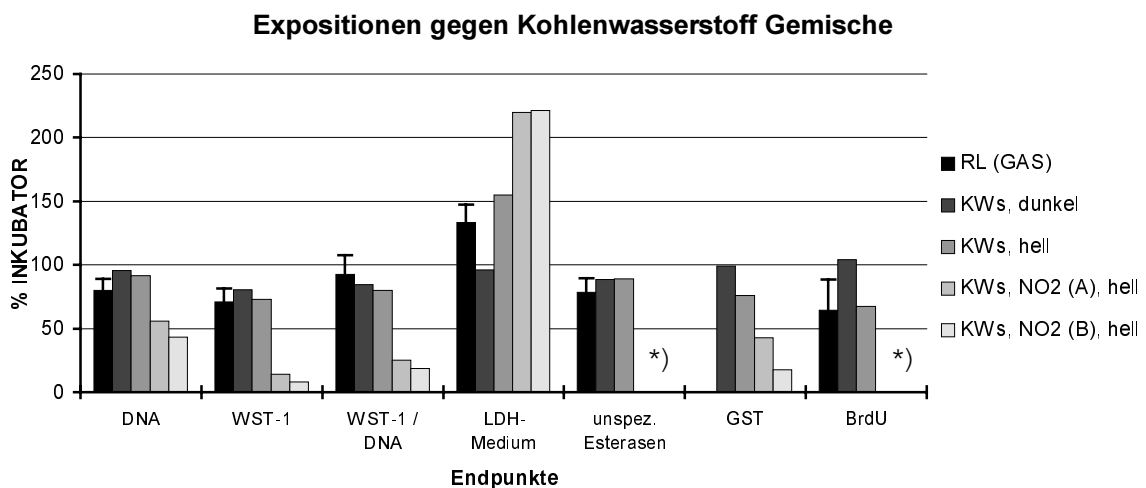


Abb. 3.6 Ergebnisse der Expositionen von R3/1-Zellen gegen Kohlenwasserstoff Gemische. *) Die Aktivität unspezifischer Esterasen und der BrdU-Einbau wurden nach Exposition gegen Kohlenwasserstoffgemischen mit NO_2 -Zusatz nicht untersucht

Die Ergebnisse dieser Expositionen teilen die vier Kohlenwasserstoffgemische deutlich in zwei Gruppen ein. Für die Mischungen ohne Stickstoffdioxid-Zusatz lagen die Meßwerte für alle untersuchten Endpunkte innerhalb der Schwankungsbreite der bei den Reinluftexperimenten erhaltenen Ergebnisse. Dennoch zeigen die Parameter DNA-Gehalt, Tetrazoliumsalzumsatz, LDH-Freisetzung, Glutathion-S-Transferase-Aktivität und BrdU-Einbau übereinstimmend eine stärker toxische Wirkung der bestrahlten Gasmischung an. Nach Zusatz von NO_2 erhöhte sich diese Wirkung jedoch sprunghaft. Der DNA-Gehalt, Tetrazoliumsalzumsatz, die Lactat-Dehydrogenase-Freisetzung in das Kulturmedium und die Glutathion-S-Transferase-Aktivität dokumentieren übereinstimmend eine deutlich gestiegene Toxizität der Gasmischung gegenüber der Exposition ohne NO_2 -Zusatz sowie eine Erhöhung derselben mit zunehmender NO_2 -Konzentration.

3.1.7 Abschätzung der Reproduzierbarkeit

Es wurden in allen Experimenten Zellen als REFERENZ- und INKUBATOR-Kontrolle mitgeführt. Zur Abschätzung der Reproduzierbarkeit von Zellsystem und Analytik unter Auslassung des Einflusses der Gasexposition wurden diese Werte für alle untersuchten Endpunkte zusammengestellt. Sie sind als Verhältnis von REFERENZ- zu INKUBATOR-Zellen in der folgenden Grafik dargestellt.

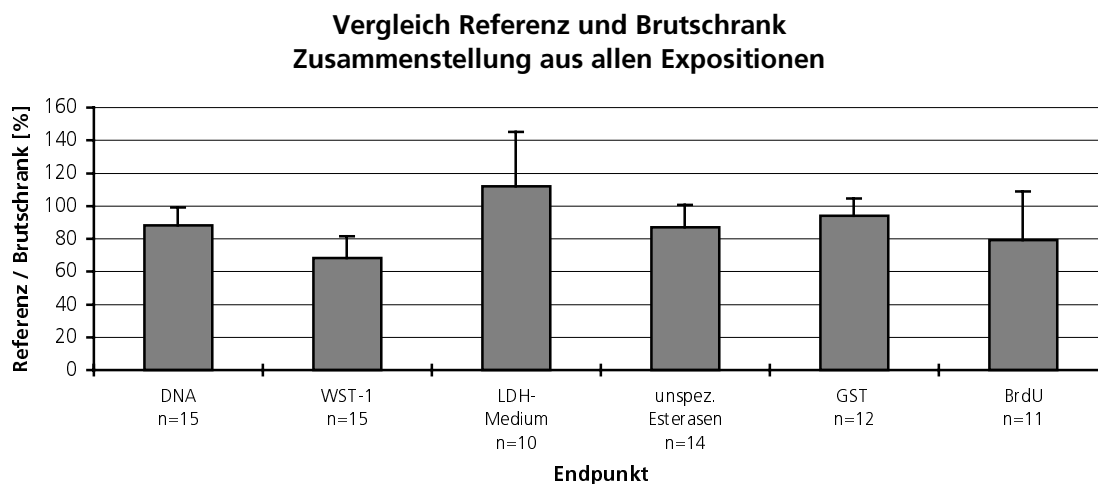


Abb. 3.7 Vergleich von REFERENZ und INKUBATOR, Zusammenstellung aus allen Expositionen

Die Zusammenstellung der Ergebnisse bestätigt sowohl qualitativ als auch quantitativ den Trend, der schon in der Darstellung der Reinluft-Experimente zu erkennen war. Alle untersuchten Parameter dokumentieren einen leichten Vitalitätsverlust der REFERENZ-Zellen gegenüber der INKUBATOR-Kontrolle. Die Schwankungsbreite nach Berechnung der Standardabweichung liegt für die Messung der LDH-Freisetzung in das Kulturmedium und für den BrdU-Einbau bei etwa 30 %, für alle anderen Werte im Bereich um 15 % des dargestellten Mittelwertes.

3.1.8 Zusammenfassung

R3/1-Rattenzellen wurden in einem Expositionssystem mit Gas-Reaktionskammer und Expositionsbox in einem modifiziertem Brutschrank gegen verschiedene atmosphärische Gase exponiert. Die eukaryontischen Zellen wurden unter air/liquid-Bedingungen auf mikroporösen Membranen exponiert, die zur Versorgung mit Medium in Kulturplatten eingehängt waren. Dieses System entsprach der gängigen Methode zur Untersuchung von gasförmigen Substanzen mit eukaryontischen Zellsystemen. Entgegen etablierten Methoden wurde hier mit atmosphärischen Konzentrationen von CO₂ (0,03%) und umweltentsprechender relativer Feuchte (45 % - 50 % rH/25 °C) gearbeitet. Der pH-Wert des Kulturmediums wurde durch Auslassen von Natriumhydrogencarbonat im Kulturmedium stabilisiert.

Es wurden 3stündige Expositionen gegen Reinluft (aufgearbeitete Umgebungsluft), Stickstoffdioxid, Ozon, PAN, und Kohlenwasserstoffgemische durchgeführt. Direkt nach der Exposition wurden die biochemischen Parameter DNA-Gehalt, Tetrazoliumsalzumsatz (WST-1), Lactat-Dehydrogenase-Freisetzung in das Kulturmedium, Aktivität unspezifischer Esterasen, Aktivität von Glutathion-S-Transferasen, und BrdU-Einbau untersucht.

In Expositionen gegen Reinluft erlitten Zellen gegenüber einer air/liquid-Kontrolle im Brutschrank (5% CO₂, 95 % rH/37 °C) einen leichten Vitalitätsverlust. Er wird durch die Endpunkte DNA-Gehalt, Tetrazoliumsalzumsatz und LDH-Freisetzung in das Kulturmedium übereinstimmend dokumentiert. Der Unterschied zwischen abgedeckt (REFERENZ) und offen (GAS) exponierten Zellen war geringer als die Differenzen zu den INKUBATOR-Zellen.

Expositionen gegen Stickstoffdioxid im Konzentrationsbereich von 89 bis 359 ppb ließen in Übereinstimmung nahezu aller gemessenen Parameter eine mit der NO₂-Konzentration zunehmende Toxizität erkennen. Durchgehend außerhalb des Schwankungsbereiches der Reinluft-Kontrolle liegende Ergebnisse wurden bei der höchsten eingesetzten Konzentration erhalten.

Expositionen gegen Ozon führten bereits in der kleinsten eingesetzten Konzentration von 235 ppb zu einer sich in den Ergebnissen aller Endpunktbestimmungen deutlich ausdrückenden Toxizität. Zum Teil setzte sich diese mit der nächst höheren Ozonkonzentration dosisabhängig fort (WST-1, LDH, BrdU). In der höchsten Konzentration hingegen wurden keine Ergebnisse erhalten, die im Sinne einer konzentrationsabhängigen Toxizitätszunahme mit den Ergebnissen der Messungen bei kleineren Konzentrationen in Verbindung standen. Diese Beobachtung wurde auch bei den Expositionen gegen PAN beobachtet. Es wurde eine unzureichende Dichtigkeit der Zellabdeckung gegen den Expositionsgasstrom hierfür verantwortlich gemacht.

Expositionen gegen PAN zeigten bereits in der kleinsten eingesetzten Konzentration von 20 ppb eine sehr deutliche Toxizität. Wie bei Expositionen gegen Ozon konnte mit der nächst höheren Konzentration noch bei einigen Parametern, bei der höchsten Konzentration bei keinem Parameter ein konzentrationsabhängiger Effekt beobachtet werden.

Expositionen gegen Kohlenwasserstoffgemische zeigten deutlich unterscheidbare Ergebnisse im Hinblick auf deren zum Teil vorangehende photochemischer Umsetzung. In photochemischen Reaktionen mit NO₂ eingeleitete Umsetzungen führten zu einer Gasmischung mit deutlich toxischeren Eigenschaften für das Zellsystem.

Die Reproduzierbarkeit des Systems lag in der Größenordnung von 15 % für die meisten Parameter. Bei der Bestimmung der Lactat-Dehydrogenase-Freisetzung und des BrdU-Einbaus wurden Standardabweichungen bis 30 % des gemessenen Mittelwertes erhalten.

3.2 Zellkultur

Es wurden Experimente zur Kulturführung der Zellsysteme Lk004 (humane, adulte Lungenfibroblasten, (Aufderheide *et al.*, 1999; Ritter *et al.*, 1999)) und HFBE (humane, fetale Bronchialepithelzellen, (Emura *et al.*, 1995; Ochiai *et al.*, 1991)) durchgeführt.

Zur Minimierung von Wechselwirkungen zwischen Kulturmediumkomponenten und Prüfsubstanzen und zur Vermeidung der Überlagerung von Zellproliferation und Prüfsubstanz-induzierten Effekten sollten durch Kultivierung ohne Serum Bedingungen für reproduzierbare, nicht-proliferierende Zellkultursysteme geschaffen werden. Dazu wurde zunächst das Zellwachstum unter proliferativen Bedingungen untersucht. Es folgte die Umstellung auf nicht-proliferative Bedingungen durch eine FKS-freie Kultivierung sowie deren Charakterisierung.

Eine schonendere und Zellmaterial-sparende Methode sollte durch Einführung einer proliferativen Vorkultivierung der Zellen erhalten werden.

Weiterhin wurde untersucht, ob ein Zusatz von Natrium-Selenit, der sich zur Induktion der Glutathion-Peroxidase-Aktivität als Ergebnis der Arbeiten zur Etablierung analytischer Methoden als günstig erwies (vgl. Kapitel 3.3.6), einen Vitalitätsverlust des Zellsystems induzierte.

Zur Vorbereitung des Zellkultursystems auf Expositionen gegen Gase wurde die Kultivierung in einem Medium mit HEPES-Puffer etabliert. Durch Erweiterung des zelltypspezifischen Kulturmediums um dieses CO₂-unabhängige Puffersystem sollte eine Erhöhung der Pufferkapazität bei Expositionen gegen Gase mit umweltrelevantem CO₂-Gehalt von 0,03 % erreicht werden.

Gleichzeitig wurde in diesen Experimenten untersucht, ob die Übertragung der für Lk004-Zellen optimierten Methoden zur Zellkultivierung auf ein anderes, weniger eingehend charakterisiertes Zellsystem möglich war. Dazu wurden in den Experimenten zur Verwendung von HEPES-Puffer auch HFBE-Zellen eingesetzt. Dieses Zellsystem sollte zur Validierung der Ergebnisse der Gasexpositionen von Lk004-Zellen im neu entwickelten Aufbau verwendet werden (vgl. Kapitel 3.7).

3.2.1 Wachstumsverhalten unter proliferativen Bedingungen

Lk004-Zellen wurden unter proliferativen Bedingungen, das heißt unter Zusatz von FKS, im Zellkulturmedium in Mikrotiterplatten in Dichten von 1250 bis 40000 Zellen pro Well ausgesät. Nach einer Anheftungsphase von 2 Stunden wurde der Tetrazoliumsalzumsatz (MTT) untersucht. Über einen Zeitraum von 96 Stunden wurde diese Untersuchung in kinetischen Intervallen von 24 Stunden fortgesetzt. Die Mittelwerte aus den Ergebnissen dreier unabhängiger Experimente dieser Art sind in der folgenden Grafik dargestellt.

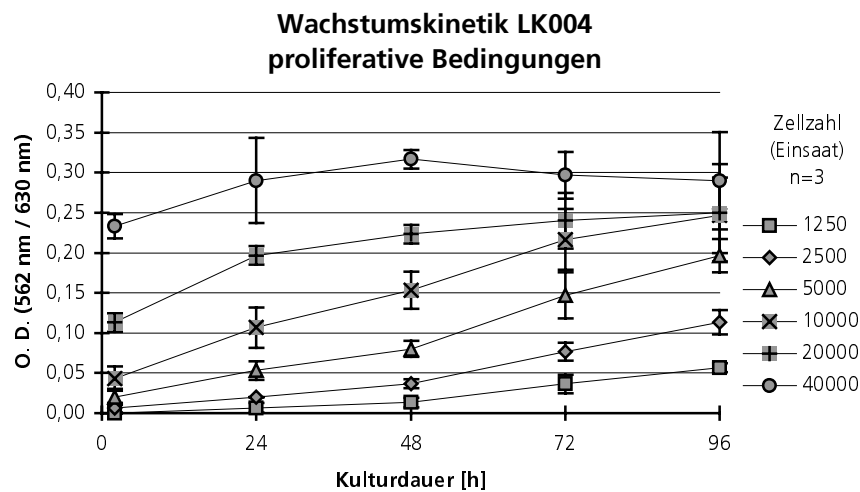


Abb. 3.8 Messung einer Wachstumskinetik für Lk004-Zellen unter proliferativen Bedingungen mittels Tetrazoliumsalzumsatz (MTT)

Bei Zelleinsaaten zwischen 2500 und 10000 Zellen je MTP-Well zeigten die Zellen bis zu einer Kulturdauer von 72 Stunden ein nahezu lineares Wachstum. In dieser Wachstumsphase lag die Verdoppelungszeit im Mittel bei 24,3 Stunden. Für die höchste Zellzahl wurde bereits nach 24 Stunden eine Wachstumsinhibition durch Dichtebegrenzung erreicht. Die Zellmorphologie nach phasenkontrastmikroskopischer Betrachtung ist in den folgenden Bildern dargestellt.

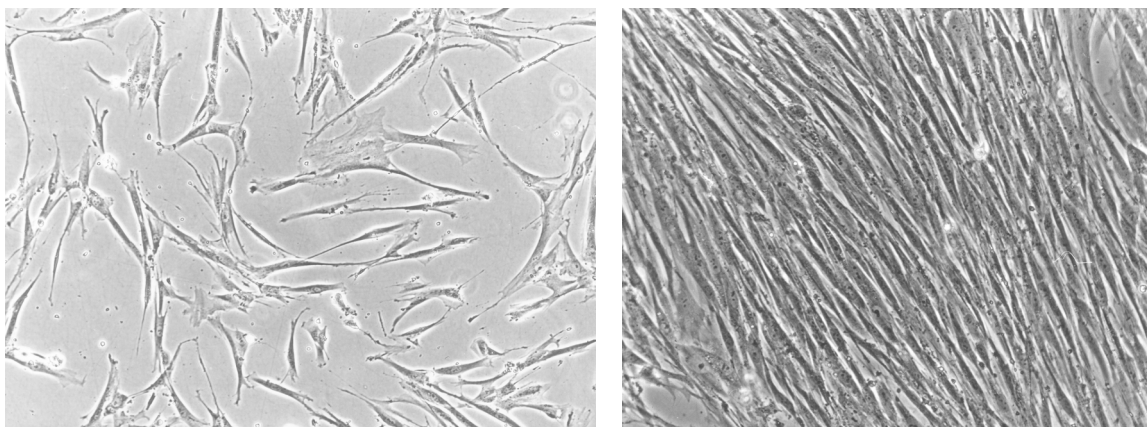


Abb. 3.9 Phasenkontrastmikroskopische Bilder von Lk004-Zellen in subkonfluenter (links, 100x) und konfluenter Zelldichte (rechts, 100x)

3.2.2 Proliferative und nicht-proliferative Kulturführung im Vergleich

Lk004-Zellen wurden unter proliferativen bzw. nicht-proliferativen Bedingungen in den Zellzahlen 5000, 10000 und 20000 Zellen je Mikrotiterwell kultiviert. Nach 24, 48 und 72 Stunden Kulturdauer wurde (1) der DNA-Gehalt zur Erfassung der Zellproliferation, (2) der Tetrazoliumsalmatzumsatz (WST-1) und (3) die Phosphofruktokinase-Aktivität zur Untersuchung des Energiehaushaltes der Zellen bzgl. mitochondrialer und glykolytischer Aktivität, (4) die LDH-Freisetzung in das Kulturmedium als Zytotoxizitätsmarker und (5) die Glutathion-S-Transferase-Aktivität als Enzymaktivität ohne direkten Zusammenhang mit dem zellulären Energiestoffwechsel untersucht.

In der folgenden Grafik sind die Meßwerte der Analyse des DNA-Gehaltes zu den Zeitpunkten 48 und 72 Stunden relativ zu den Meßwerten der Analyse des DNA-Gehaltes zum Zeitpunkt 24 Stunden dargestellt.

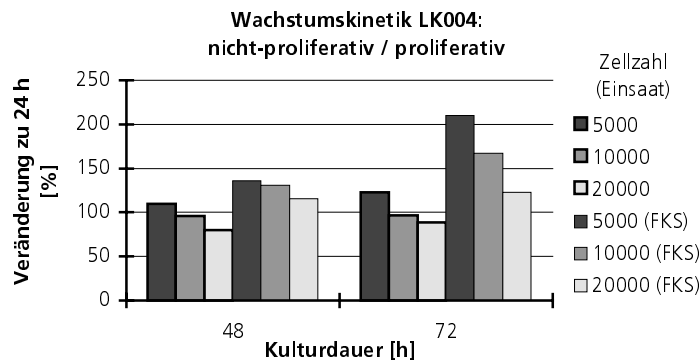


Abb. 3.10 Wachstumsverhalten Lk004-Zellen unter proliferativen (FKS) und nicht-proliferativen Bedingungen (kein FKS) im Vergleich (DNA-Gehalt)

Die Meßergebnisse zeigen, daß der DNA-Gehalt unter nicht-proliferativen Bedingungen über den Zeitraum von 72 Stunden für alle drei untersuchten Zelldichten nahezu konstant war. Unter proliferativen Bedingungen dagegen dokumentierte sich eine deutliche Zunahme im angegebenen Zeitraum bis auf 200 % bzgl. des 24 Stunden Wertes in der kleinsten eingesetzten Zelldichte. Damit wird deutlich, daß die Kulturführung ohne Zusatz von FKS zum Kulturmedium bei dem verwendeten Zellsystem tatsächlich einen Wechsel vom proliferativen zum nicht-proliferativen System bewirkte.

Zur Untersuchung weiterer zellbiochemischer Veränderungen beim Wechsel vom proliferativen zum nicht-proliferativen System wurden die Ergebnisse der Messungen der genannten anderen Endpunkte für die drei verwendeten Zellzahlen rechnerisch zum Mittelwert zusammengefaßt. Die Mittelwerte der Messungen im nicht-proliferativen System sind in der folgenden Grafik relativ zu den Ergebnissen der Messungen im proliferativen System dargestellt.

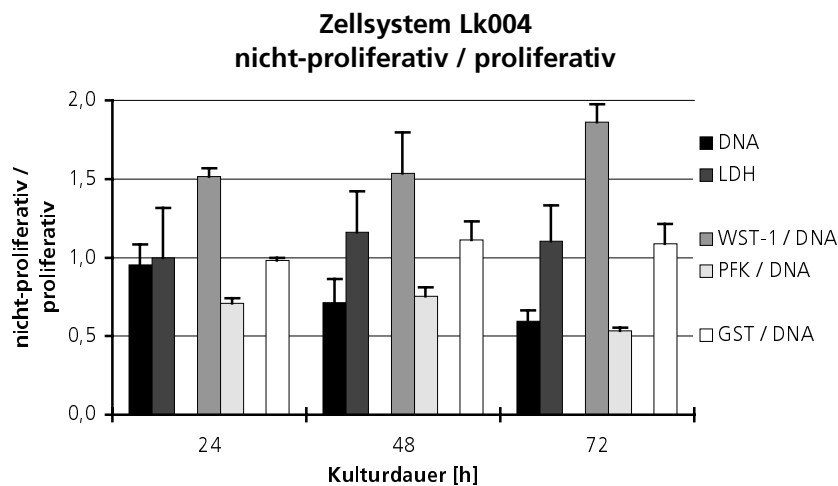


Abb. 3.11 Untersuchung allgemeiner zellbiochemischer Parameter bei Kultivierung von Lk004-Zellen unter nicht-proliferativen und proliferativen Bedingungen

Die LDH-Freisetzung in das Kulturmedium und die Aktivität der Glutathion-S-Transferasen unterschied sich nicht zwischen beiden Systemen. Im Gegensatz dazu sind deutliche Unterschiede beim Tetrazoliumsalzumsatz (WST-1) und der Phosphofruktokinase-Aktivität zu erkennen. Der Tetrazoliumsalzumsatz stieg im nicht-proliferativen System nahezu auf den zweifachen Wert des Meßergebnisses im proliferativen System. Die Phosphofruktokinase-Aktivität hingegen fiel auf die Hälfte ihrer Aktivität im System mit FKS. Die Ergebnisse für die Zeitpunkte 24 Stunden und 48 Stunden sind für beide Parameter vergleichbar, während sich die beschriebene Tendenz vom Zeitpunkt 48 Stunden zum Zeitpunkt 72 Stunden deutlich steigerte.

3.2.3 Einführung einer verlängerten proliferativen Vorkultur

Lk004-Zellen wurden nach den Bedingungen für eine Kultur unter nicht-proliferativen Bedingungen mit proliferativer Vorkultur in Zellzahlen von maximal 5000 Zellen pro MTP-Well ausgesät. In der proliferativen Vorphase von 72 Stunden erhöhte sich die Zelldichte dabei bis zur Konfluenz. Zur Untersuchung der Reproduzierbarkeit einer derartigen Kulturführung wurden der DNA-Gehalt und der Tetrazoliumsalzumsatz in drei unabhängigen Experimenten 24 Stunden nach der Umstellung des Systems auf nicht-proliferative Bedingungen untersucht (Abb. 3.12).

Bei den gemessenen DNA-Gehalten wurden Schwankungsbreiten von 5 bis 10 % des Mittelwertes gefunden. Die Kurve für die Zellverdünnung kommt für Einsaatdichten ≥ 2500 Zellen/MTP-Well in die Plateau-Phase. Dies bestätigt den durch mikroskopische Betrachtung gewonnen Eindruck eines konfluenten Zellrasens.

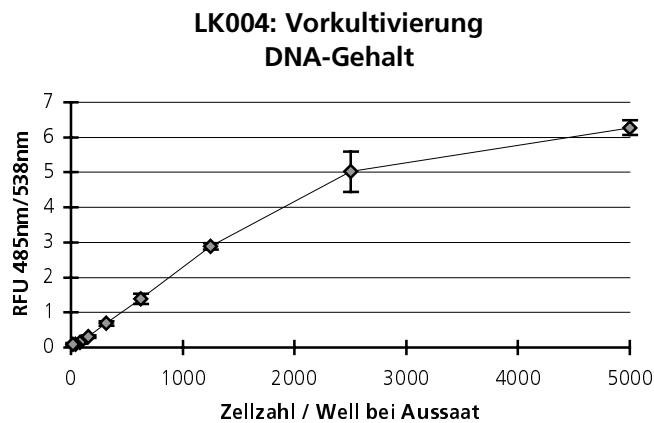


Abb. 3.12 DNA-Gehalt in drei unabhängigen Experimenten bei Kulturführung mit proliferativer Vorkultur (24 Stunden nach Umstellung auf nicht-proliferative Bedingungen, 72 Stunden proliferative Vorkultur)

Die Meßwerte des Tetrazoliumsalzumsatzes (Abb. 3.13) bestätigen dieses Ergebnis im Hinblick auf Reproduzierbarkeit und Konfluenz. Die normierten Werte WST-1/DNA ergeben für die höchsten drei Zellzahlen von der Zelldichte unabhängige, konstante Werte.

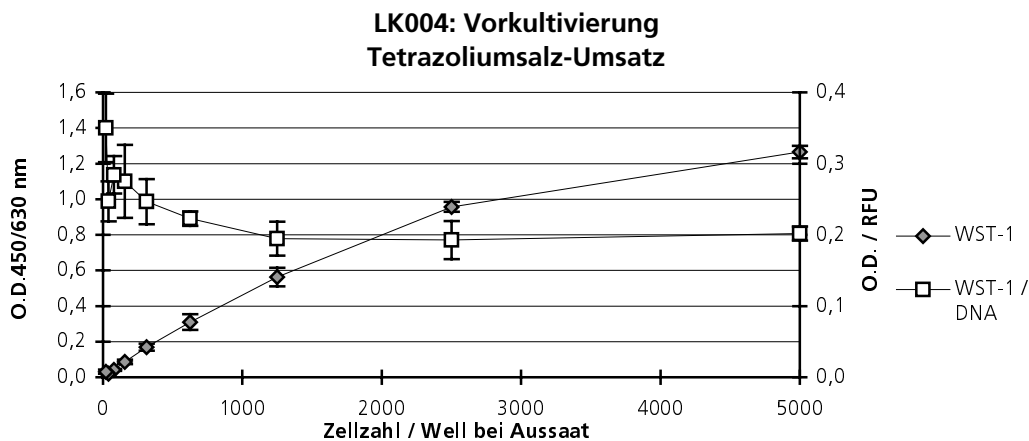


Abb. 3.13 Tetrazoliumsalzumsatz (WST-1) in drei unabhängigen Experimenten bei Kulturführung mit proliferativer Vorkultur (72 Stunden proliferative Vorkultur, danach Umstellung auf nicht-proliferative Bedingungen, Meßwerte 24 Stunden nach Umstellung)

Es wurden weiterhin für eine längere Kulturdauer von 48 und 72 Stunden die Parameter DNA-Gehalt, Tetrazoliumsalzumsatz (WST-1), Proteingehalt, Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase-Aktivität, Glutathion-S-Transferase-Aktivität und Superoxid-Dismutase-Aktivität untersucht. Für die Parameter DNA-Gehalt und Tetrazoliumsalzumsatz wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt, andere Endpunkte wurden in Einzelexperimenten untersucht. Die Ergebnisse sind in Abb. 3.14 relativ zu den Messungen zum Zeitpunkt 24 Stunden aufgetragen.

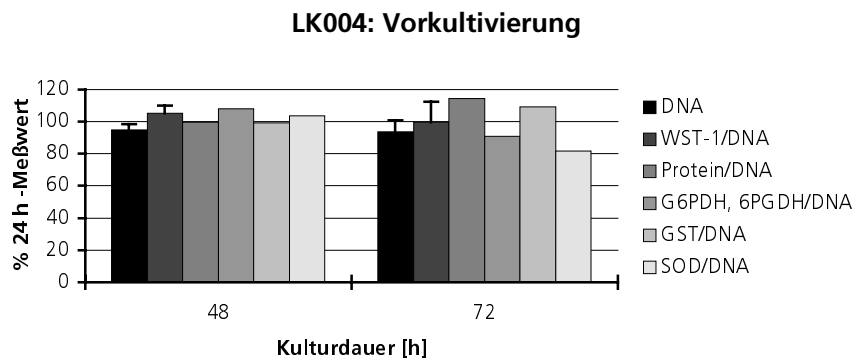


Abb. 3.14 Verschiedene zellbiochemische Parameter bei nicht-proliferativer Kultur mit proliferativer Vorkultur (Zeitraum bis 72 Stunden nach Umstellung auf nicht-proliferative Bedingungen)

Die Untersuchungen bei den Zeitpunkten 24 Stunden und 48 Stunden nach Wechsel zu nicht-proliferativen Bedingungen lieferten vergleichbare Ergebnisse. Nach 72 Stunden Kulturdauer hingegen wurden leichte Verringerungen der Aktivität der Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase und der Superoxid-Dismutase sichtbar. Daher wurde das System für den Einsatz in Expositionsexperimenten nicht über den Zeitraum von 48 Stunden nach Wechsel zu nicht-proliferativen Bedingungen hinaus eingesetzt.

3.2.4 Einführung einer Vorkultur mit Selenzusatz

Zur Erhöhung der Meßbarkeit der Aktivität der Glutathion-Peroxidase sollte eine Enzyminduktion durch Vorinkubation mit Natrium-Selenit in einer Endkonzentration von 60 nmol/l erfolgen (vgl. Kapitel 3.3.6). Zur Untersuchung der toxischen Wirkung dieser Substanzdosis wurde ihre Wirkung auf den DNA-Gehalt und den Tetrazoliumsalzumsatz für die Dauer der Vorkultur in einem Einzelexperiment untersucht. In der folgenden Grafik sind die Meßergebnisse der genannten Endpunkte für Zellen bei einer Konzentration von 60 nM Natrium Selenit im Kulturmedium im Verhältnis zu Zellen, welche ohne Selenit-Zusatz kultiviert wurden, dargestellt.

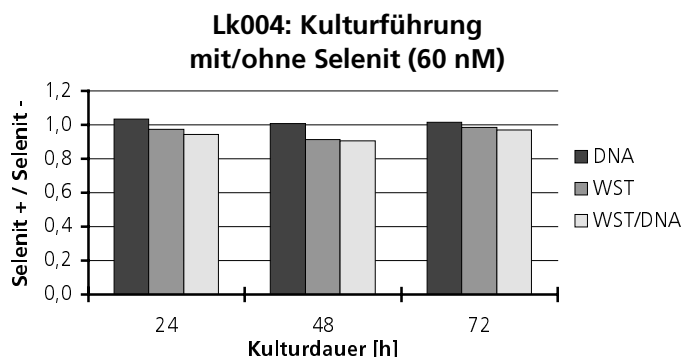


Abb. 3.15 Vergleich der Zellkultur mit und ohne Na-Selenit Zusatz (DNA-Gehalt, Tetrazoliumsalzumsatz (WST-1), normiert)

Die Messung des DNA-Gehaltes ließ über den beobachteten Zeitraum von 72 Stunden keinen negativen Einfluß des Selenit-Zusatzes zum Kulturmedium erkennen. Der Tetrazoliumsalzumsatz lag zwar in Gegenwart von Selenit etwas tiefer, doch betrug der Unterschied nur ca. 5 %. Zusätzlich läßt die Darstellung erkennen, daß er sich über den untersuchten Zeitraum nicht verringerte, sondern konstant war.

3.2.5 Kultivierung mit Hepes-Zusatz, Zellsystem HFBE

Zellen der Zelllinien Lk004 und HFBE wurden unter Bedingungen für eine nicht-proliferative Zellkultur mit proliferativer Vorkultur in den Zellzahlen 1250, 2500 und 5000 je MTP-Well angezchtet. Zum Wechsel zur nicht-proliferativen Kultur wurde jedoch RPMI 1640 Medium mit Hepes-Zusatz (25 mM) eingesetzt. Es wurde der DNA-Gehalt und der Tetrazoliumsalzumsatz (WST-1) über die folgenden 72 Stunden untersucht. Dabei erfolgte die Kultur unter zelltypspezifischen Bedingungen (5 % CO₂) oder ohne CO₂ im Brutschrank. Die Ergebnisse jeweils eines Einzelexperimentes sind in den folgenden Grafiken dargestellt.

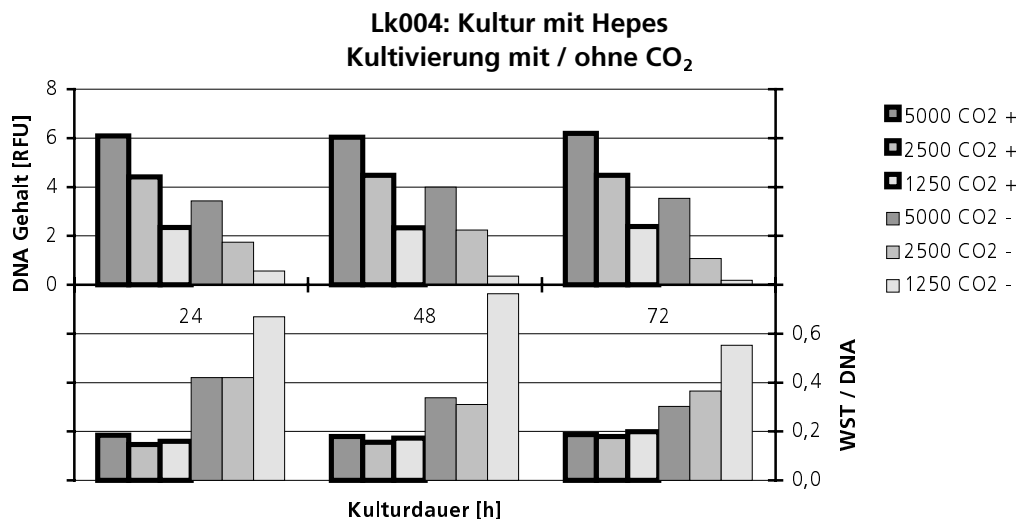


Abb. 3.16 Kultivierung von Lk004-Zellen in Hepes-Kulturmedium unter zelltypspezifischen Bedingungen oder ohne CO₂

Die Ergebnisse der Analyse des DNA-Gehalts zeigen, daß die Zellmenge in dem beobachteten Zeitraum unter zelltypspezifischen Bedingungen keine Veränderung erfuhr. Es fand weder Proliferation statt, noch kann eine toxische Wirkung abgelesen werden. Der Tetrazoliumsalzumsatz ist bis zum Zeitpunkt 72 Stunden stabil. Für das System ohne Kohlendioxid zeigen die Ergebnisse, daß Lk004-Zellen auch mit zusätzlicher Pufferung des Kulturmediums durch Hepes in einer längerfristigen submersen Kultur ohne CO₂ Beimischung nicht vital erhaltbar waren. Der DNA-Gehalt lag bereits nach 24 Stunden deutlich unter demselben bei der zelltypspezifischen Kultivierung. Der normierte Tetrazoliumsalzumsatz lag bis zu 4mal höher als unter konventionellen Bedingungen und fiel leicht mit zunehmender Kulturdauer.

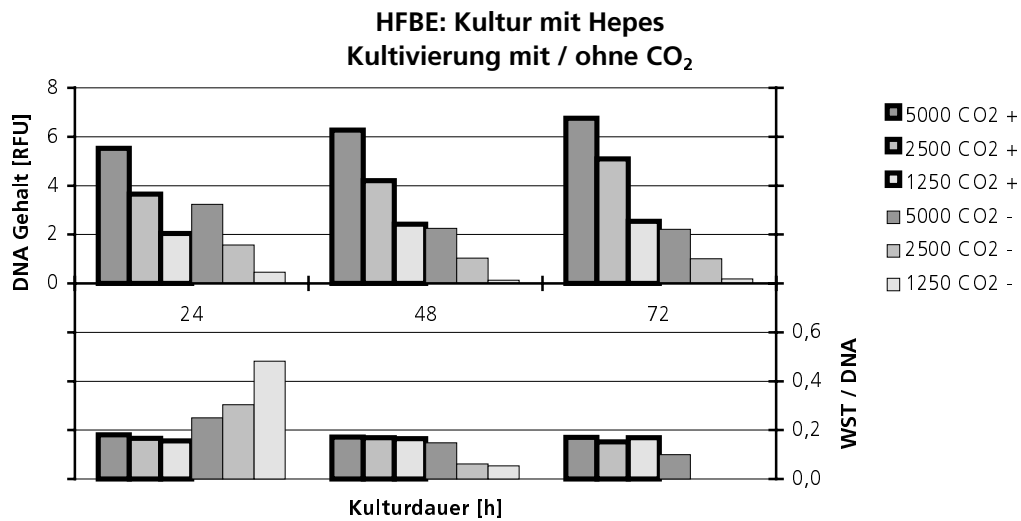


Abb. 3.17 Kultur von HFBE-Zellen in Hepes-Kulturmedium unter zelltypspezifischen Bedingungen oder ohne CO₂

HFBE-Zellen waren unter den beschriebenen Bedingungen nicht vollständig proliferationsinhibiert. Die Messung des DNA-Gehaltes zeigte, daß die Zellmenge im Zeitraum der untersuchten 48 Stunden leicht zunahm. Der normierte Tetrazoliumsalzumsatz hingegen lag für die drei Zellzahlen bei einem einheitlichen Wert und war zeitlich konstant. Die bei Lk004-Zellen gemachten Beobachtungen wurden im Zellkultursystem HFBE bestätigt. Der DNA-Gehalt bei Kultivierung ohne CO₂ lag deutlich unter dem des Systems in zelltypspezifischen Bedingungen, der Tetrazoliumsalzumsatz war innerhalb der ersten 24 Stunden deutlich gegenüber dem Vergleichssystem gesteigert und nahm in den folgenden 48 Stunden stark ab, bis er nach 72 Stunden in den beiden kleinen Zellzahlen nicht mehr meßbar war. Eine mehrtägige Kulturführung ohne Kohlendioxid war somit auch in diesem Zellsystem nicht möglich.

3.2.6 Zusammenfassung

Lk004-Zellen stellen ein Zellkultursystem mit humanen, adulten Lungenfibroblasten dar. Sie zeigten unter proliferativen Bedingungen eine mittlere Verdoppelungszeit von 24 Stunden. Durch eine Kulturführung ohne FKS war eine vollständige Proliferationsinhibition in diesem Zellsystem zu erreichen. Dabei änderten sich zellbiochemische Eigenschaften des Systems, was sich durch einen erhöhten Tetrazoliumsalzumsatz und eine verringerte Phosphofruktokinase-Aktivität ausdrückte. Unter Berücksichtigung der experimentellen Ergebnisse zur LDH-Freisetzung in das Kulturmedium und der Glutathion-S-Transferase-Aktivität konnte jedoch keine negative Auswirkung auf das Kultursystem festgestellt werden.

Die Einführung einer proliferativen Vorkultur minderte nicht die Reproduzierbarkeit des Systems. Experimente mit drei unabhängigen Einzelversuchen zeigten für den DNA-Gehalt und den Tetrazoliumsalzumsatz Schwankungsbreiten von 5 - 10 %. Die

Untersuchung verschiedener zellbiochemischer Parameter ließ auch nach einer 72stündigen Vorkultur und Umstellung auf nicht-proliferative Bedingungen für mindestens weitere 48 Stunden keine signifikanten Änderungen in den untersuchten zellbiochemischen Endpunkten erkennen.

Bei Zusatz von Natrium-Selenit in einer Konzentration von 60 nmol/l konnte im untersuchten Zeitraum von 72 Stunden keine toxische Wirkung festgestellt werden.

Lk004-Zellen konnten auch unter nicht-proliferativen Bedingungen unter Zusatz von Hepes-Puffer (25 mM) zum Kulturmedium gezüchtet werden. Eine Kultivierung ohne CO₂ war jedoch für einen Zeitraum von 24 Stunden oder länger nicht möglich.

Auch die Kultivierung von HFBE-Zellen, humane fetale Bronchialepithelzellen, war nach den für Lk004 etablierten Zellkulturmethoden (nicht-proliferatives System nach proliferativer Vorkultur, zusätzliche Pufferung des Kulturmediums durch HEPES) möglich. Dennoch zeigten diese Zellen auch in Kultur ohne FKS eine geringe Proliferationsfähigkeit. Auch dieses Zellsystem konnte trotz Hepes-Pufferung des Kulturmediums nicht längerfristig ohne Kohlendioxid kultiviert werden.

3.3 Etablierung analytischer Methoden

Es wurden Methoden zur Messung zellulärer Parametern an adhärennten Zellen in kleiner Zellzahl durchgeführt. Die Endpunkte waren dabei in folgende Gruppen zu unterteilen:

- Endpunkte zur Bestimmung der Zellmenge:
Elektronische Zellzählung, Bestimmung des Protein- oder DNA-Gehaltes
- intrazelluläre enzymatische Aktivitäten aus dem Bereich des zellulären Energiestoffwechsels und zur allgemeinen Zellvitalität:
Tetrazoliumsalzumsatz, Aktivitäten von Phosphofruktokinase, Enolase, Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase, Konzentration der Adenosinphosphate AMP, ADP, ATP, Lactat-Dehydrogenase-Freisetzung in das Kulturmedium
- Endpunkte im Zusammenhang mit dem Glutathion-Redox-Zyklus und oxidativem Streß:
Enzymatische Aktivitäten von Glutathion-Reduktase, Glutathion-Peroxidase, Glutathion-S-Transferase, Katalase, Superoxid-Dismutase, Konzentration von reduziertem und oxidiertem Glutathion, Lipidperoxidation

Zum Teil konnten die Methoden zur Bestimmung dieser Endpunkte Vorarbeiten entnommen oder mit Hilfe kommerzieller Kits durchgeführt werden. Dies betrifft die elektronische Zellzählung, die Bestimmung des Proteingehaltes und die Analyse des Tetrazoliumsalzumsatzes und der LDH-Freisetzung in das Kulturmedium. Der Großteil der Methoden mußte jedoch auf Grundlage etablierter Standard-Verfahren für die Untersuchung kleiner adhärennter Zellmengen erarbeitet werden.

Die Methoden sollten in Routine-Untersuchungen auch zur Messung kinetischer Effekte eingesetzt werden. Daher war ihre Formulierung in einen „Kit“-artigen Ablauf essentiell, um eine Durchführung mit geringem Aufwand und hoher Reproduzierbarkeit zu gewährleisten. Es wurde somit nach Möglichkeit stets das gleiche Arbeitsschema für die Durchführung der Analysen etabliert, welches sich in 3 Arbeitsschritte gliedert:

- (1) Es enthält einen *Extraktionsschritt*, welcher Enzymaktivitäten oder die zu analysierenden Metaboliten freistellt und deren weitere Konzentrations- oder Aktivitätsveränderung durch zelluläre Prozesse inhibiert.
- (2) Zu dem „Extrakt“ wird ein *Premix* gegeben, der einen Teil der Assaykomponenten enthält. Es wird eine Vorinkubation zur Thermostatisierung und Homogenisierung des Reaktionsgemisches durchgeführt.
- (3) Durch Zugabe eines *Startreagenzes* mit möglichst kleinem Volumen und Überführung der Meßplatte in das Meßgerät wird die Analysereaktion gestartet.

Die Arbeitsorganisation nach diesem Schema ermöglichte die Analyse mehrerer Endpunkte zu kinetischen Meßzeitpunkten innerhalb eines Experiments mit hoher Robustheit und Reproduzierbarkeit.

3.3.1 Messung des DNA-Gehaltes in adhärennten Zellkulturaussaaten

Für die Messung des DNA-Gehaltes in adhärennten Zellkulturen direkt in dem verwendeten Kulturgefäß (MTP oder Transwells) wurden zwei verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe verwendet. Sie zeigen unterschiedliche Eigenschaften im Hinblick auf die Sensitivität und den Präparationsaufwand hinsichtlich der Probenvorbereitung. Die Fluorophoren PicoGreen und Hoechst 33258 erfahren durch Interkalation in die DNA eine starke Erhöhung ihrer Fluoreszenzeigenschaften. Dabei interkaliert PicoGreen mit gleicher Effizienz in poly(dA), poly(dT), poly(dG) und poly(dC) Homopolymere. Hoechst 33258 dagegen interkaliert vorwiegend zwischen A-T Basenpaare (Singer *et al.*, 1997). Die Bindungsfähigkeit an doppelsträngige RNA unterscheidet die Farbstoffe ebenfalls. Während PicoGreen nicht an dsRNA bindet, muß die Bindung von Hoechst 33258 an dsRNA durch einen Natriumchlorid-Hochsalzpuffer unterdrückt werden. Aus diesem Grund ist die Fixierung der Zellen und ihre Aufarbeitung bis zur Färbung bei Verwendung dieses Farbstoff aufwendiger.

3.3.1.1 Messung mit PicoGreen in Mikrotiterplatten

Die analytische Methode wurde Vorarbeiten entnommen. Zur Erstellung einer Eichgerade zur Messung des DNA-Gehaltes in Zellen ohne DNA-Extraktion wurden Lk004-Zellen nach Trypsinierung elektronisch gezählt und in Verdünnungen in Mikrotiterplatten eingebracht. Es folgte die Messung des DNA-Gehaltes mit PicoGreen. Die Ergebnisse dreier unabhängiger Experimente sind in Abb. 3.18 dargestellt.

Die Meßergebnisse zeigen eine Proportionalität zwischen Zellzahl und Fluoreszenzsignal. Die Streuung ist jedoch so groß, daß die Erstellung einer Eichgeraden, über welche die Zellzahl aus dem Fluoreszenzsignal errechnet werden konnte, nicht sinnvoll erschien. Der Grund für diese Streuung lag in der Verdünnung der geringen Zellmengen in der Mikrotiterplatte und ihrer unvollständigen Fixierung. Bei der Anwendung der Methode

mit adhärennten Zellen ließen sich hingegen Messungen mit sehr guter Reproduzierbarkeit erreichen (siehe Ergebnisse - Zellkultur, Behandlungen, etc.).

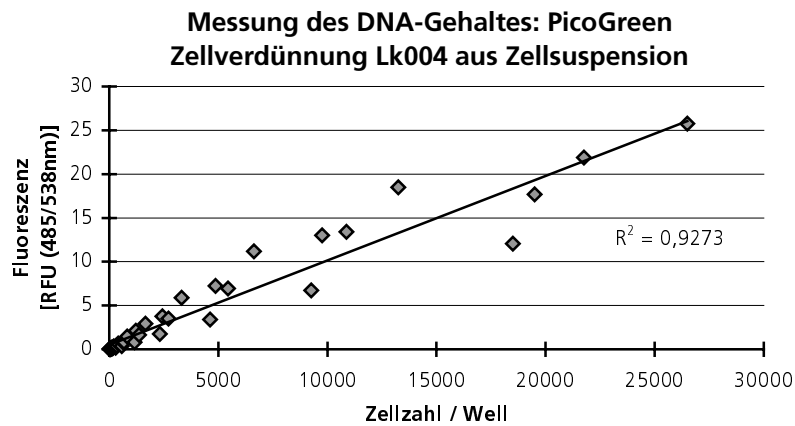


Abb. 3.18 Messung des DNA-Gehaltes in Lk004-Zellen mit Farbstoff PicoGreen® in MTP nach Herstellung von Zellverdünnungen aus Zellsuspensionen.

Es wurde weiterhin erprobt, Zellen in Mikrotiterplatten auszusäen und nach der Anheftungphase durch elektronische Zellzählung zu quantifizieren. Bedingt durch die Trypsinierung aus dem Mikrotiter-Well ergaben diese Experimente jedoch keine qualitativ besseren Ergebnisse. Daher wurden Meßwerte der DNA-Bestimmungen nicht in Zellzahlen umgerechnet, sondern in ihrer Meßeinheit RFU zur weiteren Auswertung belassen.

3.3.1.2 Messung mit Hoechst 33258 in Mikrotiterplatten

Für die Anwendung dieses Farbstoffes bei der Messung des DNA-Gehaltes adhärenter Zellen in Mikrotiterplatten mußte ein alternatives Fixierungsverfahren gefunden werden, da die bei der PicoGreen Bestimmung verwendete Ethanolfixierung bei Verwendung des Farbstoffes Hoechst 33258 nicht möglich ist. Publierte Methoden beziehen sich auf Zellsuspensionen (Verwendung von Titon X-100, NH_4OH , (Downs *et al.*, 1983), alkalische Elution, (Sterzel *et al.*, 1985)) oder verwenden eine Extraktion durch wiederholtes Auftauen und Einfrieren (Rago *et al.*, 1990), die nicht mit Erfolg eingesetzt werden konnte. Es wurde daher eine Methode zur Untersuchung von Mykoplasmen adaptiert (Verwendung von Methanol/Eisessig, (Chen, 1977)), nach der die Messung des DNA-Gehaltes mit Hoechst 33258 erfolgreich durchgeführt werden konnte. Zum Erhalt eines möglichst großen Signal/Rauschverhältnisses wurden Farbstoffkonzentration und -Inkubationszeit, Waschstrepschritte nach der Färbung, Reagenzienvolumina und die Anregungs- und Emissionswellenlängen für die Messung im verwendeten Fluoreszenzmikrotiterplatten-Reader optimiert. Als Beispiel für durchgeführte Optimierungen wird in der folgenden Grafik die Optimierung von Farbstoffkonzentration und -inkubationszeit bei Verwendung einer Mikrotiterplattenaussaat von LK004-Zellen gezeigt:

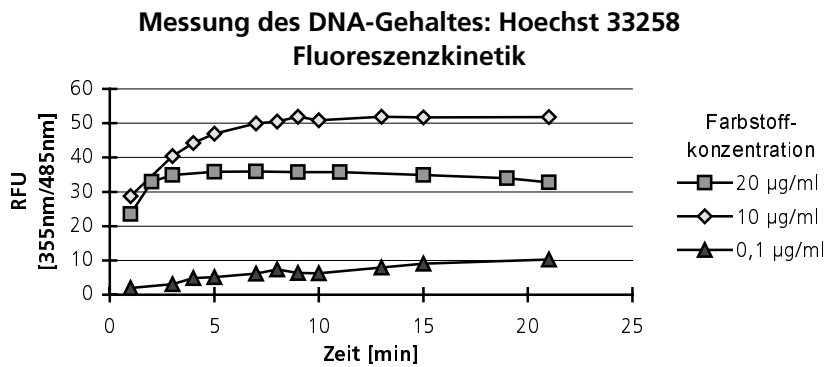


Abb. 3.19 Kinetik der Fluoreszenzmessung von adhärennten Zellen in Mikrotiterplatten mit Hoechst 55238 in verschiedenen Konzentrationen bei einer Zellmenge von ca. 20000 Lk004-Zellen je MTP-Well.

Mit der so etablierten Methode wurden Messungen der DNA-Gehalte von Zellen in Mikrotiterplatten innerhalb verschiedener Expositionsexperimente durchgeführt. Die folgende Grafik zeigt das Ergebnis einer solchen Messung an einer Aussat von Lk004-Zellen in der Mikrotiterplatte mit den Zellzahlen 1250, 2500 und 5000 Zellen pro Well (Einzelexperiment mit 6 Meßparallelen in der MTP).

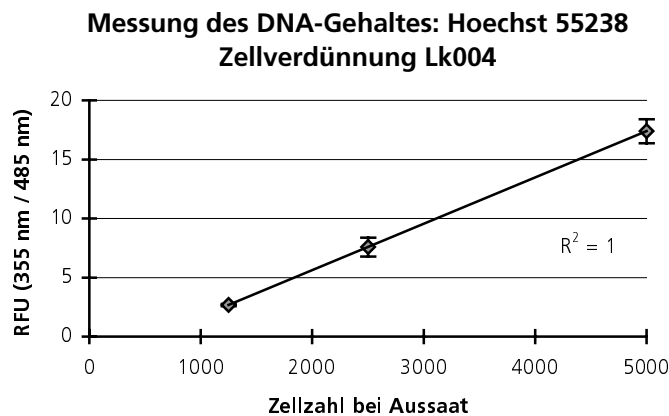


Abb. 3.20 Messung des DNA-Gehaltes mit Hoechst 33258 in der Mikrotiterplatte an Lk004-Zellen in den Zellzahlen 1250, 2500 und 5000 je MTP/Well.

Das Meßergebnis zeigt eine hohe Fluoreszenzausbeute und gute Reproduzierbarkeit an.

3.3.1.3 Messung in Transwell-Inserts

Messungen des DNA-Gehaltes wurden mit dem Farbstoff PicoGreen in Inserts im 6-Well-Format im Rahmen der Zelleexpositionen gegen Gas nach gängigem air/liquid-Konzept (vgl. Kapitel 3.1) durchgeführt. Die Messung in Inserts im 12-Well-Format erwies sich als nicht zuverlässig, da die Plastikwände der Transwells bei den benötigten Fluoreszenzwellenlängen ebenfalls angeregt werden. Im Falle von 6-Well-Transwells konnte der Abstand von Meßfeld zu Wänden im Analysegerät (Fluoroskan Ascent) groß genug eingestellt werden, um Beeinflussungen des Meßergebnisses durch diesen Effekt zu unterbinden. Dies war in kleineren Transwells aufgrund ihrer Geometrie nicht möglich. Messungen mit dem Farbstoff Hoechst 33258 waren auf den verwendeten Transwell-Membranen grundsätzlich nicht möglich, da festgestellt wurde, daß das

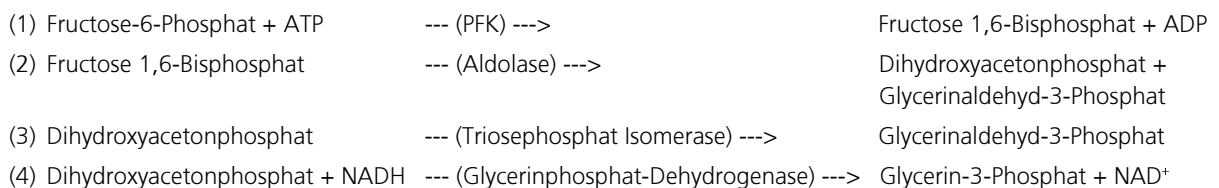
Membranmaterial PET bei der eingesetzten Anregungswellenlänge von 355 nm (PicoGreen : 485 nm) eine starke Eigenfluoreszenz zeigte. Aus diesem Grund wurde zur Analyse der Zellmenge in Transwell-Inserts im 12-Well-Format ausschließlich die elektronische Zellzählung durchgeführt.

3.3.2 Messung von Enzymaktivitäten des zellulären Energiestoffwechsels: Phosphofruktokinase, Enolase, Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase

Die Etablierung von Assays zur Bestimmung der Aktivitäten der Enzyme Phosphofruktokinase, Enolase und Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase orientierte sich an Standard-Enzymassays, welche für die direkte Bestimmung der intrazellulären Enzymaktivitäten von Zellen in Mikrotiterplatten adaptiert wurden.

Phosphofruktokinase (PFK)

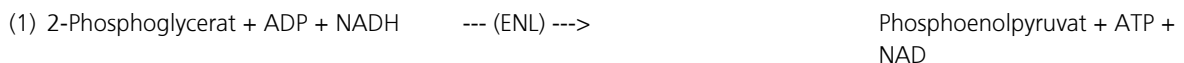
Die Phosphofruktokinase-Aktivität wird in einem gekoppelten Enzym-Assay (Andres *et al.*, 1996) bestimmt, der teilweise einen Ausschnitt aus den Reaktionen der Glykolyse darstellt:



Die Veränderung der NADH-Konzentration bei 340 nm wird kinetisch über einen Zeitraum von 10 Minuten verfolgt. Die Extinktionsabnahme pro Zeiteinheit ist proportional der Enzymaktivität.

Enolase (ENL)

Die Enolase ist ebenfalls ein Enzym der Glykolyse, welches die Umsetzung von 2-Phosphoglycerat zu Phosphoenolpyruvat katalysiert (Andres *et al.*, 1996).



Auch hier wird der Veränderung der NADH-Konzentration kinetisch bei 340 nm beobachtet und die Steigung der Reaktionsgeraden ausgewertet.

Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6PDH)

Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase und 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase (6PGDH) sind zwei Enzyme des Pentose-Phosphat-Weges (Deutsch, 1985). G6PDH katalysiert die Umsetzung von Glucose-6-Phosphat und NADP zu 6-Phosphogluconolacton und NADPH. 6PGDH setzt 6-Phosphogluconat mit NADP zu Ribulose-5-Phosphat und NADPH um. Verknüpft werden beide Umsetzungen durch die Überführung von

6-Phosphogluconolacton in 6-Phosphogluconat, die durch das Enzym Lactonase katalysiert wird.

- 1) Glucose-6-P + NADP $\xrightarrow{\text{---(G6PDH)---}}$ 6-Phosphogluconolacton + NADPH
- 2) 6-Phosphogluconolacton + H₂O $\xrightarrow{\text{---(Lactonase)---}}$ 6-Phosphogluconat
- 3) 6-Phosphogluconat + NADP $\xrightarrow{\text{---(6PGDH)---}}$ Ribulose-5-P + NADPH + CO₂

Für die Messung der G6PDH-Aktivität gibt es folglich mehrere Möglichkeiten:

- a) Differenzbildung aus einer Messung der 6PGDH-Aktivität allein und Messung der Gesamtaktivität G6PDH + 6PGDH.
- b) Messung der Gesamtaktivität G6PDH + 6PGDH unter Zusatz von 6PGDH, mit dem Ziel, die G6PDH-Reaktion zum geschwindigkeitsbestimmenden Schritt zu machen.
- c) Messung der Gesamtaktivität G6PDH + 6PGDH unter Zusatz eines Inhibitors für die endogene 6PGDH-Aktivität.

Es wurde die letztgenannte Methode gewählt, da sie die Möglichkeit bietet, mit und ohne Inhibitor sowohl die Gesamtaktivität als auch nur die G6PDH-Aktivität zu bestimmen. Der eingesetzte Inhibitor Maleinimid ist unter finanziellen Gesichtspunkten günstiger als 6PGDH, mit deren Einsatz nach Methode b) ein ähnliches Verfahren denkbar wäre. Durch Aufteilung einer Mikrotiterprobenplatte mit 6 parallelen Zellaussaaten und Behandlungen in zwei Gruppen ist daher mit nur geringem Aufwand die gesamte und die differentielle Aktivität bestimmbar.

Mit kommerziell verfügbaren Enzymverdünnungen wurden für die beschriebenen drei Assays Eichreihen aufgenommen. Die folgende Grafik zeigt die Mittelwerte für Eichreihen aus zwei bzw. drei (Enolase) unabhängigen Messungen.

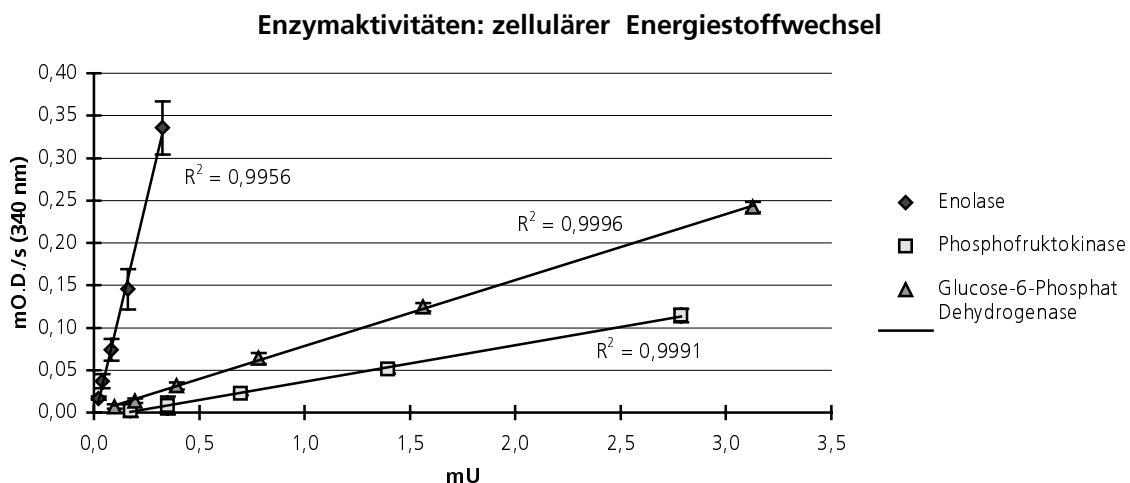


Abb. 3.21 Eichreihen mit Enzymverdünnungen für die Messung der Aktivitäten der Phosphofruktokinase, der Enolase und der Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase

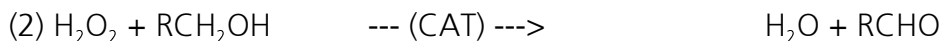
Die Ergebnisse zeigen für alle drei Assays ein ähnliches Detektionslimit im Bereich von 0,1 mU, gute Linearität und ausreichende Reproduzierbarkeit.

3.3.3 Messung der Katalase-Aktivität

Da Enzym Katalase reagiert nach zwei verschiedenen Reaktionstypen. Die klassische Katalase-Aktivität des Enzyms disproportioniert Wasserstoffperoxid zu Wasser und Sauerstoff:



Im Falle der peroxidativen Aktivität ist auch die Oxidation von kurzen, aliphatischen Alkoholen mit Wasserstoffperoxid zum Aldehyd und Wasser möglich:



Der Reaktionsmechanismus läuft dabei nach Bindung eines Wasserstoffperoxid Moleküles über ein gemeinsames Zwischenprodukt, „Compound I“ (Chance *et al.*, 1979), welches durch eine charakteristische Veränderung der Absorption des Enzym- H_2O_2 Komplexes bei 405 nm nachgewiesen werden kann (Sies *et al.*, 1970).

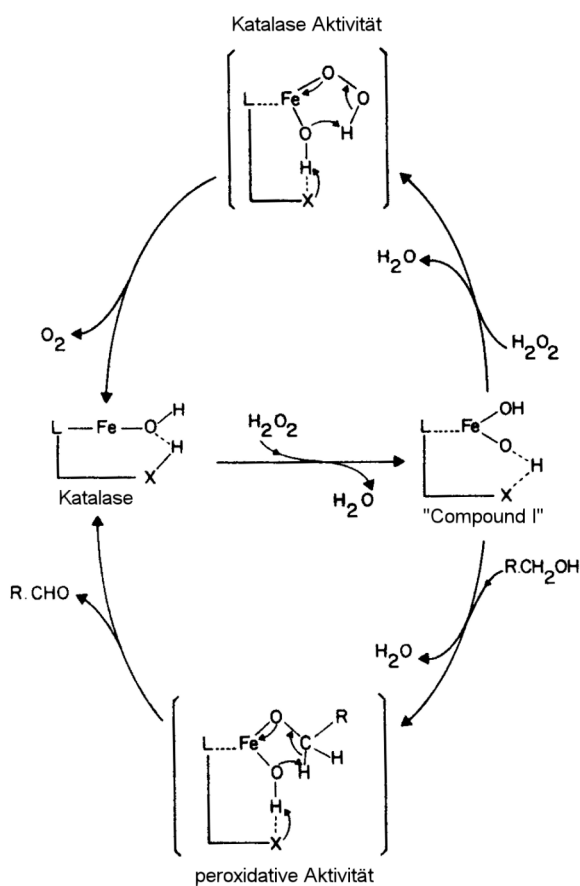


Abb. 3.22 Reaktionsmechanismus der Katalase (Chance *et al.*, 1979)

Die Messung der Katalase-Aktivität kann direkt durch photometrische Messung des katalysierten Wasserstoffperoxid-Zerfalls bei 240 nm erfolgen (Aebi, 1974). Die Reaktion ist aber aufgrund der extrem hohen Wechselzahl des Enzyms ($k = 1,7 \times 10^7 \text{ Mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$) sehr schnell abgeklungen. Dies macht sie für die Routinemessung unpraktikabel. Die Wellenlänge schließt außerdem eine Messung im Mikrotiterplatten-Reader aus. Die peroxidative Aktivität der Katalase hingegen führt zu einer langsameren Reaktion ($k = 0,2 - 1 \times 10 \text{ Mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$). Durch Einsatz eines Alkoholes, Oxidation desselben zum Aldehyd und anschließende Detektionsreaktion des Produktes ist zudem eine Umsetzung in einen kolorimetrischen Assay möglich.

Es wurde daher ein Assay zur Verwendung in Mikrotiterplatten adaptiert, in dem Methanol zu

Formaldehyd umgesetzt wird (Johansson *et al.*, 1988; Wheeler *et al.*, 1990). Letzteres reagiert mit dem Farbstoff Purpald zum violetten Chromophor. Dessen Konzentration

kann photometrisch im Mikrotiterplatten-Reader bei 562 nm bestimmt werden. Die Messung von Katalase-Enzymverdünnungen ergab folgende Eichgerade:

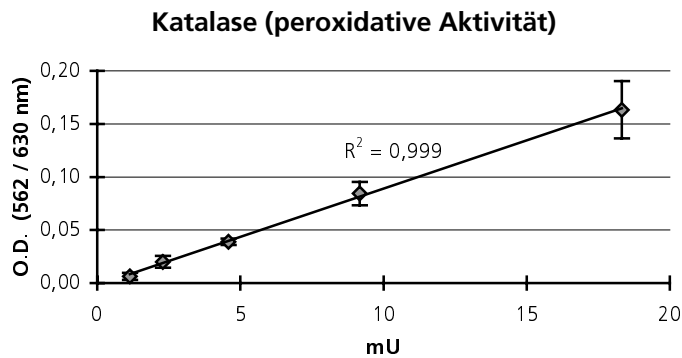


Abb. 3.23 Eichreihe mit Enzymverdünnung für die Messung der Katalase (peroxidative Aktivität)

Das Detektionslimit lag mit ca. 1 mU etwas höher als bei den auf dem NAD-Umsatz beruhenden Assays für die Enzyme des Energiestoffwechsels. Die Reproduzierbarkeit und Linearität sind ähnlich gut wie dort zu bewerten.

3.3.4 Messung der Aktivität der Glutathion-S-Transferasen

Glutathion-S-Transferasen katalysieren unspezifisch die Kopplung verschiedener nukleophiler Agentien an reduziertes Glutathion. Im verwendeten Assay wird die Umsetzung von 1-Chlor-2,4-dinitrophenol mit reduziertem Glutathion photometrisch bei 340 nm verfolgt (Vandenberghé *et al.*, 1988). In der folgenden Grafik wird das Ergebnis der Messung von Enzymverdünnungen gezeigt.

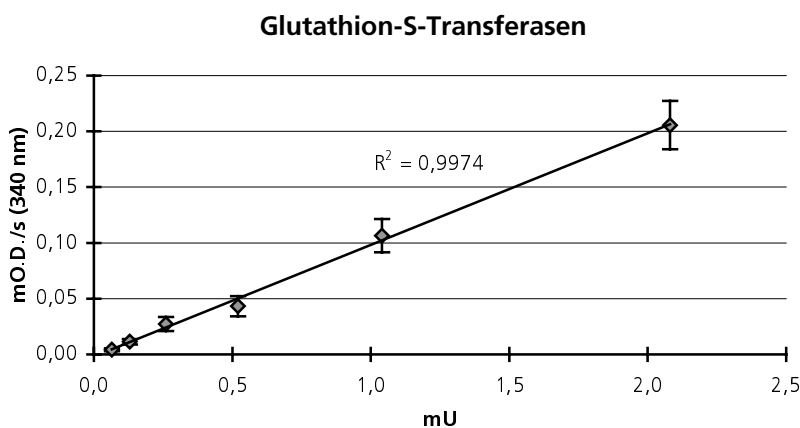
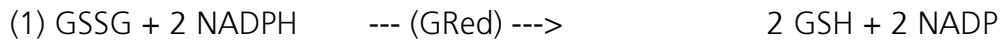


Abb. 3.24 Eichreihe mit Enzymverdünnung für die Messung der Aktivität der Glutathion-S-Transferasen

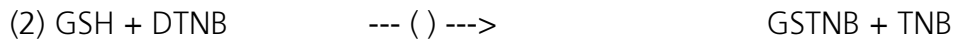
In Übereinstimmung mit anderen bisher vorgestellten Enzymassays ergab sich auch hier ein Detektionslimit von ca. 0,1 mU und eine gute Reproduzierbarkeit und Linearität.

3.3.5 Messung der Glutathion-Reduktase-Aktivität

Die Glutathion-Reduktase setzt oxidiertes Glutathion (GSSG) unter Oxidation von NADPH zu reduziertem Glutathion um.



Diese Reaktion wurde zunächst direkt als Detektionsreaktion für die Aktivität der Glutathion-Reduktase verwendet (Bompart *et al.*, 1990; Wheeler *et al.*, 1990). Dabei wurde der Abbau von NADPH im Mikrotiterplatten-Reader bei 340 nm kinetisch beobachtet. Die Reproduzierbarkeit und Sensitivität der Methode erwies sich aber als unzureichend zur Untersuchung der Mikrotiterplatten Zellaussaaten. Die Variation der Konzentration der Assay Komponenten brachte keine Verbesserung. Erfolgreich war hingegen die Erweiterung der Assays um eine Reaktion mit 5,5-Dithio-bis-(2-nitrobenzoesäure (DTNB), (Smith *et al.*, 1988).



Die Reaktion wird photometrisch im Mikrotiterplatten-Reader bei 405 nm kinetisch verfolgt. Eichreihen mit Enzymverdünnungen gaben folgendes Meßergebnis:

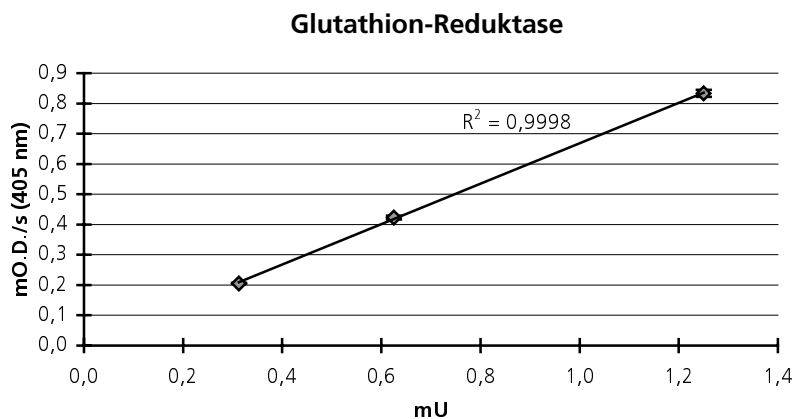
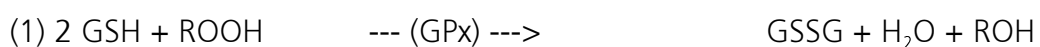


Abb. 3.25 Eichreihe mit Enzymverdünnung für die Messung der Glutathion-Reduktase-Aktivität

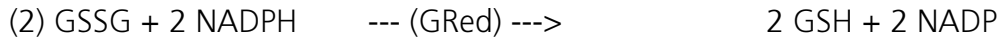
Diese Methode zeigte hervorragende Eigenschaften im Hinblick auf Sensitivität und Reproduzierbarkeit.

3.3.6 Messung der Glutathion-Peroxidase-Aktivität

Die Glutathion-Peroxidase katalysiert die Reduktion von organischen Hydroperoxiden und Wasserstoff mit reduziertem Glutathion zu Alkoholen bzw. zu Wasser:



Die Messung kann zur Aktivitätsbestimmung des Enzyms genutzt werden, wenn an diese Reaktion die Umsetzung von oxidiertem Glutathion durch die Glutathion-Reduktase angeschlossen wird (Faraji *et al.*, 1987; Wheeler *et al.*, 1990):



Es wurde die Abnahme der NADPH-Konzentration photometrisch bei 340 nm gemessen. Im Assay wurde als organisches Hydroperoxid *tert.*-Butylhydroperoxid eingesetzt. Zunächst konnten mit der Methode keine reproduzierbaren Analysen durchgeführt werden. Der Grund hierfür war eine Hintergrundaktivität im Blank (Assay ohne Probe). Es wurde vermutet, daß in der eingesetzten Glutathion-Reduktase (Ammoniumsulfat Suspension) Restaktivitäten von Glutathion-Peroxidase störend hervortraten. Durch Einsatz einer höher aufgereinigten Glutathion-Reduktase (Lyophilisat) wurde eine deutliche Verbesserung erhalten. Unter Verwendung dieser Methode wurden folgende Meßergebnisse mit Enzymverdünnungen der Glutathion-Peroxidase erhalten.

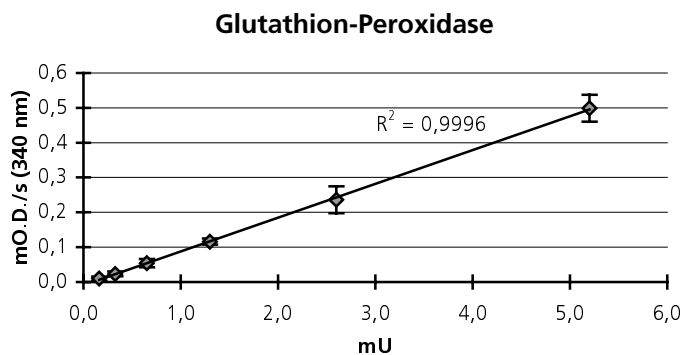


Abb. 3.26 Eichreihe mit Enzymverdünnung für die Messung der Glutathion-Peroxidase-Aktivität

Die Meßwerte gliedern sich im Hinblick auf gute Reproduzierbarkeit und Linearität der Eichgeraden zwanglos in die Ergebnisse der anderen erarbeiteten Methoden zur Aktivitätsbestimmung von Enzymen ein. Die Analyse der Enzymaktivität in Zellaussaten ergab jedoch eine schlechte Reproduzierbarkeit nahe der Sensitivitätsgrenze des Assays. Es wurde daher ein Protokoll erarbeitet, innerhalb dessen die intrazellulären Glutathion-Peroxidase-Aktivitäten in Lk004-Zellen durch Vorinkubation mit Natrium-Selenit induziert wurden (Baker *et al.*, 1993; Ochi, 1990; Ochi *et al.*, 1989). Dazu wurde zunächst die Induzierbarkeit der Aktivität in Abhängigkeit von der Natrium-Selenit-Konzentration untersucht. In der folgenden Grafik ist diese Abhängigkeit im Verhältnis zur unbehandelten Kontrolle aufgetragen. Gleichzeitig wurde auch die Aktivität eines nicht Selen-abhängigen Enzyms, der Glutathion-Reduktase, analysiert. Die Ergebnisse wurden nach einer 24stündigen Inkubation von Lk004-Zellen (nicht-proliferatives System mit proliferativer Vorkultur) in Mikrotiterplatten erhalten.

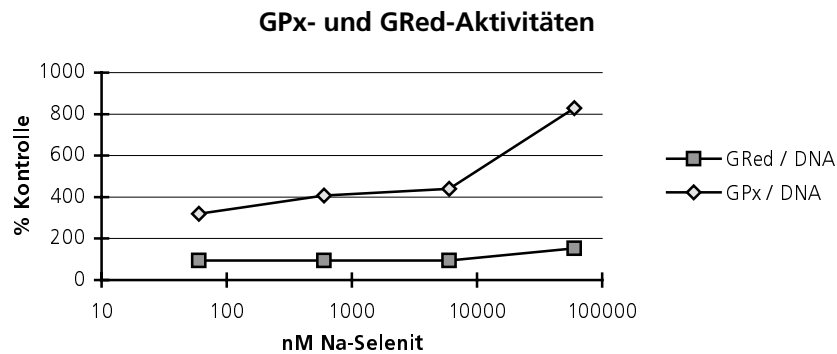


Abb. 3.27 Induzierbarkeit der Glutathion-Peroxidase-Aktivität in Lk004-Zellen durch 24stündige Inkubation mit Natrium-Selenit

Das Ergebnis zeigt eine deutliche Steigerung der Glutathion-Peroxidase-Aktivität mit zunehmender Natrium-Selenit-Konzentration. Die Meßergebnisse für das in seiner Aktivität nicht vom Selen abhängige Enzym Glutathion-Reduktase hingegen unterlagen vergleichsweise keiner derartigen Abhängigkeit. Zur Untersuchung der zytotoxischen Wirkung der Inkubation mit Natrium-Selenit wurde ein entsprechendes Experiment zur Messung des DNA-Gehaltes und des Tetrazoliumsalzumsatzes durchgeführt.

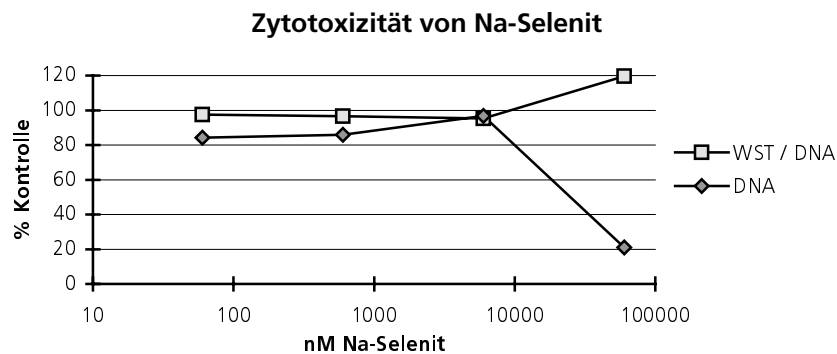


Abb. 3.28 Zytotoxizität von Natrium-Selenit auf Lk004-Zellen nach 24stündiger Inkubation

An den Ergebnissen der Untersuchung des DNA-Gehaltes ist deutlich ablesbar, daß eine starke Zytotoxizität im Bereich von Konzentrationen größer als 6 μM Natrium-Selenit einsetzte. Für die Anwendung in der Standard-Zellkulturführung wurde daher eine Konzentration von 60 nM Natrium-Selenit gewählt. Diese Konzentration wurde vor ihrem Einsatz in der Phase der proliferativen Vorkultur nochmals auf ihre zytotoxische Wirkung für den gesamten Inkubationszeitraum von 72 Stunden überprüft (vgl. Kapitel 3.2.4). Es konnte keine negative Wirkung auf das Zellsystem festgestellt werden. Daher wurde die Vorinkubation mit Selenit für die Phase der proliferativen Vorkultur zur Induktion der Glutathion-Peroxidase-Aktivität in Lk004-Zellen in das Kulturprotokoll übernommen. Mit Wechsel vom proliferativen zum nicht-proliferativen System wurde der Selenit-Zusatz entfernt, so daß keine Wechselwirkung zwischen der Chemikalie mit Prüfsubstanzen innerhalb eines Experimentes zu erwarten war. Die Aktivitätssteigerung des Enzyms nach diesem Protokoll betrug zum Zeitpunkt eines potentiellen

Behandlungsbegins 250 % einer nicht mit Selenit vorinkubierten Kontrolle. Damit lag sie trotz eines 24stündigen Zeitraumes ohne Selenit-Zusatz (Umstellung auf nicht-proliferative Kultur) noch in der Größenordnung der mit der Selenit-Verdünnung gemessenen Aktivitätssteigerung (vgl. Abb. 3.27).

Durch den Zusatz von 60 nM Na- Selenit wurde der Selen-Gehalt des Kulturmediums (10 % FKS) um 200 % gesteigert (FKS: 0,026 µg/ml Se, Information Fa. Biochrom).

3.3.7 Messung der Superoxid-Dismutase-Aktivität

Das Enzym Superoxid-Dismutase setzt Sauerstoff-Superoxid-Anion-Radikale $O_2^{\bullet-}$ zu Sauerstoff und Wasserstoffperoxid um. Die Aktivität kann durch direkte Messung der H_2O_2 -Produktion (Segura Aguilar, 1993) bestimmt werden. Die photometrische Analyse von H_2O_2 ist im Mikrotiterplatten-Reader aufgrund der erforderlichen Wellenlänge jedoch nicht möglich. Die übliche Methode zur Messung der Superoxid-Dismutase-Aktivität besteht darin, die Analysereaktion in drei Einzelschritte zu unterteilen.

- | | | | |
|--|----------------|---------------------------------|--------------------------|
| (1) Edukt | --- () ---> | Produkt + $O_2^{\bullet-}$ | RADIKALERZEUGUNG |
| (2) $2 O_2^{\bullet-} + 2 H^+$ | --- (SOD) ---> | $H_2O_2 + O_2$ | SOD - REAKTION (Hemmung) |
| (3) $O_2^{\bullet-} + \text{Detektor}$ | --- () ---> | oxidiertes/reduziertes Detektor | DETEKTIONSREAKTION |

In einem Reaktionssystem (1) werden Superoxid-Radikale erzeugt, welche entweder über eine Katalyse durch die Superoxid-Dismutase zu Wasserstoffperoxid und Sauerstoff abgebaut werden (2) oder in einer Konkurrenzreaktion (3) mit einem Detektor reagieren. Die Reaktion von Superoxid-Radikalen mit dem Detektor liefert das Meßsignal. Es ist umso geringer, je größer die in der Probe vorliegende Aktivität an Superoxid-Dismutase ist. Die Reaktionszusammenhänge führen zu einer nicht-linearen Eichfunktion, welche in linearer Darstellung einer Wurzelfunktion ähnelt und in halblogarithmischer Darstellung eine sigmoide Form annimmt. Ausgewertet wird der Meßwert als prozentuale Hemmung der Kontrollmessung ohne Probe (Blank).

Es wurden Experimente mit drei Reaktionssystemen durchgeführt, die sich hinsichtlich ihrer Radikalerzeugungs- und Detektionsreaktionen unterschieden.

3.3.7.1 Photometrischer Assay mit NBT/PMS

In einer nicht-enzymatischen Reaktion wurden Radikale durch Umsetzung von NADH mit Phenazin-methosulfat (PMS) dargestellt (Ewing *et al.*, 1995). Als Detektionsreaktion diente die Redox-Umsetzung der Superoxidradikale mit einem Tetrazoliumsalz (Nitroblue-Tetrazolium, NBT). Messungen mit Superoxid-Dismutase-Verdünnungen ergaben eine Eichfunktion der erwarteten Form (vgl. Abb. 3.29). Doch wurde der Wert einer 100 %igen Hemmung, also der vollständigen Unterdrückung der Detektionsreaktion durch eine hohe Aktivität an Superoxid-Dismutase, nicht erreicht. Es wurde beobachtet, daß das Reaktionssystem nicht vollständig über die beschriebenen Reaktionen ablief, sondern über Nebenreaktionen bereits beim Ansatz der Reagentien innerhalb von Minuten abreagierte. Diese Nebenreaktionen stellten

Konkurrenzreaktionen zum Reaktionssystem dar und bewirkten, daß die Detektorreaktion nicht vollständig über die Superoxid-Dismutase-Aktivität in der Probe kontrolliert werden konnte. Zudem wurde festgestellt, daß die Sensitivität des Assays nicht ausreichend war, um Superoxid-Dismutase-Aktivitäten in Mikrotiterplatten-Aussaaten von Lk004-Zellen zu quantifizieren. Der Wert einer 50 %igen Hemmung (hier entsprechend 20 % Hemmung) wurde bei einer Superoxid-Dismutase Proteinmasse von ca. 1000 ng/Test erhalten.

3.3.7.2 Photometrischer Assay mit Xanthin/Xanthin Oxidase und INT

Es wurde eine Methode verwendet, in der durch die Reaktion von Xanthin mit Xanthin-Oxidase Superoxid-Radikale erzeugt wurden. Die Detektionsreaktion war die photometrisch erfaßbare Umsetzung des Tetrazoliumsalses INT zum Formazan. Eichreihen mit Enzymverdünnungen von Superoxid-Dismutase lieferten eine Eichfunktion mit sehr geringer Steigung, die zudem, wie schon beim Assay mit NBT/PMS nicht den Wert 100 % Hemmung erreicht (Abb. 3.29). Der Wert 50 % Hemmung (auch hier entsprechend 20 % Hemmung) lag etwa eine Zehnerpotenz tiefer als im NBT/PMS System bei ca. 50 ng SOD/Test, doch war auch diese Sensitivität nicht ausreichend für den Einsatz zur Messung von Lk004 Mikrotiterplatten-Aussaaten.

3.3.7.3 Luminometrischer Assay mit Xanthin-Oxidase und Lucigenin

Bei dieser Methode wurde als Detektorreaktion die spezifische Umsetzung von Lucigenin mit Superoxid-Anion-Radikalen unter Abgabe von Licht verwendet (Minkenberg *et al.*, 1984; Muller-Peddinghaus, 1984; Williams *et al.*, 1981). Die Radikale wurden über das Xanthin-Oxidase-Enzymsystem dargestellt. Dabei fand zunächst Xanthin als Enzymsubstrat Verwendung (Corbisier *et al.*, 1987). Aufgrund seiner schlechten Löslichkeit in Wasser wurde es mit gutem Erfolg im Laufe der Assay-Optimierung durch Hypoxanthin ersetzt. Die Optimierung beinhaltete weiterhin die Variation der Konzentrationen der Assay-Komponenten Lucigenin und Xanthin-Oxidase und des Meßverfahrens. Die Reaktionskinetik lieferte kein zeitunabhängiges Signal, sondern eine Funktion mit einem Maximum, dessen zeitliche Lage von der Probenaktivität der SOD abhängig war. Durch Messung einer Reaktionskinetik über einen Zeitraum, in welchem das Maximum sowohl bei kleiner SOD Probenkonzentration (spät) als auch bei hoher SOD Probenkonzentration (früh) zu finden war, konnte der in dieser Zeit gemessene maximale Wert erfaßt werden. Weiterhin wurde festgestellt, daß Komponenten des Reaktionsansatzes einer Alterung unterlagen, die bereits im Zeitraum der Messung einer Mikrotiterplatte deutlich wurde. Problematisch war die Instabilität der Xanthin-Oxidase in der verwendeten extremen Verdünnung. Diesem Effekt wurde durch Einsatz einer hochaufgereinigten Enzymfraktion und einem stabilisierenden Puffermedium entgegen gewirkt. Die veröffentlichten Daten über eine nicht detektierbare Alterung im Zeitraum von 120 Minuten (Corbisier *et al.*, 1987) konnten jedoch nicht reproduziert werden. Das Meßverfahren wurde daher so optimiert, daß dieser Effekt vollständig vernachlässigbar wurde. Bei einer üblichen Belegung der

Mikrotiterplatte in parallele Behandlungsansätze innerhalb der MTP-Spalten wurde der Premix gleichzeitig in alle belegten Wells einer Reihe dispensiert und gleichzeitig dort die beschriebene Kinetik gemessen. Die innerhalb dieser Reihe gemessenen Werte wurden dann untereinander verglichen und als prozentuale Hemmung ausgewertet. Da der Dispensiervorgang sehr schnell war ($\ll 1$ Sekunde), gab es innerhalb dieser Reihe keinen nennenswerten zeitlichen Versatz, die Alterung des Reaktionsansatzes konnte keine Rolle spielen. Zusätzlich wurde zur Validierung der Vergleichbarkeit unabhängig voneinander gemessener Analysen die Messung von Vitamin C-Standards als „SOD Mimics“ eingeführt. Ascorbinsäure hat als Reaktionspartner im Vergleich zur Superoxid-Dismutase eine ähnlich hohe Reaktivität in der Reaktion mit Superoxid-Radikalen (Kim *et al.*, 1995). Es wurden daher für Vitamin C-Verdünnungen in der beschriebenen Methode die gleichen Eichfunktionen wie für Superoxid-Dismutase Verdünnungen gefunden.

Messungen von Superoxid-Dismutase Verdünnungen in den beschriebenen 3 analytischen Systemen führten zu folgenden Eichfunktionen:

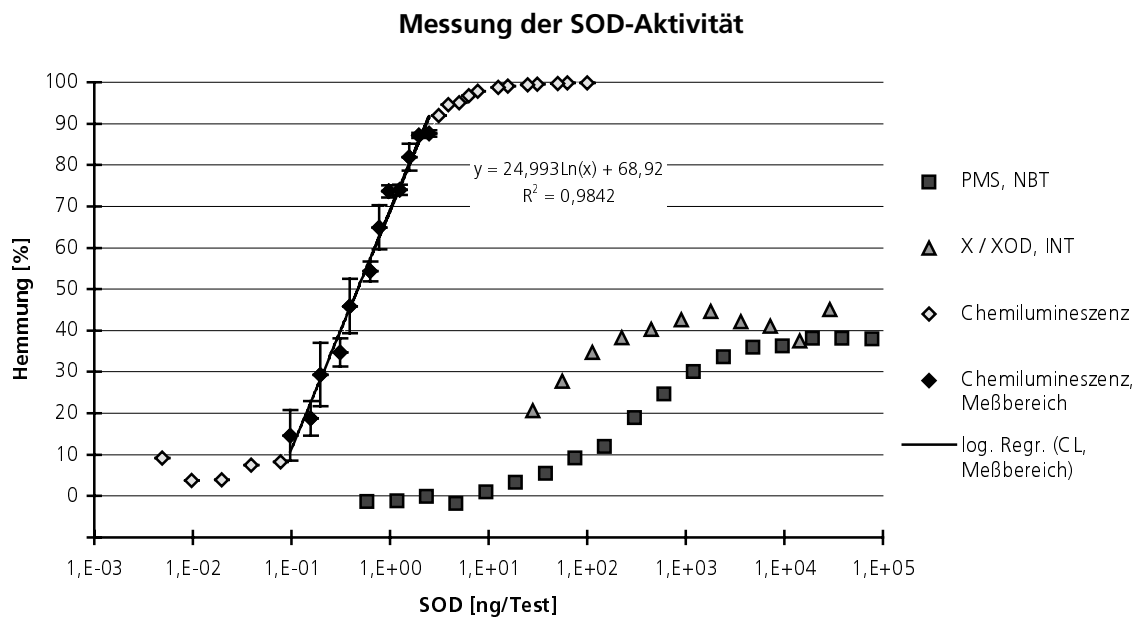


Abb. 3.29 Eichreihen mit Enzymverdünnung für die Messung der Superoxid-Dismutase-Aktivität

Die Ergebnisse der Messungen im Chemilumineszenzassay zeigen im Gegensatz zu beiden anderen Assays den erwarteten Kurvenverlauf über den vollständigen möglichen Meßbereich von 0 bis 100 % Hemmung. Im Bereich von 20 % bis über 80 % Hemmung konnte die Eichreihe über die angegebene logarithmische Funktion bei guter Linearität in der halblogarithmischen Darstellung ausgewertet werden. Der Wert 50 % Hemmung lag bei ca. 0,5 ng Superoxid-Dismutase/Test. Damit war diese Methode ca. 100fach sensitiver als der photometrische Assay mit Xanthinoxidase und INT. Diese Empfindlichkeit war auch ausreichend zur sicheren Analyse von Superoxid-Dismutase-Aktivitäten in Mikrotiterplatten-Aussaaten von Lk004-Zellen.

3.3.8 Messung von Lipidperoxidationsprodukten

3.3.8.1 Thiobarbitursäure-reaktive Substanzen (TBARS)

Thiobarbitursäure reagiert unspezifisch mit verschiedenen Lipidperoxidationsprodukten, unter ihnen Malondialdehyd (MDA). Es wurde ein Assay für den Nachweis von Thiobarbitursäure-reaktiven Substanzen im Kulturmedium zur Durchführung in Mikrotiterplatten erarbeitet (Morliere *et al.*, 1991). Beim Einsatz von Tetraethoxypropan (TEP) als Standard wurde die folgende Eichfunktion erhalten.

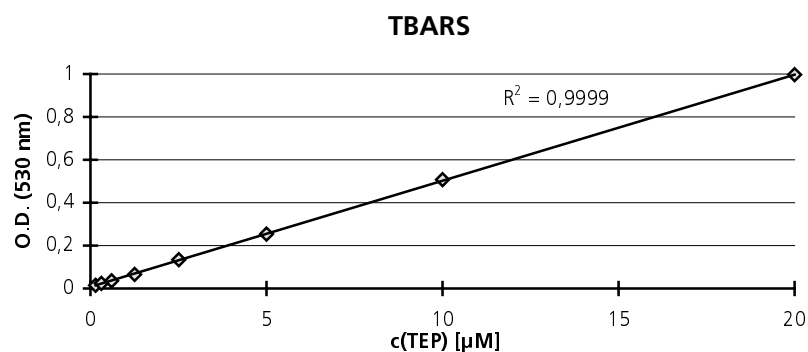


Abb. 3.30 Eichreihe mit Tetraethoxypropan in Kulturmedium für die Messung von Thiobarbitursäure reaktiven Substanzen (TBARS)

Die Eichgerade zeigt eine hervorragende Linearität und eine Nachweisgrenze für TEP in Kulturmedium bei einer Konzentration von ca. 100 nmol/l. Sie konnte durch Variation der Konzentration der Assay-Reagenzien und Inkubationsbedingungen für die Reaktionszeit nicht weiter optimiert werden.

3.3.8.2 Assay mit N-Methyl-2-phenylindol (MPI)

Als Alternative zum weitverbreiteten TBARS-Assay wurde ein colorimetrischer Assay mit N-Methyl-2-phenylindol als Chromophor erprobt. Mit diesem Reagenz reagieren in Abhängigkeit vom Reaktionsmilieu sowohl MDA als auch 4-Hydroxynonenal (4-HNE). Durch Variation des pH-Wertes für die Farbreaktion sollte es möglich sein, einerseits MDA, andererseits die Summe aus MDA und 4-HNE zu messen. Die Methode wurde in Anlehnung an eine Vorschrift und Angaben der Firma Calbiochem (Cat. No. 437634) für die Messung in Mikrotiterplatten etabliert. Es wurden Eichgeraden für die Analytik in Mediumüberständen (zellexterne Lipidperoxidationsprodukte) und Triton X-100-Zellextrakten (intrazelluläre Lipidperoxidationsprodukte) mit den Standards TEP und 4-HNE gemessen.

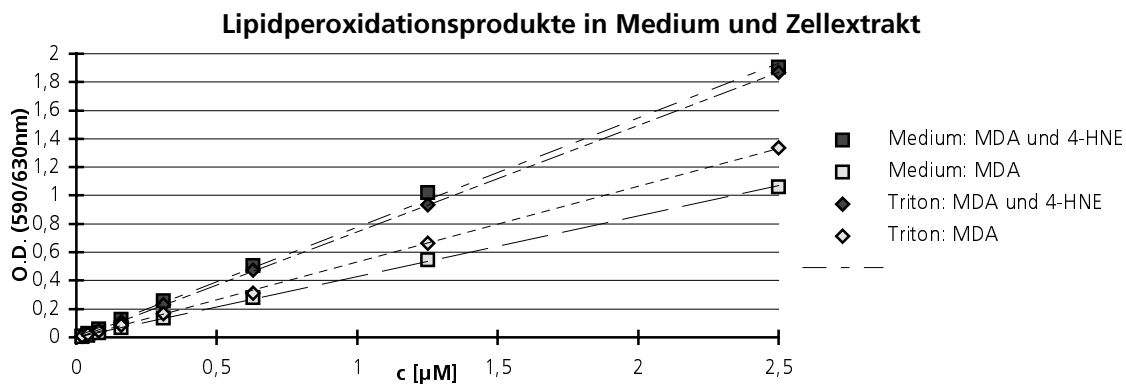


Abb. 3.31 Eichreihen mit TEP und 4-HNE in Kulturmedium und Triton X-100 für die intra- und extrazelluläre Messung von Lipidperoxidationsprodukten

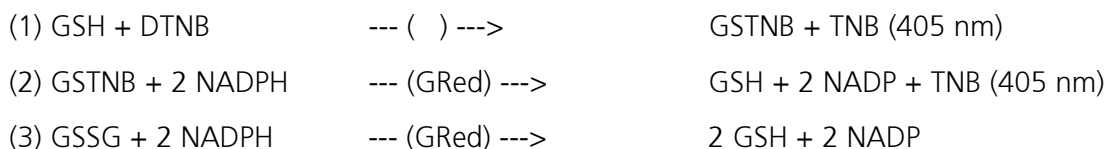
Die Nachweisgrenze für MDA im Kulturmedium lag hier bei einer Konzentration von etwa 40 nmol/l, womit dieser Assay etwas sensitiver als die Methode zur Messung von TBARS war.

3.3.9 Messung von Glutathion

Die Strategie für die Etablierung einer Analytik von Glutathion sah vor, einen schnell und einfach durchführbaren Mikrotiterplatten-Test mit einer Analytik auf der HPLC zu kombinieren, um im Hinblick auf die Spezifität des Analyseergebnisses Aussagen mit hoher Sicherheit zu erhalten.

3.3.9.1 Messung von Glutathion in der Mikrotiterplatte: Tietze-Recycling-Assay

Der „Tietze-Recycling-Assay“ (Tietze, 1969) beruht auf drei Reaktionen.



Zunächst reagiert freies Glutathion spontan mit DTNB zum Kopplungsprodukt und dem freien aromatischen Thiol, dessen Absorption bei 405 nm gemessen werden kann. Im zweiten Schritt wird das Kopplungsprodukt durch Glutathion-Reduktase mit dem Reduktionsäquivalent NADPH zu reduziertem Glutathion und wiederum dem Chromophor gespalten. Das hierbei gebildete reduzierte Glutathion kann erneut in Reaktion (1) eingehen. Oxidiertes Glutathion wird ebenfalls durch die Glutathion-Reduktase zu reduziertem Glutathion umgesetzt und geht daher gleichermaßen in die Reaktion ein.

Es wurden zunächst Messungen mit Eichverdünnungen und Zellextrakten unter Verwendung von 5-Sulfosalicylsäure als Extraktionsreagenz durchgeführt (Baker *et al.*, 1990; Vandeputte *et al.*, 1994). Die erhaltenen Ergebnisse zeichneten sich jedoch durch schlechte Reproduzierbarkeit aus. Der Wechsel zu einem Extraktionsreagenz basierend

auf meta-Phosphorsäure (Cohn *et al.*, 1966; Hissin *et al.*, 1976) brachte hier eine deutliche Verbesserung. Die folgende Grafik zeigt eine repräsentative Messung von Glutathion-Verdünnungen in Extraktionsmedium.

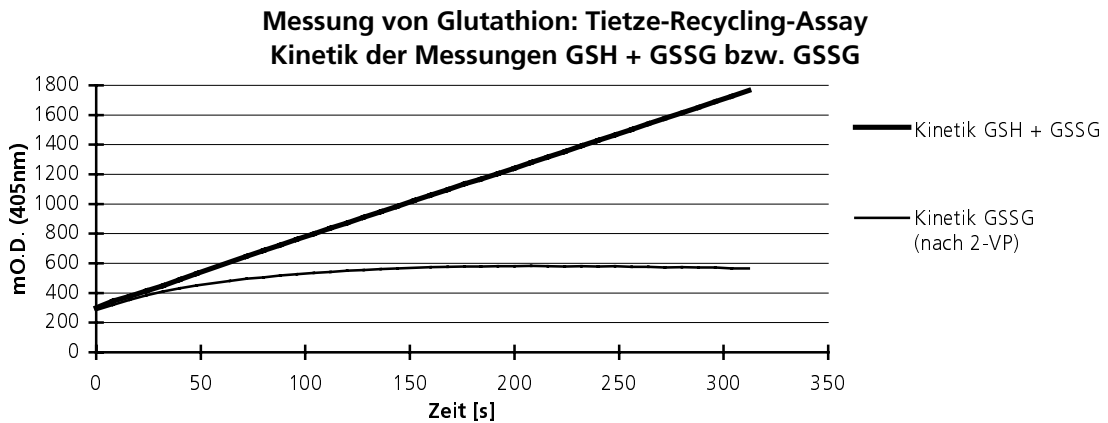


Abb. 3.32 Eichreihe mit Glutathion-Verdünnungen in Extraktionsreagenz für die Messung im Tietze-Recycling-Assay

Durch Umsetzung der Probe mit 2-Vinylpyridin ist eine Maskierung des reduzierten Glutathions zu erreichen (Baker *et al.*, 1990; Vandeputte *et al.*, 1994). Somit ist dann die Messung von oxidiertem Glutathion allein möglich und unter Berücksichtigung der Messung der Summe der Glutathion-Äquivalente rechnerisch auf die Konzentration von reduziertem Glutathion zu schließen. Die Umsetzung der oben gezeigten Verdünnungen von Glutathion im Verhältnis 5:2 reduziert:oxidiert mit 2-Vinylpyridin (2-VP) und anschließender Messung im Recycling-Assay führte zu der folgenden Eichfunktion.

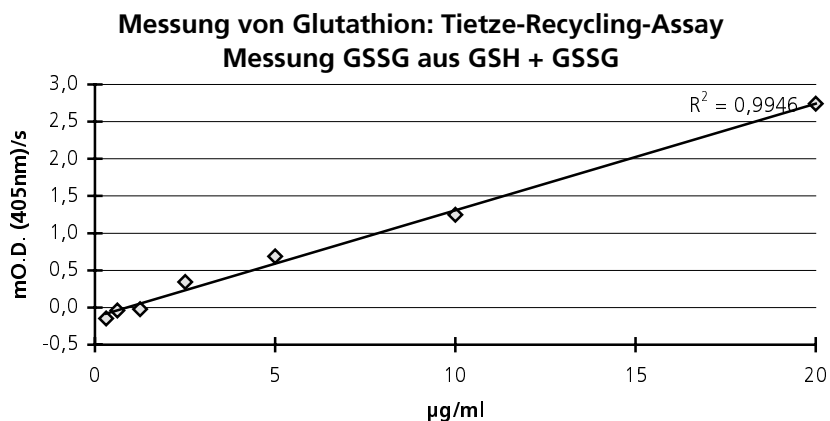


Abb. 3.33 Eichreihe mit Glutathion-Verdünnungen für die Messung von oxidiertem Glutathion im Tietze-Recycling-Assay

Das Ergebnis zeigt eine Nachweisgrenze für oxidiertes Glutathion bei einer Konzentration von ca. 2 µg/ml. Die gemessene Kinetik für eine Einzelmessung des Gesamtglutathion-Gehaltes gegenüber der Messung des oxidierten Glutathions in vergleichbaren Konzentrationen nach Umsetzung mit 2-Vinylpyridin wird in der folgenden Abbildung gezeigt.

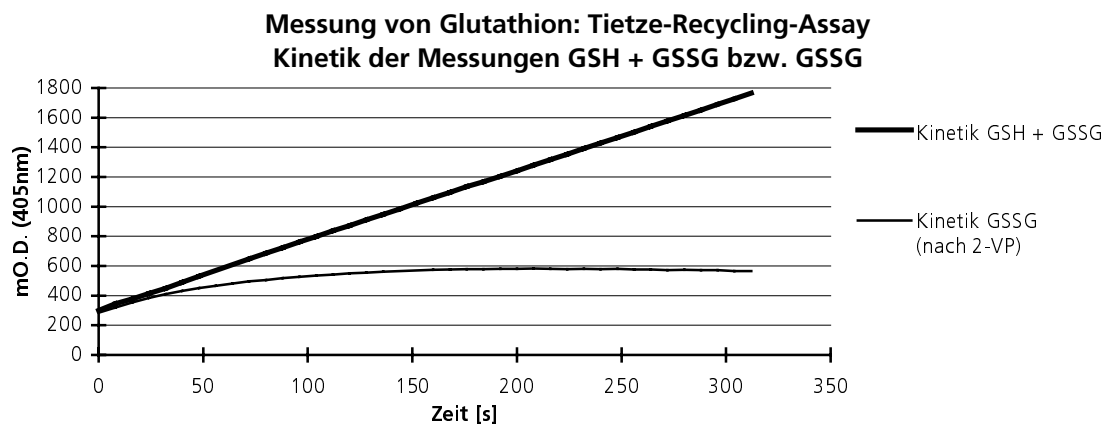


Abb. 3.34 Kinetik der Reaktionen im Tietze-Recycling-Assay mit bzw. ohne Umsetzung mit 2-Vinylpyridin (40 Messungen, Meßintervall 8 s)

Das Meßergebnis für die Kinetik der Reaktion bei der Messung der gesamten Glutathion Äquivalente ergab eine Funktion mit hoher Linearität. Nach Umsetzung mit 2-VP jedoch wurde eine Kinetik erhalten, die nur die Auswertung der in den ersten 25 Sekunden gemessenen Absorptionen zuließ, da die Steigung danach sofort kleiner wurde und zu späteren Zeitpunkten sogar eine negative Größe annahm. Dieses s Reaktionsverhalten konnte ebenso wie die Nachweisgrenze durch Variation der Reaktionsbedingungen und Konzentration der Reaktionskomponenten nicht entscheidend verbessert werden. In Experimenten mit Zellaussaaten wurde festgestellt, daß die Sensitivität des Assays nicht ausreichend war, um in Mikrotiterplatten-Aussaaten von Lk004-Zellen den Gehalt an oxidiertem Glutathion zu quantifizieren. Für die Bestimmung des Gesamtglutathion-Gehaltes hingegen wurden gute Ergebnisse erhalten.

3.3.9.2 Messung von Glutathion in der Mikrotiterplatte: Fluorimetrische Analyse

Bei dieser Methode wird ortho-Phtalaldehyd (oPA) mit Glutathion umgesetzt und gibt einen Fluorophor, der bei 350 nm (Anregung)/420 nm (Emission) detektiert wird (Cohn *et al.*, 1966; Hissin *et al.*, 1976). Da bei pH 8.0 nur reduziertes Glutathion mit oPA reagiert, kann getrennt davon bei pH 12.0 unter Maskierung von GSH durch N-Ethylmaleimid (NEM) das oxidierte Glutathion gemessen werden. Die exakte Einhaltung des pH-Wertes im Meßansatz ist daher von entscheidender Bedeutung für die Verlässlichkeit der Analytik. Für Verdünnungen von reduziertem Glutathion in Extraktionspuffer wurde die in Abb. 3.35 gezeigte Eichgerade erhalten.

Sie dokumentiert zeigt eine Nachweisgrenze bei einer Glutathion-Konzentration von etwa 1 µg/ml. Die Analyse des Glutathion-Gehaltes aus Mikrotiterplatten-Aussaaten von Lk004-Zellen gelang hingegen nicht in reproduzierbarer Weise.

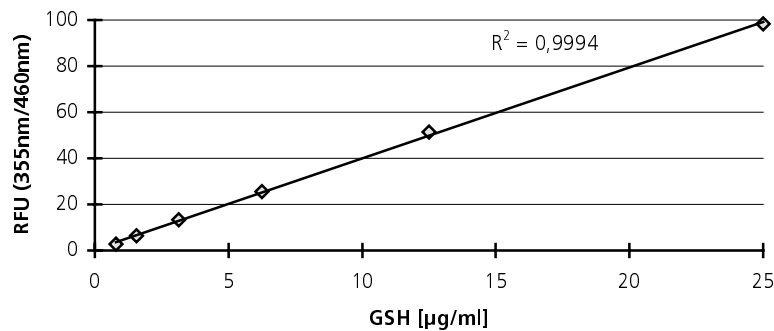
Messung von Glutathion: fluorimetrische Methode

Abb. 3.35 Eichreihe mit Glutathion-Verdünnungen in Extraktionsreagenz für die Messung im fluorimetrischen Assay

3.3.9.3 Messung von Glutathion: HPLC Analyse

Es wurde eine Methode zur Analyse des Probengehaltes von oxidiertem und reduziertem Glutathion in einem gemeinsamen HPLC-Lauf etabliert (Mertens *et al.*, 1991; Reed *et al.*, 1980; Yoshida, 1996). Sie beruhte auf der Derivatisierung von oxidiertem und reduziertem Glutathion zu N-(2,4-Dinitrophenyl) Derivaten und anschließender Auftrennung des Reaktionsgemisches auf einer NH_2 -Säule mit UV-Detektion bei 355 nm. Die HPLC-Analytik wurde dabei an die Verwendung von Zellextrakten in meta-Phosphorsäure angepaßt, so daß der Extrakt für die Analyse in Mikrotiterplatten hier ebenfalls eingesetzt werden konnte. Die Kinetik der Derivatisierungsreaktion wird in der folgenden Grafik gezeigt.

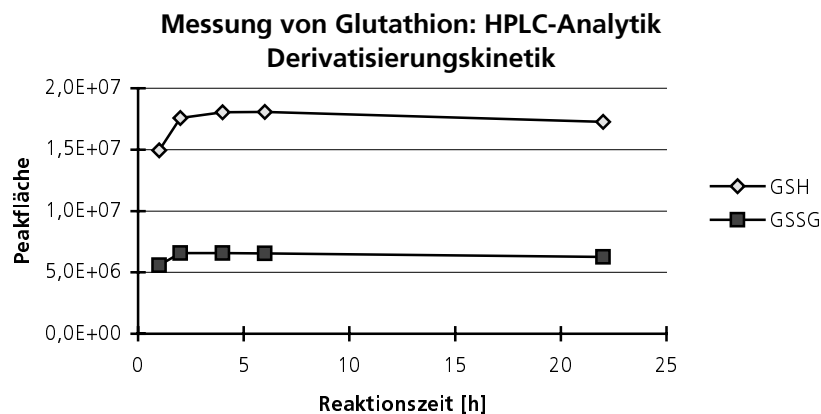


Abb. 3.36 Messung von Glutathion per HPLC Analyse. Kinetik der Derivatisierungsreaktion

Das Ergebnis der Untersuchung der Derivatisierungskinetik zeigt einen maximalen Umsatz bei Reaktionszeiten von 3 - 6 Stunden und steht damit in Einklang mit Literaturangaben (Yoshida, 1996). Zur Vermeidung von Kristallisationseffekten durch Verdunstung des leichtflüchtigen Lösungsmittels der Probe (Ethanol) mußte ein zusätzlicher Verdünnungsschritt eingeführt werden. Die Verwendung von gasdichten Probengefäßen erwies sich zusätzlich als essentiell. Die Optimierung des

Elutionsgradienten führte bei Verwendung von Standardverdünnungen GSH und GSSG zu dem folgenden Chromatogramm.

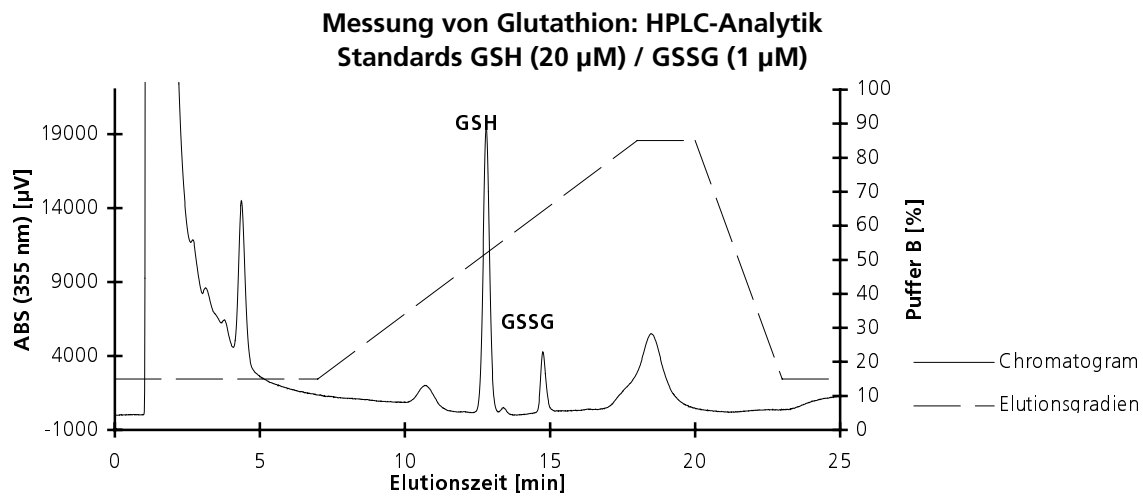


Abb. 3.37 Messung von Glutathion. HPLC-Chromatogramm der Auftrennung derivatisierter Standard-Verdünnungen von oxidiertem und reduziertem Glutathion

Das Chromatogramm zeigt Peaks mit guter Peaksymmetrie und deutlich unterschiedlichen Retentionszeiten. Die Identität der Peaks wurde über Eichreihen, Spike-Experimente mit Zellextrakten und Auswertung der UV/Vis-Spektren über den Diodenarray-Detektor nachgewiesen. Die Analyse von Zellextrakten Lk004 führte zu dem folgenden Ergebnis.

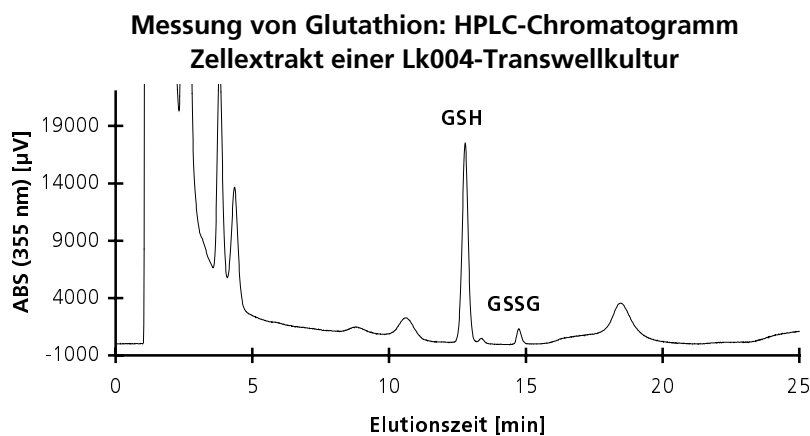


Abb. 3.38 Messung von Glutathion. HPLC-Chromatogramm der Auftrennung eines derivatisierten Zellextraktes aus Lk004-Zellen

Verdünnungen von Standards in Extraktionsreagenz, anschließende Derivatisierung und HPLC-Analyse ergaben die in Abb. 3.39 dargestellten Eichreihen.

Für die Konzentrationsbereiche von reduziertem und oxidiertem Glutathion in Zellextrakten belegen sie eine gute Reproduzierbarkeit und Linearität.

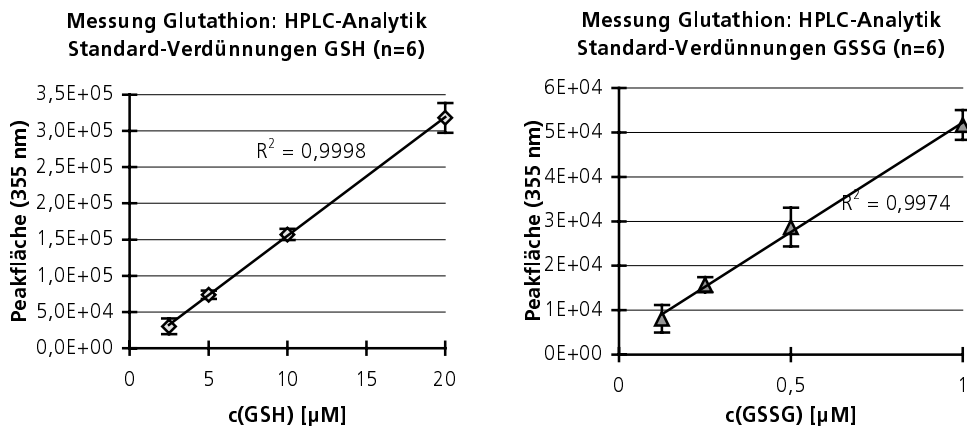


Abb. 3.39 Glutathion-Messung. HPLC-Analytik: Eichreihen mit oxidiertem und reduziertem Glutathion im Bereich ihrer Konzentration in Lk004-Zellextrakten

Weiterhin wurde eine mögliche Alterung der Proben bei $-70\text{ }^\circ\text{C}$ untersucht. In Abb. 3.40 werden die oben dargestellten Messungen von Gemischen aus GSH- und GSSG-Standards mit Messungen der gleichen Standards nach einer 4 Wochen längeren Aufbewahrung bei $-70\text{ }^\circ\text{C}$ ohne vorhergehende Derivatisierung verglichen.

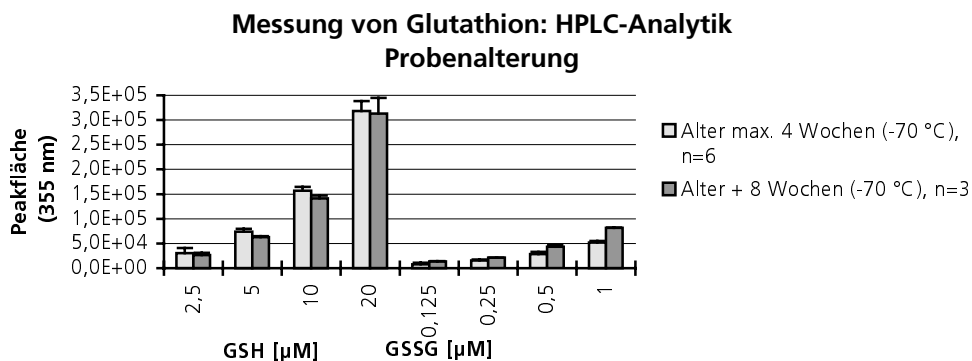


Abb. 3.40 Messung von Glutathion, HPLC Analytik: Probenalterung von Standard-Mischungen aus oxidiertem und reduziertem Glutathion bei $-70\text{ }^\circ\text{C}$ -Lagerung.

Deutlich ist eine Verringerung des Gehaltes an reduziertem Glutathion und Erhöhung des Gehaltes an oxidiertem Glutathion in den älteren Proben erkennbar. Die Aufbewahrung nicht derivatisierter Proben wurde daher auf einen maximalen Zeitraum von 4 Wochen begrenzt.

3.3.9.4 Kombination der Methoden

Auf Grundlage der gezeigten Ergebnisse wurden für weitere Untersuchungen des intrazellulären Glutathiongehaltes von Zellen die auf dem Tietze-Recycling-Assay beruhende Methode zur Durchführung in Mikrotiterplatten und die HPLC-Analytik ausgewählt. Die Mikrotiterplattenmethode ist schnell und unaufwendig durchführbar, liefert aber keine spezifische Aussage. Es wird die Summe aller freien intrazellulären Glutathionäquivalente erfaßt. Die HPLC-Methode hingegen ist zeitlich aufwendig, läßt aber die Quantifizierung von oxidiertem und reduziertem Glutathion mit hoher Spezifität zu. Es wurde daher ein Vorgehen etabliert, welches die Vorteile beider Analytiken

miteinander verknüpft und eine maximale Aussage und Flexibilität in der Durchführung der HPLC gestützten Analytik bringt.

- Extraktion der Zellen
- sofortige enzymatische Bestimmung des Gesamtglutathion-Gehaltes in der MTP
- Konservierung der Zellextrakte (- 70 °C, bis zu 4 Wochen)
- Derivatisierungsreaktion und HPLC-Analytik zu einem frei wählbaren Zeitpunkt.

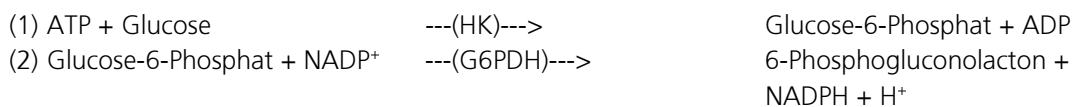
3.3.10 Messung von Adenosinphosphaten

Extraktion aus adhärenenten Mikrotiterplatten Zellaussaaten

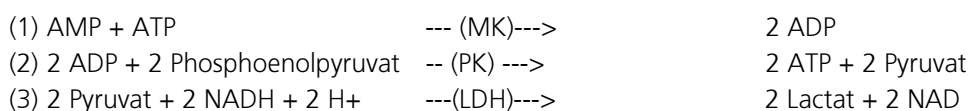
Es wurde zunächst eine saure Extraktion mit Perchlorsäure und anschließender Neutralisation mit Kaliumcarbonat durchgeführt (Di Pierro *et al.*, 1995). Diese Methode erwies sich jedoch als wenig robust, da der Neutralisationsschritt von einer starken Gasentwicklung begleitet war. Notwendige Zentrifugationsschritte und die Kontrolle des pH-Wertes machten das Verfahren darüberhinaus sehr arbeitsaufwendig. Mit Einführung der luminometrischen Methode (vgl. Kapitel 3.3.10.2) wurde daher mit einer Extraktion mit Trichloressigsäure gearbeitet. Die Neutralisation erfolgte durch Verdünnung der Probe in einer Pufferlösung. Ein Zusatz von Triton X-100 zum Extraktionspuffer gewährleistete dabei gute Eigenschaften im Hinblick auf Oberflächenbenetzung des Zellrasens und gestattete damit, die Extraktion der Zellen in einem sehr kleinen Volumen des Extraktionsreagenzes auszuführen.

3.3.10.1 Messung von Adenosinphosphaten in der Mikrotiterplatte: enzymatische Methode

Die verwendete Methode zur photometrische ATP-Bestimmung beruht auf der enzymatischen Bildung von NADPH innerhalb eines gekoppelten Enzymassays mit Hexokinase (HK) und Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6PDH) (Trautschold *et al.*, 1985):



Die Bildung von NADPH wird durch Extinktionsmessung bei 340 nm verfolgt. Der Gehalt der Probe an ATP ist dem absoluten Extinktionszuwachs proportional. Auf diese Reaktionen folgend, ist eine Untersuchung des ADP- und AMP-Gehaltes möglich.



Der enzymatische Assay zur AMP- und ADP-Analyse beruht ebenfalls auf der Messung des abreagierenden NADH und wird photometrisch bei 340 nm verfolgt. Durch Anreicherung des Reaktionsgemisches mit Lactat-Dehydrogenase wird zunächst das in der Probe vorhandene Pyruvat abgebaut. Die erhaltene Extinktion dient als Nullwert für

die folgende ADP-Messung (Zugabe Pyruvatkinase). Nach Beendigung dieser Reaktion wird Myokinase zupipettiert und die absolute Abnahme der Extinktion bei 340 nm ist der doppelten AMP-Konzentration proportional. Standard-Verdünnungen von Adenosinphosphaten AMP, ADP und ATP ergaben nach entsprechender Vorbehandlung die folgenden Eichreihen.

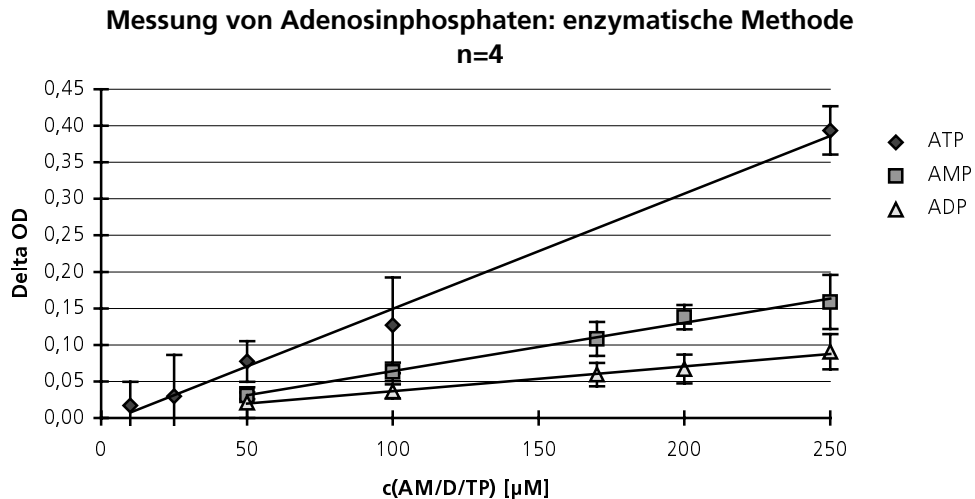
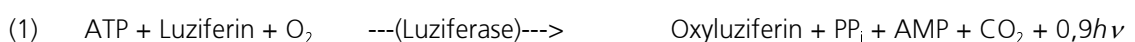


Abb. 3.41 Messung von Adenosinphosphaten. Eichreihen mit AMP-, ADP- und ATP-Standards nach photometrischer, enzymatischer Methode

Die Ergebnisse ließen keine gute Reproduzierbarkeit der Methode erkennen. Wiederholte Messungen von ATP-Standards zeigten hohe Standardabweichungen. Die Steigung der Eichgeraden für AMP hatte in etwa den doppelten Wert der Steigung der ADP-Eichgeraden und entsprach damit den theoretischen Erwartungen. Die Steigung der ATP-Eichgeraden war jedoch deutlich größer als die der beiden anderen. Sie sollte derjenigen der ADP-Eichgeraden entsprechen. Die Nachweisgrenze für ADP und AMP lag bei dieser Methode bei einer Konzentration von etwa 25 µmol/l. Damit war eine Bestimmung des ADP-Gehaltes in Zellextrakten an der Sensitivitätsgrenze des Assays möglich, für die Bestimmung des AMP-Gehaltes lag die Nachweisgrenze jedoch zu hoch.

3.3.10.2 Messung von Adenosinphosphaten in der Mikrotiterplatte: Luminometrie

Die luminometrische Bestimmung von ATP beruht auf der Reaktion von Luziferin mit ATP, bei der unter Katalyse durch Luziferase von *Photinus pyralis* Lichtquanten frei werden (Wulff *et al.*, 1985):



An diese Reaktion kann eine enzymatische Umsetzung von ADP zu ATP durch die Pyruvatkinase (PK) gekoppelt werden, die die Analyse der ADP-Konzentrationen möglich macht (Wulff *et al.*, 1985):



Eine Erweiterung des Systems um eine Reaktion mit der Myokinase (MK) würde auch eine Analytik der AMP-Konzentrationen möglich machen, doch wurde in ersten Experimenten festgestellt, daß diese Messungen sehr unzuverlässig waren. Somit wurde auf weitere Experimente hinsichtlich der Etablierung dieser Analytik verzichtet. Nach Optimierung des Reaktionsansatzes hinsichtlich seiner Sensitivität auf die zu erwartenden Probenkonzentrationen wurden folgende Eichreihen gemessen:

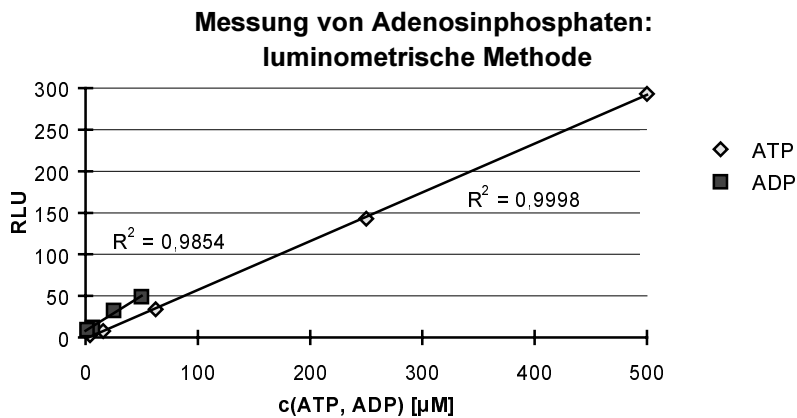


Abb. 3.42 Messung von Adenosinphosphaten. Eichreihen mit ADP- und ATP-Standards nach luminometrischer Methode

Zur Überprüfung der Durchführbarkeit der Messung auch mit Mikrotiterplatten-Aussaaten von Lk004-Zellen wurde eine Zellverdünnung untersucht.

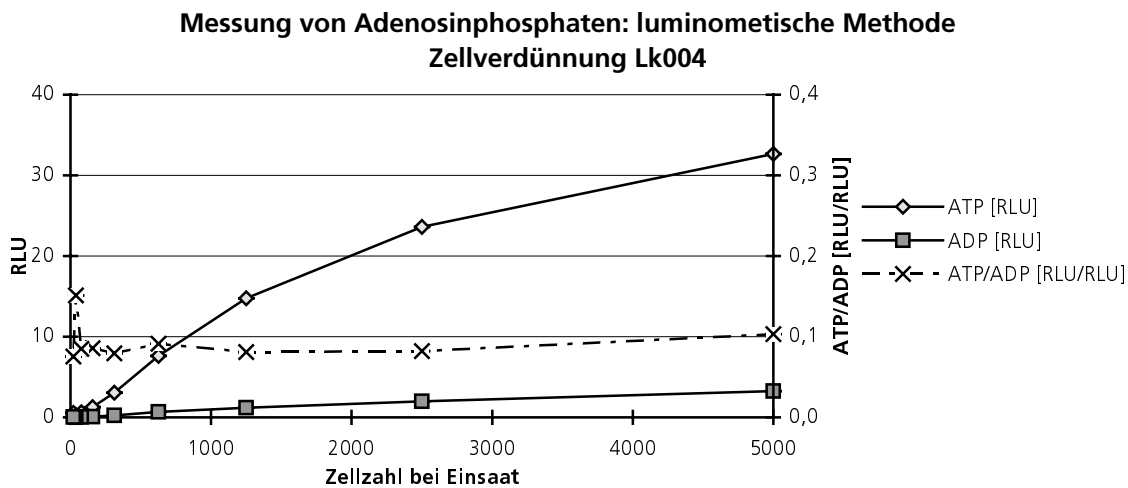


Abb. 3.43 Messung von Adenosinphosphaten. ADP und ATP-Gehalte einer Zellverdünnung von Lk004-Zellen. Messung nach luminometrischer Methode

Das gezeigte Ergebnis entstammt der Analyse einer Mikrotiterplatte (6 Wells pro Zellzahl). Es dokumentiert ein von der Zelldichte unabhängiges Konzentrationsverhältnis ATP zu ADP und weist damit eine reproduzierbare Analytik nach. Dennoch stellte sich die luminometrische ADP- im Vergleich zur luminometrischen ATP-Bestimmung in der regelmäßigen Anwendung als weniger zuverlässig dar. Es wurde daher entsprechend dem Vorgehen bei der Glutathion-Analytik eine kombinierte Mikrotiterplatten-/HPLC-

Analytik etabliert, bei der ausschließlich der ATP-Gehalt luminometrisch bestimmt wurde (vgl. Kapitel 3.3.10.4).

3.3.10.3 Messung von Adenosinphosphaten: HPLC-Analyse

Zur chromatographischen Analyse von AMP-, ADP- und ATP-Gehalten per HPLC wurden neutralisierte Zellextrakte oder entsprechend aufbereitete Standardverdünnungen ohne weitere Aufarbeitung eingesetzt. Es wurden verschiedene Elutionsbedingungen für die Untersuchung mit einer RP-18 Säule unter Verwendung eines Ionenpaar Reagenzes erprobt. Es zeigte sich, daß einfach durchzuführende isokratische Elutionen keine ausreichende Trennleistung erbrachten. Aufwendige Gradienten hingegen (Di Pierro *et al.*, 1995) ergaben keine befriedigende Robustheit der Methode. Es wurde daher unter Erprobung verschiedener Elutionsgradienten und Ionenpaar-Reagenzien eine einfache Gradientenelution etabliert, die für die zu analysierenden Zellextrakte eine gute Peakauflösung brachte. Die folgende Grafik zeigt das Chromatogramm eines Zellextrakts aus HFBE-Zellen. Das Chromatogramm nach Spiken desselben Extrakts mit einer Mischung aus AMP-, ADP- und ATP- Standards ist darin ebenfalls dargestellt.

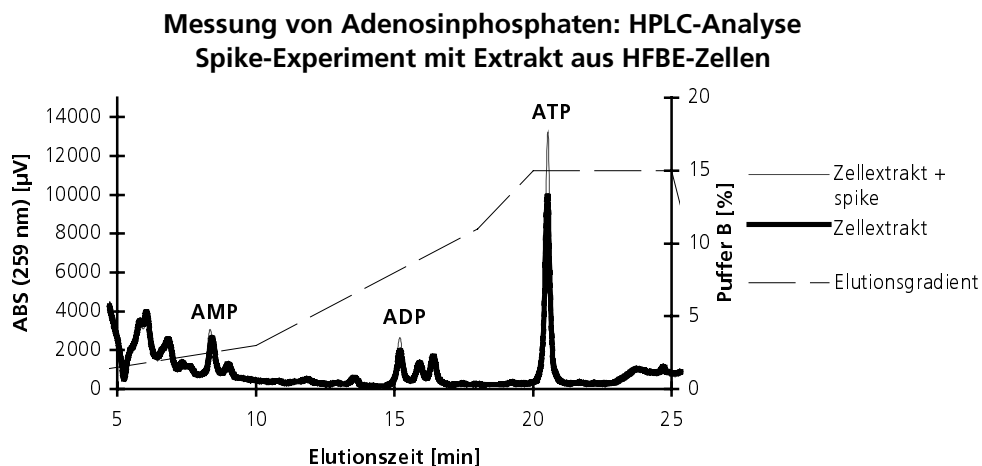


Abb. 3.44 Messung von Adenosinphosphaten. Spike-Analyse mit Extrakt aus HFBE-Zellen

Die rechnerische Auswertung der Peakflächen ergab nach Zusatz des Spikes eine Vergrößerung der benannten Peaks und eine Verkleinerung der restlichen Peaks. Es wurde so im Zusammenhang mit der Analyse von Eichreihen und ihrer UV/Vis-Spektren eine eindeutige Identifizierung der Peaks vorgenommen. Die Sensitivität der Analytik erwies sich als ausreichend zur sicheren Quantifizierung von AMP-, ADP- und ATP-Gehalten in TCA-Extrakten aus kultivierten Lk004- und HFBE-Zellen. Eichverdünnungen für die Analytik von AMP, ADP und ATP per HPLC ergaben die in Abb. 3.45 gezeigten Eichgeraden.

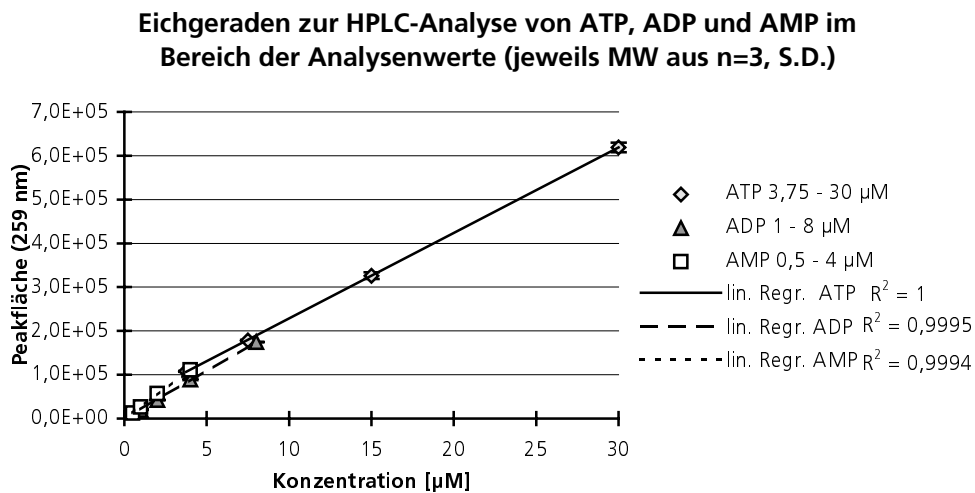


Abb. 3.45 Messung von Adenosinphosphaten. Eichverdünnungen von AMP-, ADP- und ATP-Standards (HPLC-Analyse)

3.3.10.4 Kombination der Methoden

Entsprechend dem Vorgehen bei der Glutathion-Analytik wurde auch hier das geeignetste Verfahren zur Bestimmung in der Mikrotiterplatte, in diesem Fall die luminometrische Methode, mit der HPLC-Analytik kombiniert. Es wurde wie folgt vorgegangen.

- Extraktion der Zellen
- sofortige enzymatische Bestimmung des ATP-Gehaltes mittels Lumineszenzmethode
- Konservierung der Zellextrakte (- 70 °C)
- HPLC-Analytik zu einem frei wählbaren Zeitpunkt.

Auch hier wird damit insgesamt eine Methode erhalten, die mit der Lumineszenztechnik schnell ein erstes Ergebnis liefert, an dem sich im Falle von Zellexpositionen weitere Experimente orientieren können. Später wird dieses Ergebnis durch die HPLC-Analytik bzgl. des ATP-Probengehaltes bestätigt und in seiner Aussage um die Quantifizierung des AMP- und ADP-Gehaltes erweitert.

3.3.11 Zusammenfassung

Es wurden Methoden zur Analyse zellbiologischer und -biochemischer Parameter an kultivierten eukaryontischen Zellsystemen unter Verwendung kleiner Zellmengen etabliert.

Die Auswahl der Parameter basierte auf 3 zellulären Stoffwechselzusammenhängen: (1) allgemeiner Parameter zu Vitalität, (2) Parameter in Zusammenhang mit dem Energiestoffwechsel und (3) Endpunkten in Verknüpfung mit dem Glutathion-Redox-Zyklus unter den Gesichtspunkten des Modelles „oxidativer Streß“.

Die Etablierung der Methoden zur Anwendung in Mikrotiterplatten beinhaltete die Auswahl einer geeigneten Standard-Methode. Dies mußte zum Teil unter Erprobung verschiedener methodischer Alternativen geschehen (Glutathion, SOD, Adenosinphosphate, Lipidperoxidation) oder unter Anpassung der Zellkulturführung (Glutathion-Peroxidase, Induktion der Aktivität durch Kulturführung unter Selenit-Zusatz). Durch Variation von Reaktionsbedingungen wie verwendeter Volumina und Konzentrationen von Assay-Komponenten und der Meßverfahren wurde eine Anpassung der Assay-Sensitivität an die Proben durchgeführt. Für die Analyse von Glutathion und Adenosinphosphaten wurden kombinierte Methoden aus Mikrotiterplatten Assays und HPLC-Analytik erarbeitet.

Die Methoden wurden zum Gebrauch in einer „KIT“-artigen Weise formuliert, um eine hohe Reproduzierbarkeit bei geringem Arbeits- und Kostenaufwand zu ermöglichen. Dies bedeutete die Umsetzung der Methoden in ein festes Ablaufschema, bestehend aus Extraktionsschritt, Vorinkubation mit einem Assay-Premix und Starten der Analyse Reaktion mit einem Startreagenz.

Nach Etablierung der Methoden wurden sie in Messungen mit Verdünnungen kommerzieller Reagenzien als Standards in Eichreihen getestet. Ihre Anwendbarkeit zur Messung von Mikrotiterplatten-Aussaaten mit Lk004-Zellen wurde überprüft.

Zusätzlich standen aus Vorarbeiten oder als kommerzielle Kits Methoden zur elektronischen Zellzählung, zur Analyse des Protein-Gehaltes, des Tetrazoliumsalzumsatzes (WST-1) und der Lactat-Dehydrogenase-Freisetzung in das Kulturmedium zur Verfügung.

Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über die etablierten Methoden.

Etablierte Methoden zur Analyse zellbiologischer /- biochemischer Parameter an kleinen Zellmengen, z. B. Zellaussaaten in Mikrotiterplatten

zellulärer Zusammenhang	Parameter	Methode
Zellmenge	DNA-Gehalt	Fluoreszenz 355 (ex)/485 nm (em) (Interkalationsfarbstoff)
Energiestoffwechsel/Vitalität	Phosphofruktokinase-Aktivität	UV/Vis Messung 340 nm (NADH-Umsatz)
	Enolase-Aktivität	UV/Vis Messung 340 nm (NADH-Umsatz)
	Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase-Aktivität	UV/Vis Messung 340 nm (NADPH-Umsatz)
	ATP-Gehalt	Lumineszenz Messung (Luziferase Reaktion)
	AMP-, ADP- und ATP-Gehalt	HPLC - Analytik (ohne Derivatisierung, RP-18 Säule, UV/Vis Detektion 259 nm)
Glutathion-Redox-Zyklus/oxidativer Streß	Katalase-Aktivität	UV/Vis Messung 565 nm (peroxidative Aktivität der Katalase)
	Glutathion-S-Transferase-Aktivität	UV/Vis Messung 340 nm (CDNB Umsatz)
	Glutathion-Reduktase-Aktivität	UV/Vis Messung 405 nm (DTNB Umsatz)
	Glutathion-Peroxidase-Aktivität	UV/Vis Messung 340 nm (NADPH Umsatz)
	Superoxid-Dismutase-Aktivität	Lumineszenz Messung (System mit Hypoxanthin/Xanthin Oxidase und Lucigenin)
	Lipidperoxidations-Marker	UV/Vis Messung 530 nm , 590 nm (TBARS, MPI)
	Gesamtglutathion-Gehalt	UV/Vis Messung 405 nm (DTNB - Recycling)
	Glutathion-Gehalt (reduziert, oxidiert)	HPLC - Analytik (Dinitrophenol Derivate, NH ₂ Säule, UV/Vis-Detektion 355 nm)

3.4 Expositionen gegen *tert.*-Butylhydroperoxid und Wasserstoffperoxid

Ziel der Expositionen gegen *tert.*-Butylhydroperoxid (tBuOOH) und Wasserstoffperoxid war es, erste Erkenntnisse für die Bearbeitung der Fragestellung nach der Eignung des Zellmodelles für toxikologische Untersuchungen im Modell „oxidativer Streß“ zu gewinnen. Dazu sollte ein Behandlungsmodell gefunden werden, welches zu einer geringen Zellschädigung mit nur geringem Zellvitalitätsverlust führt. Durch sie sollte die Zelle zur Aktivierung von Abwehrmechanismen und zu allgemeiner Stoffwechselaktivierung gezwungen werden. Die Etablierung eines solchen Behandlungsmodelles erforderte ein kinetisches und konzentrationsabhängiges Screening, für welches ebenfalls eine geeignete Methode zu etablieren war.

Auf Grundlage des erarbeiteten Behandlungsmodells wurden submerse Expositionen gegen tBuOOH und Wasserstoffperoxid durchgeführt. Kinetische Untersuchungen sowie Messungen von Konzentrations-/Wirkungskurven (tBuOOH) sollten die Reproduzierbarkeit, Sensitivität und Spezifität des biologischen Indikatorsystems charakterisieren.

3.4.1 Screening - Erarbeitung eines Behandlungsmodelles

Es wurden zunächst im Konzentrationsbereich von 0,01 mmol/l bis 100 mmol/l über den Zeitraum von 24 Stunden orientierende Expositionen gegen tBuOOH durchgeführt, bei denen die Endpunkte DNA, Tetrazoliumsalzumsatz (WST-1), Phosphofruktokinase-Aktivität und LDH-Freisetzung in das Kulturmedium gemessen wurden. Bereits nach einer Expositionszeit von einer Stunde war dabei in einer Behandlungskonzentration von 0,5 mM tBuOOH der Tetrazoliumsalzumsatz gegenüber einer unbehandelten Kontrolle auf 80 % gefallen. Im Zeitraum von 2 bis 5 Stunden wurden in dieser Konzentration bereits deutliche Abnahmen des DNA-Gehaltes detektiert, die sich bis zum Zeitpunkt 24 Stunden auf einen Wert von nur 10 % des DNA-Gehaltes der Kontrolle verstärkte.

Weder in kleineren noch in höheren Konzentrationen konnten nach Normierung der Meßergebnisse aus WST-Umsatz und Phosphofruktokinase-Aktivität auf den DNA-Gehalt erhöhte Werte gegenüber der Kontrolle gemessen werden. Daraus wurde geschlossen, daß die Schädigung der Zellen durch tBuOOH bei einer Behandlungszeit von 24 Stunden zu hoch war, um regulative Mechanismen in der Zelle zu zulassen. Daher wurde ein alternatives Behandlungsmodell erarbeitet, durch das die Zellen bei geringer zytotoxischer Wirkung der Behandlungssubstanz zur Induktion von Abwehrmechanismen provoziert werden sollten. Andererseits ist bekannt, daß für Vorgänge wie Enzyminduktionen oder -repressionen Zeiträume von mehreren Stunden benötigt werden (Karlson, 1988). Um auch derartige zelluläre Stoffwechselveränderungen meßbar zu machen, wurde daher nach einer verkürzten Expositionszeit zur weiteren Kultivierung ein Mediumwechsel zu Kulturmedium ohne Behandlungssubstanz durchgeführt.

Der Zeitpunkt dieses Mediumwechsels wurde für beide zu untersuchenden Substanzen, tBuOOH und H₂O₂, nach Durchführung eines Toxizitätsscreenings mit den Parametern DNA-Gehalt, LDH-Freisetzung in das Kulturmedium und Tetrazoliumsalzumsatz (WST-1) festgelegt.

3.4.1.1 Toxizitätsscreening für Wasserstoffperoxid

Das kinetische Toxizitätsscreening für den Parameter LDH-Freisetzung in das Kulturmedium ergab für eine Exposition gegen Wasserstoffperoxid das folgende Ergebnis.

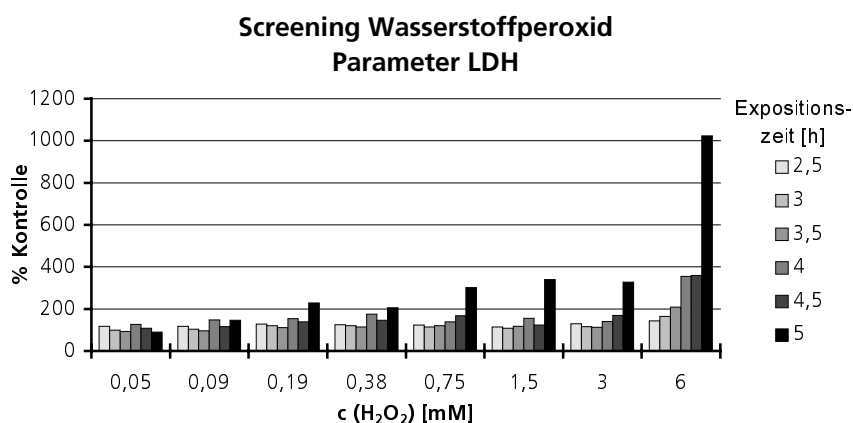


Abb. 3.46 Toxizitätsscreening für Wasserstoffperoxid. Messung des Parameters LDH-Freisetzung in das Kulturmedium nach durchgehender Exposition über die angegebenen Zeiträume.

Deutlich erhöhte Meßwerte gegenüber der Kontrolle wurden in Konzentrationen oberhalb 0,38 mmol/l für Expositionszeiten von mindestens 4,5 Stunden gefunden. Es wurde eine nach diesen Werten definierte Dosis-/ Wirkungskurve für Wasserstoffperoxid gemessen.

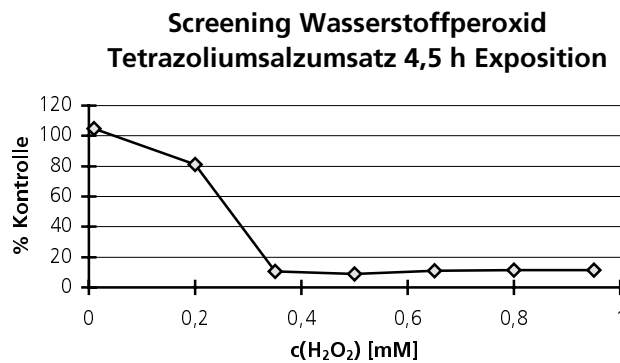


Abb. 3.47 Toxizitätsscreening für Wasserstoffperoxid. Messung des Tetrazoliumsalzumsatzes nach durchgehender 4,5stündiger Exposition

Die Grafik zeigt, daß bei einer derartigen Behandlungszeit bereits in einer Konzentration von 0,35 mmol/l Wasserstoffperoxid nahezu kein Tetrazoliumsalzumsatz mehr meßbar war. Daher wurde das kinetische Screening unter Verwendung der Parameters Tetrazoliumsalzumsatz und DNA-Gehalt wiederholt und nach diesen Ergebnissen die Behandlungszeit vor Wechsel des Kulturmediums auf 2 Stunden festgesetzt. Danach ergaben sich die folgenden Dosis-/ Wirkungskurven.

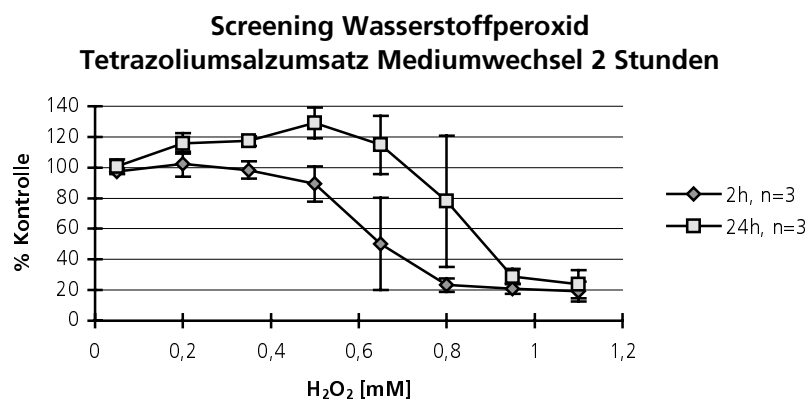


Abb. 3.48 Toxizitätsscreening für Wasserstoffperoxid. Messung des Tetrazoliumsalzumsatzes nach 2stündiger Exposition (2h) bzw. 2stündiger Exposition und 22stündiger Nachinkubation in Kulturmedium ohne H_2O_2 (24h)

Die Grafik zeigt für die Messung nach 2 Stunden eine Dosisabhängigkeit im Konzentrationsbereich von 0,35 bis 0,8 mmol/l Wasserstoffperoxid. Eine deutliche Zunahme des Tetrazoliumsalzumsatzes im folgenden Zeitraum von 22 Stunden dokumentiert, daß auch in diesen Behandlungsdosen die biologische Aktivität erhalten blieb.

3.4.1.2 Toxizitätsscreening für *tert.*-Butylhydroperoxid

Entsprechend dem Vorgehen für die Modellsubstanz Wasserstoffperoxid wurde beim Screening zur Erfassung der Substanzwirkung von tBuOOH vorgegangen. Den auch hier vorhandenen Effekt eines Mediumwechsels zu Behandlungssubstanz-freiem

Kulturmedium auf den Expositionsverlauf gegen tBuOOH im Gegensatz zu einer durchgehenden Exposition dokumentiert die folgende Grafik.

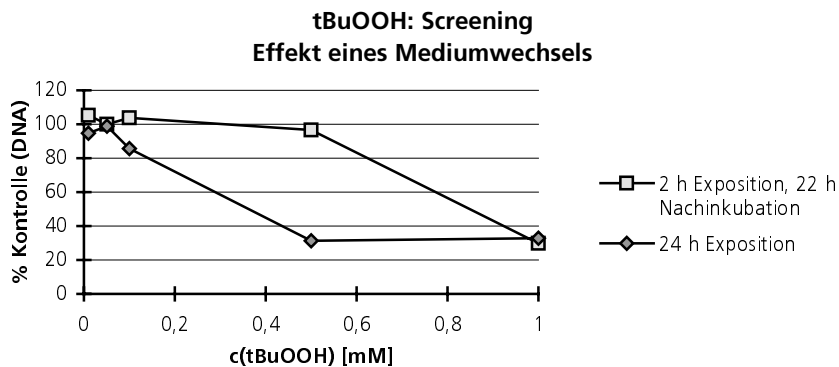


Abb. 3.49 Exposition gegen tBuOOH. Messung des DNA-Gehaltes nach 24stündiger durchgehender Exposition (24h) oder 2stündiger Exposition und 22stündiger Nachinkubation in Kulturmedium ohne tBuOOH (2h).

Eine durchgehende Exposition gegen tBuOOH führte innerhalb von 24 Stunden bereits in einer Konzentration von 0,1 mmol/l zu einer Verringerung des DNA-Gehaltes. Wurde der Mediumwechsel nach 2 Stunden durchgeführt, so trat dieser Effekt erst oberhalb einer Konzentration von etwa 0,5 mmol/l ein.

Der späteste Meßzeitpunkt innerhalb der Nachinkubationsperiode wurde ebenfalls nach einem kinetischen Screening mit dem Endpunkt Tetrazoliumsalzumsatz (WST-1) für eine Exposition gegen tBuOOH festgelegt.

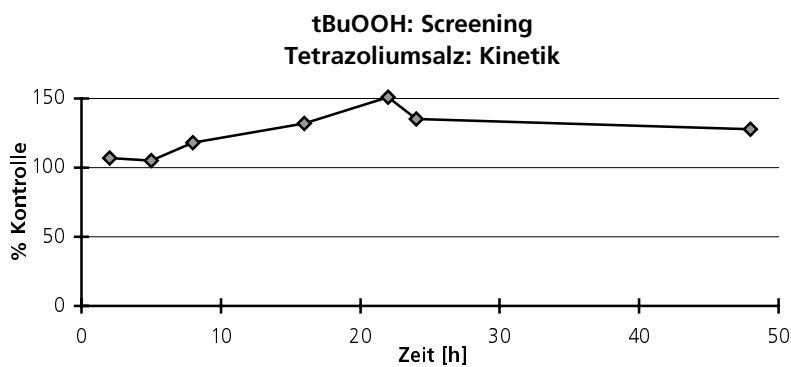


Abb. 3.50 Screening für tBuOOH. Kinetik des Tetrazoliumsalzumsatzes nach 2stündiger Exposition gegen 0,5 mM tBuOOH und anschließender Nachinkubation in Kulturmedium ohne tBuOOH

Eine maximale Erhöhung des Tetrazoliumsalzumsatzes gegenüber der Kontrolle wurde im Bereich von 20 bis 25 Stunden nach Behandlungsbeginn gefunden. Der späteste Meßzeitpunkt wurde daher auf eine Zeit von 24 Stunden festgelegt.

Dieser wurde auch für die Etablierung eines Behandlungsschemas von Lk004-Zellen gegen Wasserstoffperoxid zugrund gelegt.

3.4.1.3 Behandlungsschema

Das nach diesen Screeningexperimenten festgelegte Behandlungsschema für die submerse Exposition von Lk004-Zellen entsprach somit dem folgenden Ablauf.

Zeitpunkt [h]	Ereignis
0	Expositionsbeginn: Zugabe der Behandlungssubstanz zum Kulturmedium (kein Mediumwechsel)
1	(gegebenenfalls Meßzeitpunkt 1 Stunde)
2	Mediumwechsel zu Kulturmedium ohne Behandlungssubstanz
3, 4, ...	frei wählbare Meßzeitpunkte für die Untersuchung beliebiger Parameter
24	letzter Meßzeitpunkt

3.4.2 Submerse Expositionen gegen tBuOOH und Wasserstoffperoxid

Lk004-Zellen wurden nach den im Toxizitätsscreening festgelegten Konzentrationen und Behandlungszeiten submers gegen *tert.*-Butylhydroperoxid und Wasserstoffperoxid exponiert. Dabei wurde der Einfluß der Behandlungssubstanzen auf die Parameter Gesamtglutathion-Gehalt, Glutathion-Peroxidase- und Glutathion-Reduktase-Aktivität und das ATP/ADP-Verhältnis kinetisch im Zeitintervall bis 24 Stunden untersucht. Zum Zeitpunkt 24 nach Behandlungsbeginn wurden nach Expositionen gegen tBuOOH Konzentrations/Wirkungskurven für die Parameter DNA-Gehalt, Tetrazoliumsalzumsatz (auch H_2O_2), Phosphofruktokinase-Aktivität, Enolase-Aktivität, G6PDH-Aktivität, LDH-Freisetzung in das Kulturmedium, Katalase-Aktivität und Superoxid-Dismutase-Aktivität ermittelt. Für Expositionen gegen Wasserstoffperoxid wurde dessen Einfluß auf die Bildung von Lipidperoxidationsprodukten kinetisch untersucht.

3.4.2.1 Kinetische Effekte

Abb. 3.51 zeigt ein repräsentatives Ergebnis für den kinetischen Verlauf der Substanzwirkung auf einen der untersuchten Endpunkte im Vergleich mehrerer Behandlungskonzentrationen.

Die Wirkungen der untersuchten Konzentrationen unterschieden sich charakteristisch. Die „niedrige“ Konzentration 0,01 mM tBuOOH war nicht signifikant unterscheidbar von den unbehandelten Kontrollen. Die „hohe“ Konzentration 1,5 mM tBuOOH führte zu einem deutlichen, vergleichsweise schnellen und zeitabhängigen Verlust an intrazellulärem Gesamtglutathion. Die Kinetik der für die „mittlere“ Konzentration von 0,5 mM tBuOOH gemessenen Werte zeigte hingegen einen anderen Verlauf. Nach einem Absinken der Konzentration zum Zeitpunkt 1 Stunde auf ca. 60 % der unbehandelten Kontrollzellen nahm die Konzentration stetig zu, erreichte nach etwa 4 Stunden das Niveau der Kontrollen und stieg stetig weiter bis auf einen Wert von ca. 200 % der Kontrolle nach 24 Stunden.

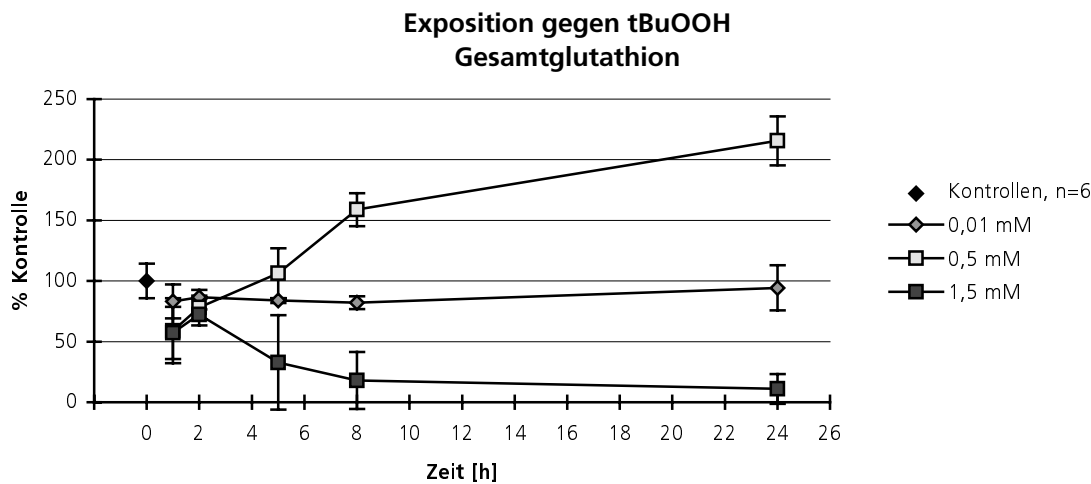


Abb. 3.51 Exposition gegen tBuOOH. Kinetik des Gesamtglutathion-Gehaltes nach Exposition gegen tBuOOH in den Konzentrationen 0.01, 0.5 und 1.5 mM

Eine Unterscheidung dieser Art nach „hoher“, „mittlerer“ und „niedriger“ Konzentration konnte mit Ausnahme des ATP/ADP-Verhältnisses für alle gemessenen Parameter und beide Untersuchungssubstanzen getroffen werden. Für Wasserstoffperoxid lag die mittlere Konzentration ebenfalls bei 0,5 mmol/l. Im folgenden werden daher nur die für diese Konzentrationen, 0,5 mM H_2O_2 bzw. tBuOOH, gemessenen Kinetiken miteinander verglichen. Zunächst werden die Wirkungen der Expositionen gegen Wasserstoffperoxid und *tert.*-Butylhydroperoxid auf den Gesamtglutathion-Gehalt einander gegenüber gestellt (Abb. 3.52).

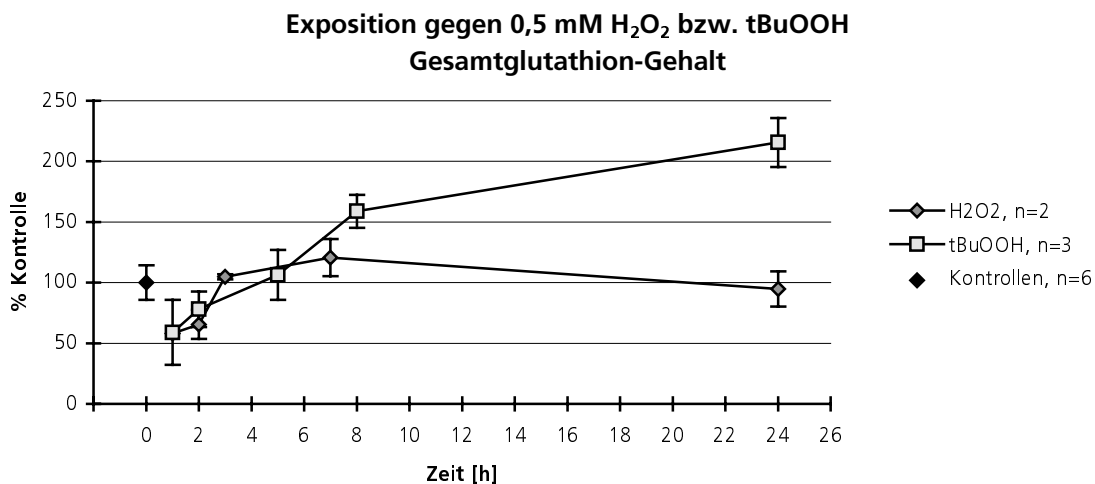


Abb. 3.52 Exposition gegen tBuOOH und H_2O_2 . Kinetik des Gesamtglutathion-Gehaltes bei $c=0,5$ mM

Die Grafik zeigt eine unterschiedliche Kinetik in der Veränderung des intrazellulären Gesamtglutathion-Gehaltes für Expositionen gegen Wasserstoffperoxid und tBuOOH. Es fand zunächst bei beiden Substanzen eine Konzentrationsverringerung auf ca. 60 % der Kontrolle statt. Diese Verringerung wurde im Zeitraum von 4 bis 6 Stunden - ebenfalls bei beiden Substanzen - ausgeglichen. Danach blieb der Wert bei Zellen, welche gegen Wasserstoffperoxid exponiert wurden, auf dem Niveau der Kontrollen. Die Messungen

nach einer Exposition gegen tBuOOH hingegen ließen eine Erhöhung auf 200 % der Kontrolle im Zeitraum bis 24 Stunden erkennen.

Die Kinetik der Aktivität der Glutathion-Reduktase nach Behandlungen mit tBuOOH und H₂O₂ unterschieden sich ebenfalls voneinander. Nach Exposition gegen Wasserstoffperoxid war keine Veränderung der exponierten Zellen gegenüber den Kontrollzellen erkennbar. Zu den Zeitpunkten 17 und 24 Stunden war die Glutathion-Reduktase-Aktivität in Zellen nach einer tBuOOH Behandlung indes deutlich erhöht.

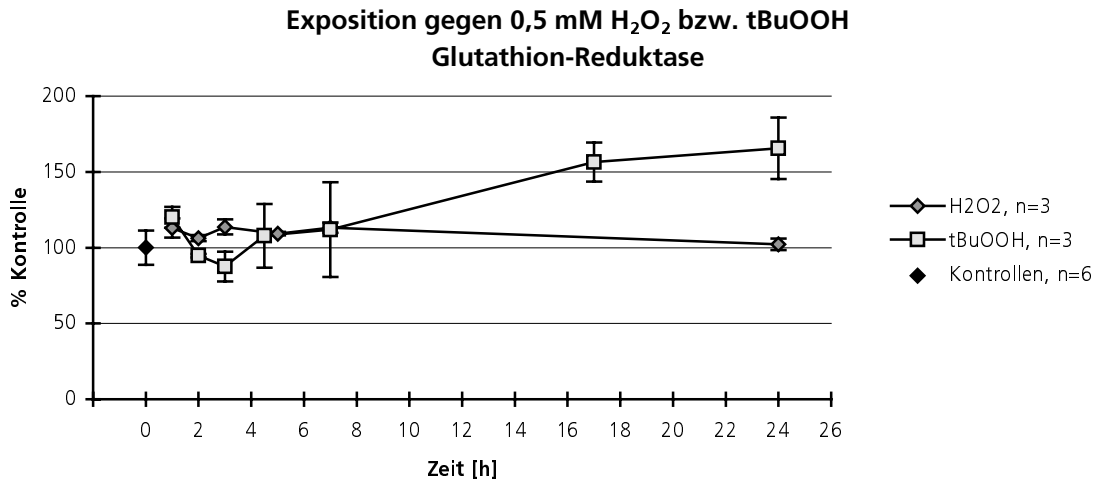


Abb. 3.53 Exposition gegen tBuOOH und H₂O₂. Kinetik der Glutathion-Reduktase bei c=0,5 mM

Nach Expositionen gegen Wasserstoffperoxid wurde in Lk004-Zellen zum Zeitpunkt ca. 4 Stunden nach Expositionsbeginn eine Erhöhung der zellulären Glutathion-Peroxidase Aktivität auf ca. 150 % der Kontrolle gefunden, die sich bis zum Zeitpunkt 24 Stunden bis auf das Niveau der Kontrollzellen verringerte (Abb. 3.54). Eine Behandlung mit *tert*-Butylhydroperoxid hingegen inhibierte die Aktivität zeitunabhängig im Bereich von 1 bis 24 Stunden. Diese Inhibition stieg konzentrationsabhängig an (nicht dargestellt).

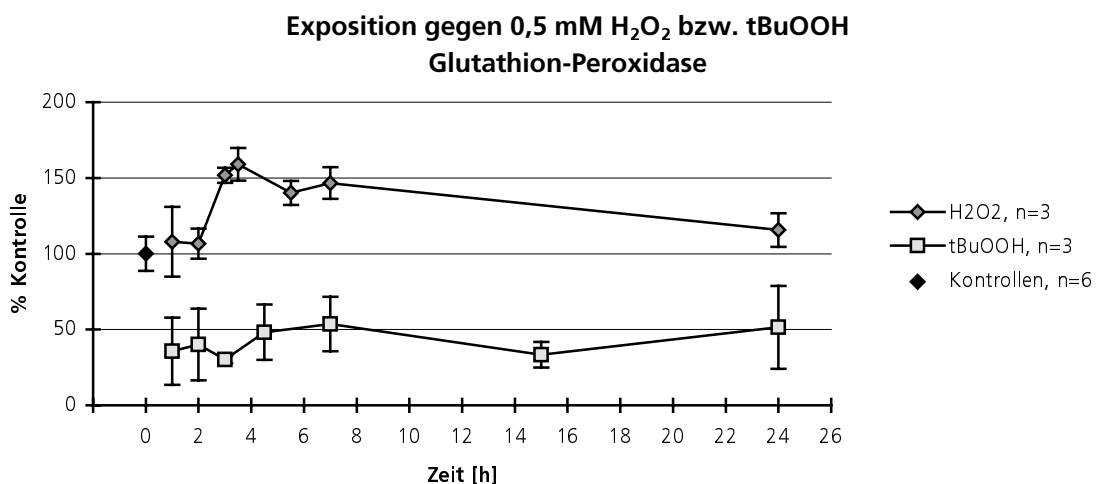


Abb. 3.54 Exposition gegen tBuOOH und H₂O₂. Kinetik der Glutathion-Peroxidase bei c=0,5 mM

Die Untersuchung des ATP/ADP-Verhältnisses ließ indessen keine Unterschiede zwischen dem zellulären Status der exponierten Zellen erkennen.

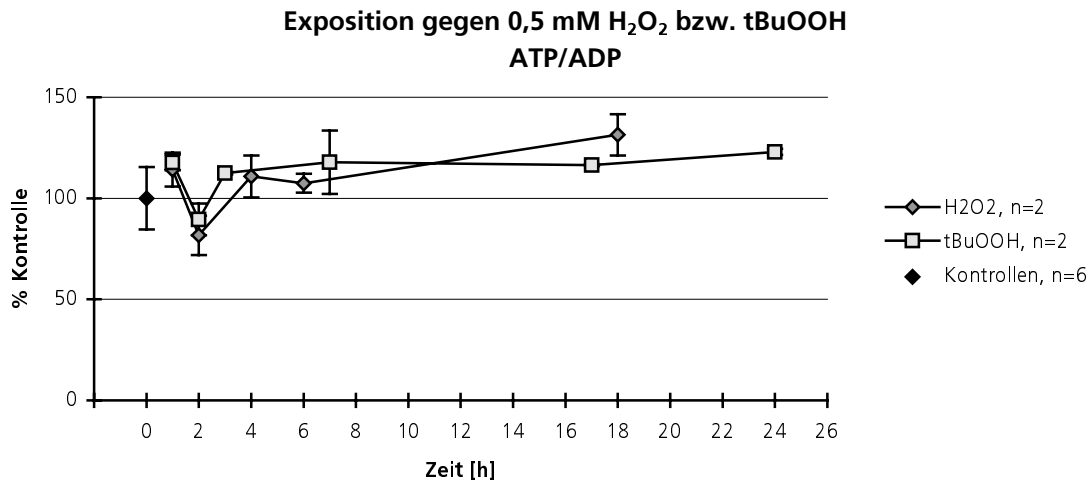


Abb. 3.55 Exposition gegen tBuOOH und H₂O₂. Kinetik des ATP/ADP-Verhältnisses bei c=0,5 mM

3.4.2.2 Konzentrationsabhängige Effekte

24 Stunden nach Expositionsbeginn wurden konzentrationsabhängige Effekte untersucht. Für den Tetrazoliumsalzumsatz wurden folgende Ergebnisse gefunden:

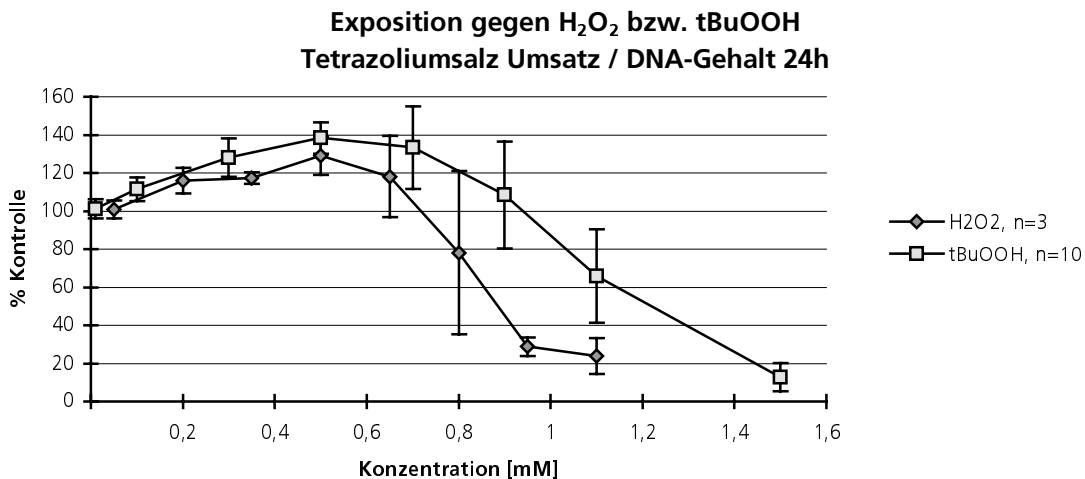


Abb. 3.56 Exposition gegen tBuOOH und H₂O₂. Auf den DNA-Gehalt normierter Tetrazoliumsalzumsatz konzentrationsabhängig von der Behandlungssubstanz nach einer Expositionszeit von 2 Stunden und 22stündiger Nachinkubation.

Die Konzentrations-/Wirkungskurven zeigen für beide Substanzen den gleichen charakteristischen Verlauf. Man erkennt eine dosisabhängige Aktivitätszunahme bis zu einer Konzentration von 0,5 mmol/l. Mit zunehmender Konzentration fällt die Aktivität dosisabhängig und die Schwankungsbreite der Ergebnisse wird deutlich größer. Eine ähnliche Konzentrationsabhängigkeit wurde bei der Untersuchung der Endpunkte

Phosphofruktokinase-, Enolase-, G6PDH und Superoxid-Dismutase-Aktivität nach Expositionen gegen tBuOOH gefunden.

Der DNA-Gehalt, die Katalase-Aktivität und die LDH-Freisetzung in das Kulturmedium zeigten andere Konzentrations-/Wirkungsabhängigkeiten.

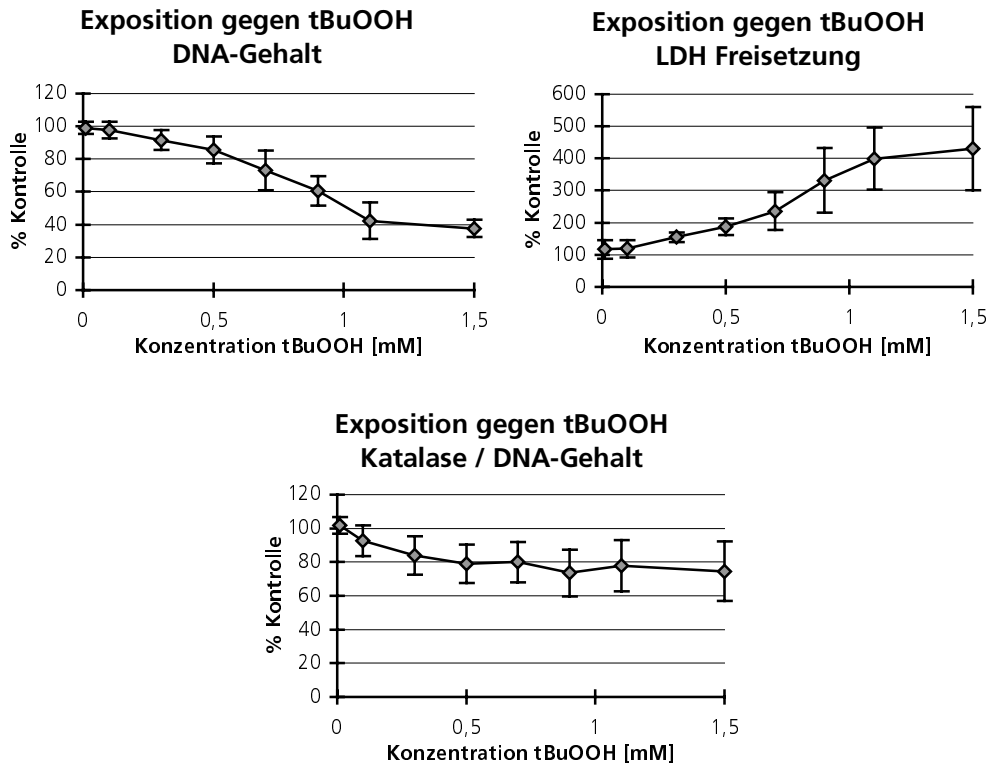


Abb. 3.57 Exposition gegen tBuOOH. Konzentrationsabhängigkeiten DNA-Gehalt, LDH-Freisetzung und Katalase-Aktivität.

Der DNA-Gehalt und die LDH-Freisetzung in das Kulturmedium zeigten eine klare Konzentrationsabhängigkeit im Sinne zunehmender Zytotoxizität. Die Katalase-Aktivität aber fiel bereits bei einer Konzentration von 0,3 mM tBuOOH auf 80 % des Kontrollwertes. Mit zunehmender Konzentration verändert sich dieser Wert nicht weiter.

Die Meßwerte für alle nach 24 Stunden untersuchten Parameter sind für die Konzentration 0,5 mM tBuOOH in Abb. 3.58 im Vergleich dargestellt.

Mit Ausnahme der Parameter DNA-Gehalt und Katalase-Aktivität zeigten alle untersuchten Endpunkte eine leichte Erhöhung gegenüber der Kontrolle von etwa 20 bis 30 %. Die Schwankungsbreiten für die Ergebnisse dieser Experimente, welche je nach Endpunkt in 5 bis 10 unabhängigen Versuchen durchgeführt wurden, liegen bei 5 bis 10 %.

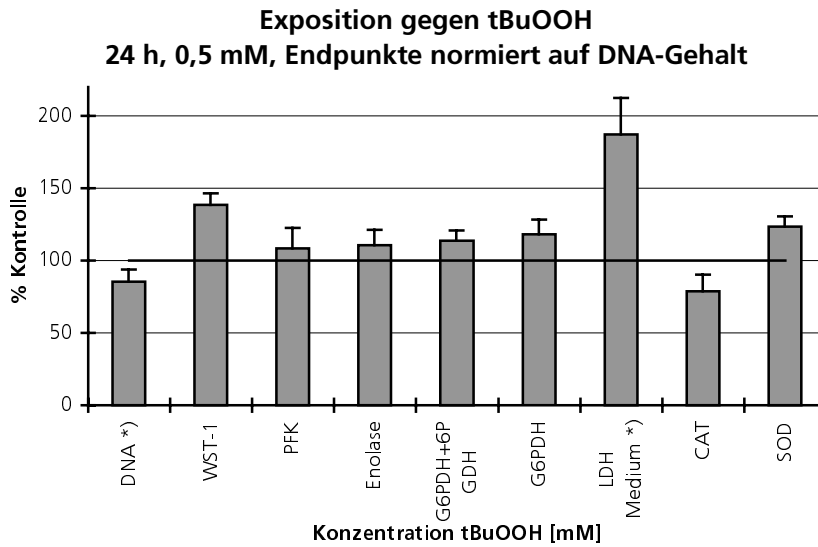


Abb. 3.58 Exposition gegen tBuOOH. Ergebnisse der Expositionen für den Meßzeitpunkt 24 Stunden, n ≥ 5 . *): Parameter wurden nicht auf DNA-Gehalt normiert

3.4.2.3 Lipidperoxidation

Es wurden Expositionen gegen Wasserstoffperoxid entsprechend den Ergebnissen des Screenings durchgeführt. Nach dem angegebenen Zeitraum wurde die Lipidperoxidation gemessen. Die Analyse der Thiobarbitursäure-reaktiven Substanzen (TBARS) ergab folgendes Ergebnis.

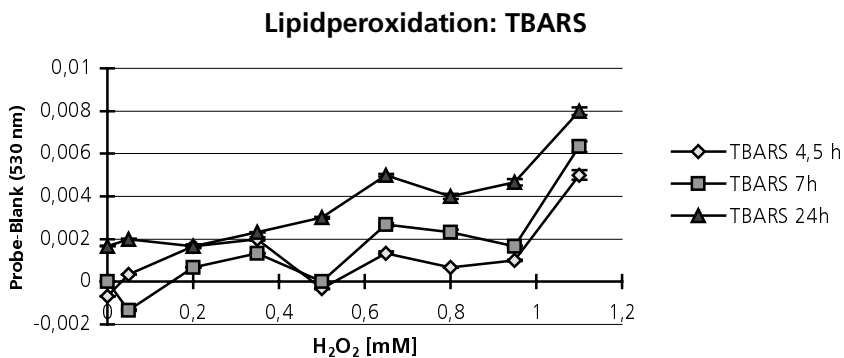


Abb. 3.59 Exposition gegen H₂O₂. TBARS-Assay

Die erhaltenen Meßwerte waren äußerst klein. Sie lagen im Bereich weniger tausendstel O.D. und gestatteten keine Auswertung als %-Kontrolle, da für unbehandelte Kontrollen kein Signal erhalten wurde. Es war sowohl eine Zeit- als auch eine Konzentrationsabhängigkeit erkennbar, doch lag selbst der Meßwert der höchsten Behandlungsdosis nur 8 mO.D. über dem Blank.

Es wurden weiterhin Messungen mit dem Lipidperoxidationsassay unter Verwendung von MPI durchgeführt. Es wurde sowohl Malondialdehyd als auch die Summe der Konzentration von Malondialdehyd und 4-HNE intra- und extrazellulär gemessen. Repräsentativ für alle Meßvarianten zeigt die folgende Grafik das Ergebnis der Messung

der intrazellulären Summe der Konzentration von MDA und 4-HNE relativ zur unbehandelten Kontrolle.

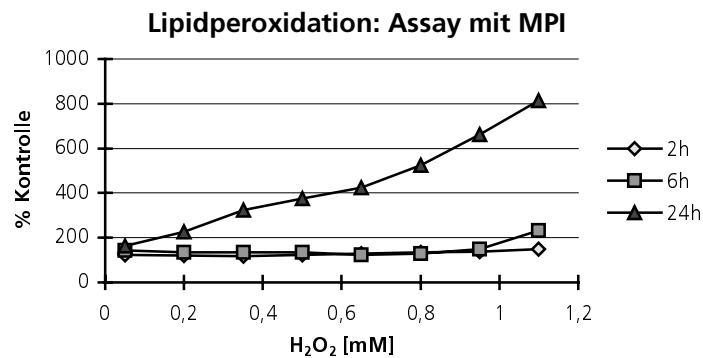


Abb. 3.60 Exposition gegen H₂O₂. Lipidperoxidations Assay mit MPI

Auch hier sind Konzentrations- und Zeitabhängigkeiten zu erkennen. Die erhaltenen Meßwerte ließen in diesem Fall die Berechnung des Wertes %-Kontrolle zu, doch lagen auch sie maximal bei einem Meßwert von 60 mO.D.

3.4.3 Zusammenfassung

Es wurden Experimente zur Realisierung von submersen Expositionen gegen tBuOOH und Wasserstoffperoxid als Modellsubstanzen für oxidativen Streß durchgeführt. Zunächst wurde ein Behandlungsmodell erarbeitet, welches die Erfassung zellulärer Reaktionen bei geringer Substanztoxizität gewährleisten sollte. Hierfür wurden kinetische und konzentrationsabhängige Screeningexperimente durchgeführt. Die Ergebnisse zeigten, daß der Parameter LDH-Freisetzung in das Kulturmedium als Orientierungsgröße zur Konzentrationsfindung für eine geringe Substanzwirkung nicht geeignet war. Die Untersuchung des Tetrazoliumsalzumsatzes in Verbindung mit der Bestimmung des DNA-Gehaltes erwies sich hingegen als erfolgreich. Ergebnis dieser Experimente war ein Behandlungsmodell, welches eine Kurzzeitexposition gegen die zu untersuchende Substanz im Rahmen weniger Stunden mit einer Nachinkubation bis zu 24 Stunden vorsah.

Auf Grundlage dieses Behandlungsmodelles wurden in Expositionen gegen Wasserstoffperoxid und *tert.*-Butylhydroperoxid kinetische Messungen zur Substanzwirkung auf die Parameter ATP/ADP-Gehalt, intrazellulärer Gesamtglutathion-Gehalt und Aktivitäten der Glutathion-Peroxidase und -Reduktase durchgeführt. Kinetische Veränderungen dieser Parameter konnten innerhalb des Zeitintervalles von 24 Stunden nach Expositionsbeginn für Expositionen gegen jede der beiden Substanzen reproduzierbar analysiert werden. Bei der Analyse des Tetrazoliumsalzumsatzes (konzentrationsabhängig nach 24 Stunden) und der kinetischen Veränderung des ATP/ADP-Verhältnisses wurden keine substanzspezifischen Unterschiede in der zellulären Reaktion gefunden. Deutliche substanzspezifische und konzentrationsabhängige kinetische Unterschiede hingegen zeigten die Ergebnisse der Untersuchungen zu den

Parametern Glutathion-Peroxidase-/Reduktase-Aktivität und zum intrazellulären Gesamtglutathion-Gehalt.

Nach Expositionen gegen *tert.*-Butylhydroperoxid wurden nach 24 Stunden Konzentrations-/Wirkungskurven gemessen. Dabei konnten unterschiedliche Konzentrationsabhängigkeiten reproduzierbar gemessen werden. Im Vergleich der Ergebnisse für eine Behandlungskonzentration von 0,5 mmol/l nach 24 Stunden wurden Erhöhungen des Tetrazoliumsalzumsatzes und der Aktivitäten von Phosphofruktokinase, Enolase, Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase und der Superoxid-Dismutase in der Größenordnung von 10 - 40 % gefunden. Die Aktivität der Katalase fiel in dieser Konzentration um etwa 20 %, die LDH-Freisetzung stieg um etwa 80 %.

Untersuchungen zur Lipidperoxidation nach Wasserstoffperoxid-Behandlungen ergaben zeitabhängig und konzentrationsabhängig zunehmende Meßwerte. Die absoluten Größen der erhaltenen Rohdaten ließen jedoch keine reproduzierbaren Ergebnisse und Aussagen zu, da sie an der äußersten Grenze der methodischen Sensitivität lagen. So war die Bestimmung in unbehandelten Kontrollen zum Teil nicht möglich.

3.5 Exposition gegen Zigarettenrauchkondensat

Zigarettenrauchkondensat (CSC) der Referenz-Zigarette K1R4F wurde als Modellsubstanz für komplexe Substanzgemische eingesetzt. Ziel der Experimente dieses Abschnittes war die Bearbeitung der Frage nach Eignung des biologischen Testsystems für toxikologische Untersuchungen auch derartiger Prüfsubstanzen. Es sollten Erkenntnisse gewonnen werden, ob auch in diesem Fall reproduzierbare Ergebnisse bei der Analyse biologischer Wirkungen erhalten werden können.

3.5.1 Screening und Behandlungsschema

Zigarettenrauchkondensat stellt eine Lösung der Partikelphase von Zigarettenrauch in DMSO dar. Es wurde daher zunächst die Wirkung des Lösungsvermittlers DMSO auf das Zellsystem in Screeningexperimenten untersucht. Gemäß den Erkenntnissen aus Experimenten mit Wasserstoffperoxid und *tert.*-Butylhydroperoxid wurde dazu ein Toxizitätsscreening über verschiedene DMSO-Konzentrationen durchgeführt. Dabei wurden die Parameter Tetrazoliumsalzumsatz und DNA-Gehalt analysiert. Die Behandlung wurde einerseits für ein Behandlungsschema mit Mediumwechsel nach einer Stunde als auch für eine durchgängige Exposition über 24 Stunden durchgeführt.

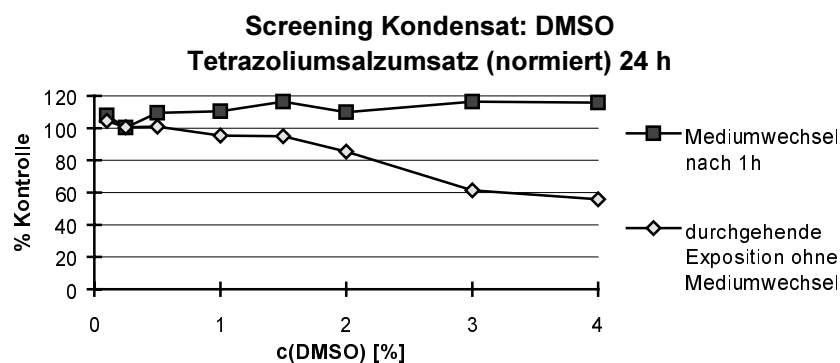


Abb. 3.61 Toxizitätsscreening für DMSO. Messung des Tetrazoliumsalzumsatzes nach 24stündiger Exposition bzw. 1stündiger Exposition und 23stündiger Nachinkubation in DMSO-freiem Medium

Für eine Behandlung mit Mediumwechsel zeigten die Meßwerte des Tetrazoliumsalz Assays nach 24 Stunden bis zur Konzentration von 4 % DMSO in Kulturmedium keine Zytotoxizität. Wurde kein Mediumwechsel durchgeführt, sank der Tetrazoliumsalzumsatz bei Konzentrationen ≥ 2 % auf Werte von 80 % der Kontrolle und darunter. Für eine durchgehende Exposition gegen die Prüfsubstanzformulierung Zigarettenrauchkondensat in DMSO über 24 Stunden bis zu einer Konzentration von 100 $\mu\text{g/ml}$ CSC in Kulturmedium wurde nach einem Toxizitätsscreening Tetrazoliumsalzumsatz/DNA-Gehalt ebenfalls keine Zytotoxizität gefunden (vgl. Abb. 3.62). Es wurde somit das folgende Behandlungsschema festgelegt.

Zeitpunkt [h]	Ereignis
0	Expositionsbeginn durch Zugabe der Behandlungssubstanz zum Kulturmedium (kein Mediumwechsel), max. Konzentration CSC 100 $\mu\text{g/ml}$
1,5, 6	Meßzeitpunkte für die Analyse zellulärer Parameter
24	letzter Meßzeitpunkt

Die maximal einsetzbare Konzentration war durch die Konzentration der Stammlösung von 10 mg/ml Kondensat in DMSO in Zusammenhang mit der gewählten maximalen Konzentration von 1% DMSO in Kulturmedium vorgegeben. Alle Experimente wurden relativ zu einer Lösungsmittel-Kontrolle mit 1 % DMSO durchgeführt.

3.5.2 Expositionen gegen Kondensat der Zigarette K1R4F

Es wurden Expositionen der Lk004-Zellen gegen Zigarettenrauchkondensat der Zigarette K1R4F durchgeführt. Nach einer Expositionszeit von 1,5 Stunden, 6 Stunden und 24 Stunden wurde der zelluläre Zustand im Hinblick auf Vitalitätssparameter, Endpunkte zum zellulären Energiestoffwechsel und Endpunkte in Verbindung mit dem Glutathion-Redox-Zyklus untersucht. Es werden hier zunächst repräsentative Konzentrations-/Wirkungskurven gezeigt. Darauf folgend werden kinetische Veränderungen bei einer ausgewählten Konzentration für alle untersuchten Endpunkte im Vergleich dargestellt.

3.5.2.1 Konzentrations-/Wirkungskurven

Die Parameter DNA-Gehalt und Tetrazoliumsalzumsatz wurden 1,5- und 24stündige Expositionen gemessen.

Die Ergebnisse der Analyse des DNA-Gehaltes (Abb. 3.62) zeigten keinerlei zytotoxische Wirkung des Zigarettenrauchkondensates im untersuchten Konzentrationsbereich und Zeitraum. Zum Zeitpunkt 24 Stunden wurden in den Konzentrationen zwischen 20 und 80 $\mu\text{g/ml}$ CSC um 10% leicht erhöhte DNA-Gehalte gegenüber der Kontrolle gemessen, die aber innerhalb der Schwankungsbreite derselben lagen. Der Tetrazoliumsalzumsatz (Abb. 3.62) fiel zum Zeitpunkt 1,5 Stunden zunächst dosisabhängig auf 80 % der Kontrolle in der höchsten Konzentration CSC. Nach 24 Stunden wurde indes auch hier kein Unterschied zu dem Tetrazoliumsalzumsatz unbehandelter Kontrollzellen mehr

gemessen (100 $\mu\text{g/ml}$: 97 \pm 9 %). Im Konzentrationsbereich 10 - 80 $\mu\text{g/ml}$ CSC wurde zum Zeitpunkt 24 Stunden eine deutliche Erhöhung des Tetrazoliumsalzumsatzes gegenüber der Kontrolle detektiert (25 $\mu\text{g/ml}$: 127 \pm 9 %).

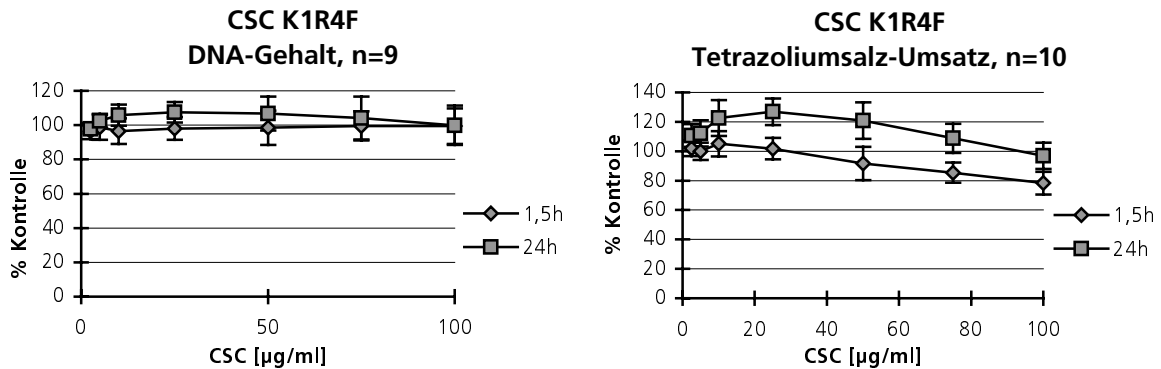


Abb. 3.62 Exposition gegen CSC K1R4F. DNA-Gehalt und Tetrazoliumsalzumsatz

Eine der im Tetrazoliumsalzumsatz gefundenen Charakteristik ähnliche Funktion der Konzentrations-/Wirkungsbeziehungsbeziehung wurde auch bei der Analyse der Phosphofruktokinase und G6PDH-Aktivitäten gefunden. Auch dort zeigten die Zellen eine leichte Aktivitätsverringernach 1,5 Stunden und eine leichte Aktivitätserhöhung mit einem Maximum im Bereich von 20 - 80 $\mu\text{g/ml}$ CSC nach 24 Stunden. Die Konzentrations-/Wirkungsbeziehung der Enolase-Aktivität glich der des DNA-Gehaltes. Sie zeigte abgesehen von einer leichten konzentrationsabhängigen Aktivitätserhöhung nach 24 Stunden kein von der Kontrolle unterschiedliches Signal.

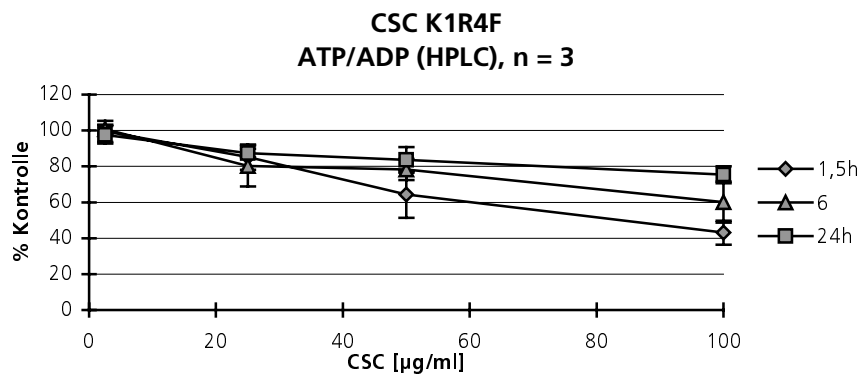


Abb. 3.63 Exposition gegen CSC K1R4F. ATP/ADP-Verhältnis (HPLC)

Es wurde eine konzentrationsabhängige Verringerung des intrazellulären ATP/ADP-Verhältnisses gefunden. In der höchsten Konzentration CSC lag das Triphosphat/Diphosphat-Verhältnis nur noch bei wenig mehr als 40 % der Kontrolle (100 $\mu\text{g/ml}$: 43 \pm 6 %). Mit zunehmender Expositionszeit von 1,5 über 6 bis 24 Stunden erhöhte sich der Meßwert bis auf nahezu 80 % der Kontrolle (100 $\mu\text{g/ml}$: 75 \pm 5 %). Eine vergleichbare Kinetik ergab die Exposition gegen die Konzentration 50 $\mu\text{g/ml}$ CSC.

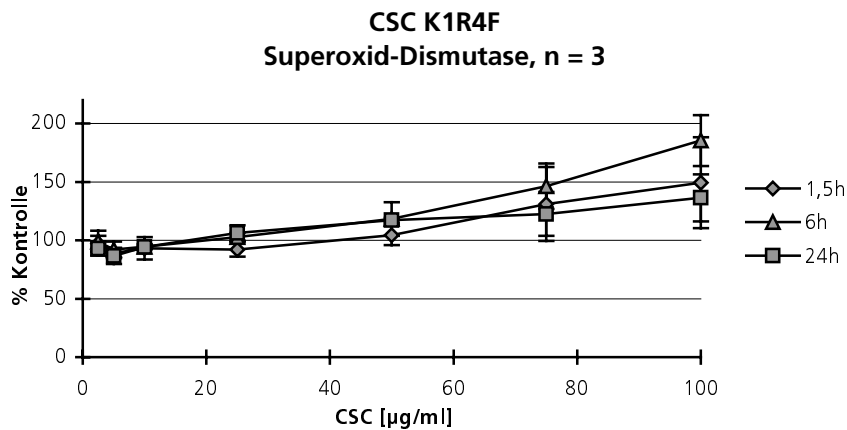


Abb. 3.64 Exposition gegen CSC K1R4F. Aktivität der Superoxid-Dismutase

Die Analyse der Aktivität der Superoxid-Dismutase zeigte eine konzentrationsabhängige Erhöhung gegenüber der Kontrolle für alle drei untersuchten Zeitpunkte. Die stärkste Aktivierung war für den Zeitwert 6 Stunden zu erkennen, zu dem die Zellen in der höchsten Konzertation CSC etwa 190 % der Aktivität der Kontrollzellen erreichten (100 µg/ml : 185 +/- 21 %). Die konzentrationsabhängigen Erhöhungen zu den Zeitpunkten 1,5 Stunden und 24 Stunden lagen in etwa auf vergleichbarem Niveau.

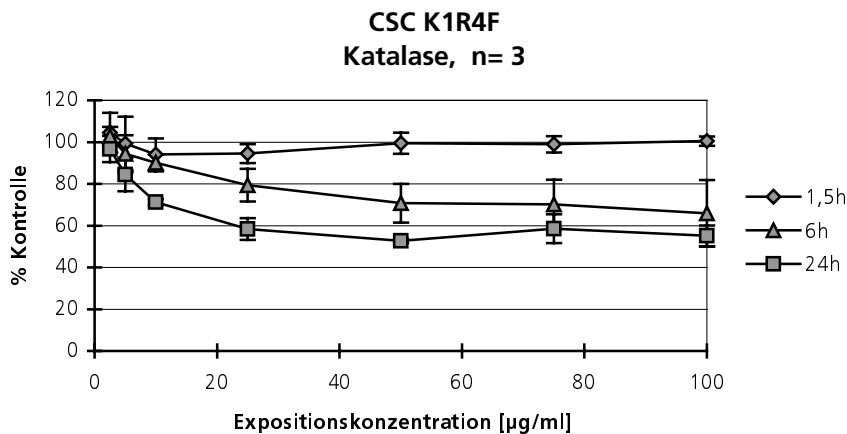


Abb. 3.65 Exposition gegen CSC K1R4F. Aktivität der Katalase

Die Aktivität der Katalase zeigte eine zeitabhängige Verringerung in den mit CSC behandelten Zellen gegenüber der Kontrolle. Oberhalb einer Konzentration von 25 µg/ml CSC trat diese Zeitabhängigkeit ohne Konzentrationsabhängigkeit auf. Unterhalb der genannten Konzentration ging sie in eine einfache zeit- und konzentrationsabhängige Verringerung über.

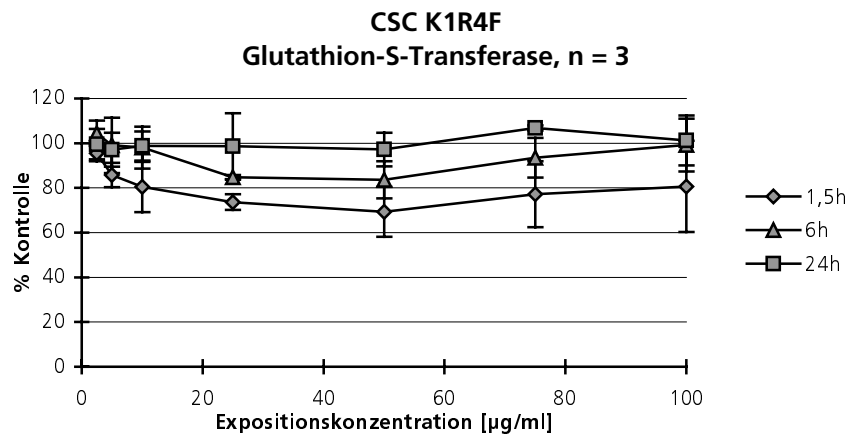


Abb. 3.66 Exposition gegen CSC K1R4F. Aktivität der Glutathion-S-Transferase

Auch bei den Messungen zur Aktivität der Glutathion-S-Transferase wurden oberhalb der Konzentration von 20 µg/ml keine Konzentrationsabhängigkeiten gefunden, während diese unterhalb der genannten Konzentration zu detektieren waren. Die Kinetik der Enzymaktivität bewegte sich jedoch gegensätzlich zur Kinetik der Katalase-Aktivität. Sie zeigte eine Verringerung der Aktivität zum Zeitpunkt 1,5 Stunden, welche über den folgenden Zeitraum abnahm bis nach 24 Stunden konzentrationsunabhängig das Niveau der Kontrollzellen erreicht war.

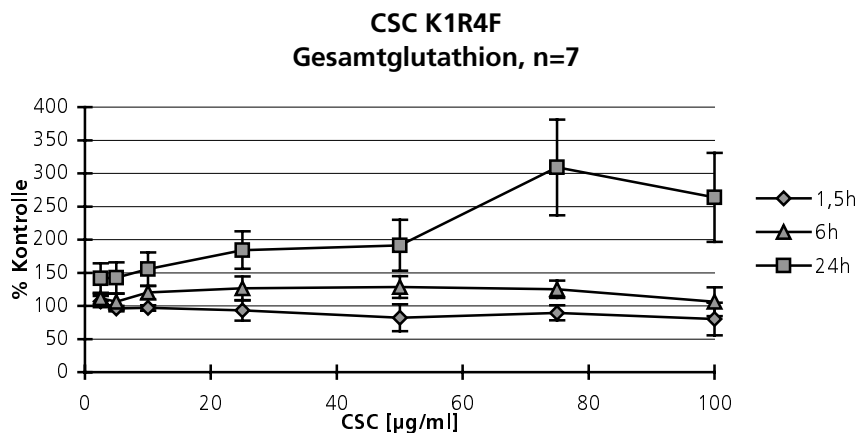


Abb. 3.67 Exposition gegen CSC K1R4F. Intrazellulärer Gesamtglutathion-Gehalt

Zum Zeitpunkt 1,5 Stunden wurde eine konzentrationsabhängige Verringerung des intrazellulären Gesamtglutathion-Gehaltes gefunden. Dieser erhöhte sich mit zunehmender Behandlungsdauer und erreichte nach 24 Stunden bis zu 300 % des Gehaltes der Kontrollzellen. Die maximale Erhöhung zu einem Zeitpunkt lag nach 6 Stunden bei 50 µg/ml CSC. Bis zum Zeitpunkt 24 Stunden verschob sie sich zu der Konzentration 75 µg/ml CSC. Damit bestand ein deutlicher Unterschied im intrazellulären Gehalt an Glutathion-Äquivalenten zwischen der Expositions-Konzentration 50 µg/ml und der Konzentration 75 µg/ml.

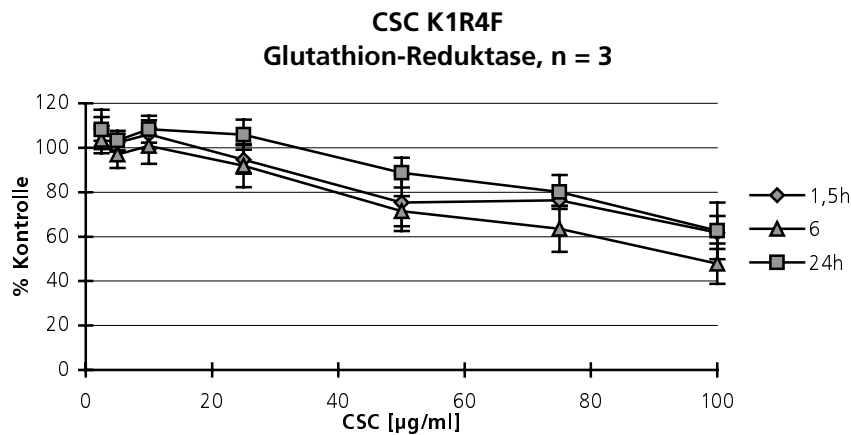


Abb. 3.68 Exposition gegen CSC K1R4F. Aktivität der Glutathion-Reduktase

Das Ergebnis der Untersuchung der Glutathion-Reduktase-Aktivität zeigte eine deutliche Konzentrationsabhängigkeit dieses Endpunktes von der CSC-Konzentration. Die Untersuchungen zu verschiedenen Zeitpunkten ergaben indessen keine signifikant unterschiedlichen Meßwerte. Es wurde somit keine Zeitabhängigkeit sichtbar. Ein entsprechendes Ergebnis wurde bei der Bestimmung der Lactat-Dehydrogenase-Freisetzung in das Kulturmedium erhalten.

3.5.2.2 Ergebnisse aller Messungen für ausgewählte Konzentrationen CSC im Vergleich

Die Meßergebnisse für alle Endpunkte werden zumeist für die Konzentration 75 µg/ml CSC im Vergleich gezeigt, da dies diejenige war, bei der die stärksten Effekte auf die Zellen gemessen werden konnten (vgl. Abb. 3.67). Die Ergebnisse sind dabei in die Gruppen Vitalität, zellulärer Energiestoffwechsel und Glutathion-Redox-Zyklus eingeordnet.

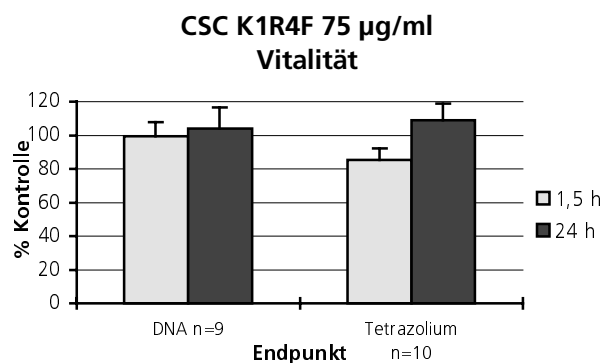


Abb. 3.69 Exposition gegen 75 µg/ml CSC K1R4F. Vitalität

Die Vitalitätsparameter DNA-Gehalt und Tetrazoliumsalzumsatz lassen auch in dieser Darstellung kein Vorliegen von Zytotoxizität im Sinne bleibenden Vitalitätsverlustes erkennen.

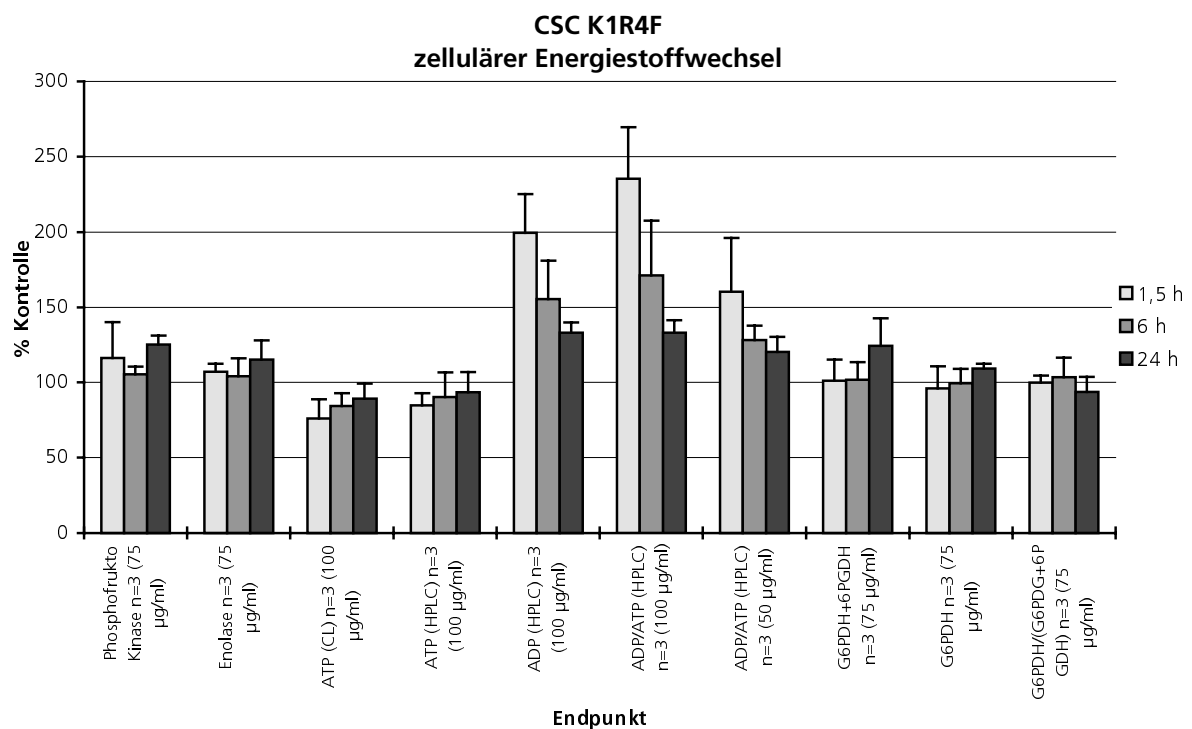


Abb. 3.70 Exposition gegen CSC K1R4F. Zellulärer Energiestoffwechsel

Die Ergebnisse dokumentieren eine gleichartige Veränderung der Aktivität der beiden untersuchten glykolytischen Enzyme Phosphofruktokinase und Enolase sowohl hinsichtlich ihrer Kinetik als auch in der Quantität ihrer Veränderung. Die quantitativen Veränderungen in der Aktivität der Enolase waren nur nicht-signifikant kleiner als dieselben der Phosphofruktokinase. Der Vergleich der Messung des intrazellulären ATP-Gehaltes mittels Chemilumineszenz- und HPLC-Methode zeigte eine gute Übereinstimmung. Diese Ergebnisse wurden für die Konzentration 100 µg/ml CSC angegeben, da die HPLC-Analyse nur für ausgewählte Konzentrationen durchgeführt worden war. Der ADP-Gehalt zeigte eine Kinetik mit starker Konzentrationserhöhung im Vergleich zur Kontrolle bereits 1,5 Stunden nach Behandlungsbeginn auf 200 %. In Verrechnung mit dem verringerten ATP-Gehalt zu diesem Zeitpunkt ergab dies einen sehr deutlichen Unterschied zur Kontrolle (235 +/- 35 % ADP/ATP bzw. 43 +/- 6 % ATP/ADP). In den folgenden Stunden sank dieser Wert nahezu auf das Niveau der Kontrolle (133 +/- 8 % ADP/ATP). Die Ergebnisse der Analyse der G6PDH-Enzyme zeigte eine leichte Aktivitätserhöhung nach 24 Stunden. Das Verhältnis der Aktivität der G6PDH zur Summe aus G6PDH und 6PGDH blieb über den untersuchten Zeitraum konstant.

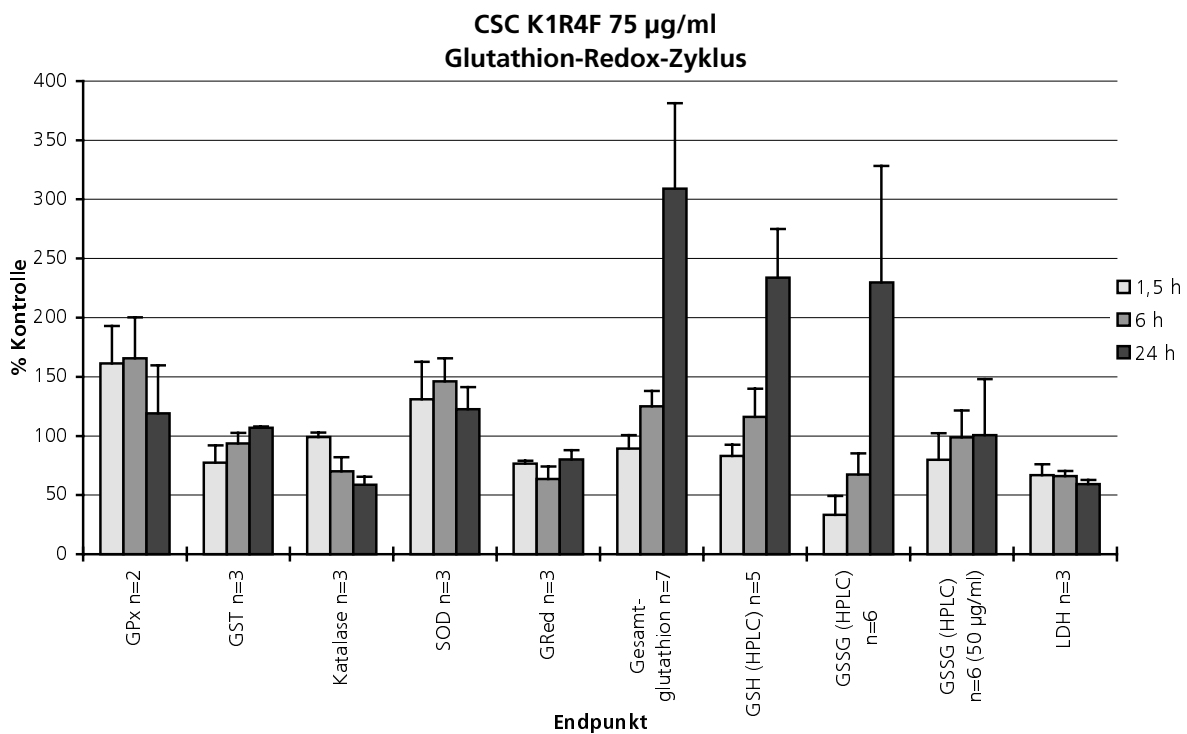


Abb. 3.71 Exposition gegen 75 µg/ml CSC K1R4F. Glutathion-Redox-Zyklus

Die Messungen in Verbindung mit dem Glutathion-Redox-Zyklus ergaben deutlich verschiedene Charakteristika der kinetischen und quantitativen Veränderungen der untersuchten Endpunkte. Für die Glutathion-Peroxidase und die Superoxid-Dismutase wurden maximale Aktivitätserhöhungen im Bereich von 150 % der Kontrolle zum Zeitpunkt 6 Stunden gefunden. Die Glutathion-S-Transferase zeigte zunächst eine Aktivitätsverringering, die sich bis zum Zeitpunkt 24 Stunden gegenüber der Kontrolle nivellierte. Die Katalase-Aktivität fiel hingegen zeitabhängig. Die Glutathion-Reduktase wurde zeitunabhängig inhibiert. Die LDH-Freisetzung war, nahezu zeitunabhängig, deutlich geringer als in unbehandelten Kontrollzellen. Die größten Veränderungen gegenüber der Kontrolle wurden jedoch beim Glutathion detektiert. Zum Zeitpunkt 1,5 Stunden fand eine Konzentrationsverringering statt, die in eine überdeutliche Erhöhung des intrazellulären Gehaltes an Glutathion nach 24 Stunden überging. Dies wurde sowohl bei der Analyse des Gesamtglutathion-Gehaltes wie auch des reduzierten Glutathions mittels HPLC gefunden. Das oxidierte Glutathion zeigte ebenfalls eine solche Kinetik. Auch beim oxidierten Glutathion ergab sich ein deutlicher Unterschied der Konzentrationen 50 µg/ml und 75 µg/ml, wie durch das ebenfalls dargestellte Ergebnis für die Analyse des Gehaltes an oxidiertem Glutathion nach einer Behandlung mit 50 µg/ml CSC deutlich wird.

3.5.3 Zusammenfassung

Es wurden submerse Expositionen des Zellsystems Lk004 gegen Rauchkondensat der amerikanischen Forschungszigarette K1R4F durchgeführt. Zigarettenrauchkondensat stellt eine Lösung der Partikelphase des Rauches in DMSO dar. Die Experimente hatten zum Ziel, die Eignung eines derartigen biologischen Indikatorsystems auch für die Untersuchung komplexer Substanzgemische zu charakterisieren.

Nach Screeningexperimenten zur Erarbeitung eines geeigneten Behandlungsmodells wurden Expositionen im Konzentrationsbereich von 2,5 bis 100 µg/ml CSC in Kulturmedium bei einer konstanten DMSO Konzentration von 1 % über 24 Stunden durchgeführt. Zu Expositionszeiten von 1,5 Stunden, 6 Stunden und 24 Stunden wurden alle für das System etablierten Parameter zur Zellvitalität, dem zellulären Energiestoffwechsel und zum Glutathion-Redox-Zyklus in Konzentrations-/Wirkungskurven gemessen.

Innerhalb des untersuchten Zeit- und Konzentrationsbereiches wurde keine Zytotoxizität im Sinne bleibenden Vitalitätsverlustes detektiert. Jedoch wurden unterschiedliche Konzentrations- und Zeitabhängigkeiten der Veränderung intrazellulärer Parameter gefunden. So konnten konzentrationsabhängige Erhöhungen (z. B. SOD, Glutathion) und Verringerungen (z. B. GST, Katalase) ebenso wie zeitabhängige Konzentrationsabhängigkeiten (z. B. ATP/ADP) und zeitunabhängige Konzentrationsabhängigkeiten (Glutathion-Reduktase) intrazellulärer Parameter gemessen werden.

Die Experimente wurden jeweils in 3 oder mehr Wiederholungen ausgeführt. Die erhaltenen Schwankungsbreiten in Form der Standardabweichung lagen dabei üblicherweise in der Größenordnung um 10 % des Mittelwertes oder waren kleiner. In dem nicht toxischen Dosisbereich konnten Effekte an exponierten Zellen bis hinab zu 40 % der Kontrolle gemessen werden (ATP/ADP). Entsprechende Erhöhungen wurden bis zum Wert 300 % der Kontrolle (Gesamtglutathion) festgestellt.

3.6 Entwicklung eines Expositionsaufbaues zur Gasexposition *in vitro*

3.6.1 Strategie und Erfordernisse

Zielsetzung der in diesem Abschnitt dargestellten Arbeiten war der Entwurf und die Realisierung eines Expositionsaufbaues zur Exposition eukaryontischer Zellen *in vitro* gegen atmosphärische Gase. Im Unterschied zu den in Kapitel 3.1 beschriebenen Arbeiten sollte die Apparatur dabei grundlegende Eigenschaften für ein später zu etablierendes Verfahren zum *in vitro*-Biomonitoring der biologischen Wirkung umweltrelevanter Gase erfüllen. Das theoretische Konzept hierfür wurde in der Einleitung vorgestellt. Bedeutsam für die praktische Umsetzung dieses Konzeptes waren die folgenden Erfordernisse:

- Betrieb des Aufbaus außerhalb des Brutschrankes
- kleiner, flexibler Aufbau zur späteren Umsetzung in ein mobiles System
- inerter Aufbau hinsichtlich der chemischen Reaktivität der zu erwartenden Prüfgase
- Gastransport mit definiertem kleinen Fluß bis dicht an die Zellen
- Vermeidung direkter Gasanströmung der Zellen
- Mediumfluß unterhalb der Zellen
- vollständige Trennung von Medium- und Gasfluß
- Einsetzbarkeit des Aufbaues unter keimfreien/keimarmen Bedingungen

Als Ausgangspunkt für die Entwicklung wurde ein Zellkulturgefäß aus Vorarbeiten gewählt (vgl. Abb. 3.72). Es handelt sich dabei um eine Glaskonstruktion zur Aufnahme dreier Transwell-Inserts im 12-Well-Format. Sie gestattete die Thermostatisierung der Inserts durch Erwärmung mit temperiertem Wasser und die Zufuhr von Kulturmedium unter Variation des Mediumspiegels. Der Betrieb dieses Aufbaues war für die Verwendung von Transwells mit mikroporöser Membran der Porengröße 3,0 µm vorgesehen. Mit diesen Eigenschaften erfüllte die Glaskonstruktion die Erfordernisse

einer grundsätzlich möglichen Mobilität und des keimarmen Arbeitens aufgrund des autoklavierbaren Materials. Als ungeeignet stellte sich der Betrieb mit Membranen der vorgesehenen Porengröße von $3,0\ \mu\text{m}$ aufgrund derer hohen Flüssigkeitsdurchlässigkeit dar. Ebenso ungeeignet war die vorhandene Mediumführung, die den Betrieb mit einem Mediumfluß nicht ermöglichte. Eine Heranführung des Gases an die Zellen wurde ebenfalls nicht unterstützt.

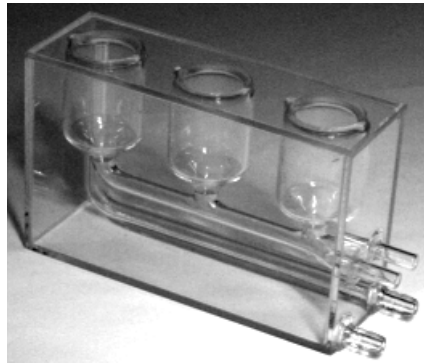


Abb. 3.72 Zellkulturgefäß als Ausgangspunkt der Entwicklung

Damit stellten sich für den Neuentwurf eines Aufbaues folgende Aufgaben.

- Entwicklung eines Gesamtaufbaues unter Berücksichtigung der Verwendung von Gas- und Mediumströmen und Einbindung der Expositionsapparatur
- Entwicklung einer Konstruktion zur kontrollierten und definierten Gasführung an die zu exponierenden Zellen (Expositionsapparatur-Oberteil)
- Neuentwicklung der beschriebenen Glaskonstruktion zum Betrieb mit kleinporigen Membranen und Kulturmediumfluß (Expositionsapparatur-Unterteil)

3.6.2 Entwicklung des Gesamtaufbaus

Die Zielsetzung der Arbeit mit nativen Gasmischungen setzte die Möglichkeit einer Gas-Probenahme voraus. Das bedeutete für den Aufbau, daß nicht mit einem Gastransport durch Überdruck des Prüfgases wie etwa aus einer Druckgasflasche gearbeitet werden konnte. Das Prüfgas mußte durch ein Unterdrucksystem zu den Zellen transportiert werden. Weiterhin mußten die Thermostatisierung der Expositionsapparatur durch temperiertes Wasser und der geplante Mediumfluß unterstützt werden. Diesen Anforderungen gerecht werdend, wurde der folgende Aufbau entworfen.

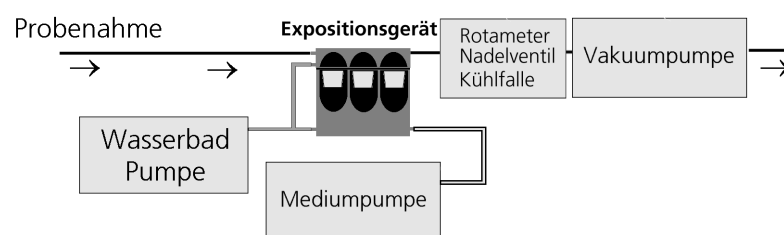


Abb. 3.73 Gesamtaufbau zur Gasexposition mit getrenntem Gas- und Mediumfluß sowie Thermostatisierung des Expositionsaufbaues

Ein Wasserbad mit Pumpe wurde zur Förderung des temperierten Wassers durch die Expositionsapparatur in den Aufbau integriert. Der Mediumfluß wurde durch eine peristaltische Pumpe sichergestellt. Das Prüfgas wurde unter Kontrolle seines Flusses durch Rotameter und Nadelventil mit einer Membranpumpe aus der Probe über die Zellen gezogen. Sämtliche Komponenten mit Gaskontakt wurden aus den Materialien Teflon oder Glas hergestellt. Alle mediumführenden Komponenten waren autoklavierbar oder mit Ethanol keimarm zu halten.

3.6.3 Entwicklung eines Expositionsapparatur-Oberteiles

Im Mittelpunkt der Entwicklung des Oberteiles der Expositionsapparatur zur Heranführung des Gasgemisches an die Zellen standen drei Schwerpunkte.

- Verbindung Oberteil/Unterteil
Der Betrieb der Expositionsapparatur bei Gastransport im Unterdruckverfahren zwang zum Einsatz einer Verbindung, die eine vollständige Dichtigkeit des Gasweges sicherte. Andererseits mußte die Verbindung leicht zu öffnen und zu schließen sein, um eine praktikable Arbeitsweise zu zulassen.
- Gasverteilung
Die drei zu exponierenden Transwells in der linearen Anordnung der als Vorlage dienenden Glaskonstruktion mußten gleichmäßig mit Prüfgas versorgt werden, um gleiche Konditionen für die parallel zu exponierenden Zellen zu gewährleisten. Eine gleichmäßige Gasverteilung mußte durch Aufteilung des Probegasstromes in drei Teilströme erreicht werden. Diese Aufteilung konnte aufgrund der ungeraden Anzahl der Teilströme und der linearen Anordnung der Transwells nicht in einer einfachen Verwendung von Y-Trennungen bestehen, da dann aufgrund unterschiedlicher Wegstrecken verschiedene Strömungswiderstände für die drei Teilströme entstanden wären. Da jeder Teilstrom aber durch eine gleichgroße Kraft bewegt wurde, hätte dieses Konzept die Aufteilung des Gases in drei Teilströme mit unterschiedlichen Volumenflüssen bedeutet. Die Transwells wären demzufolge mit unterschiedlichen Gasströmen versorgt und die Zellen entsprechend unter unterschiedlichen Konditionen exponiert worden. Es wurden verschiedene Konzepte zur Entwicklung eines Aufsatzes für die Glaskonstruktion entwickelt, die diesen Anforderungen gerecht werden sollten.
 - Gasverteilung durch Strömungsführung
 - Gasverteilung mit Drosselblenden
 - Gasverteilung mit Kapillaren
 - Gasverteilung durch kalibrierte Bohrungen

Zusätzlich wurde der Aufsatz zur Sicherstellung einer qualitativ guten Gleichverteilung auch über einen längeren Zeitraum so konstruiert, daß der Einfluß von Kondensationseffekten verhindert wurde.

- Einlaßbrohre

Das Expositionsgas sollte aus dem Geräteoberteil möglichst ohne direkte Anströmung dicht an die Zellen herangeführt werden. Zu diesem Zweck wurden Einlaßbrohre verwendet, die in verschiedenen Längen und Geometrien erprobt wurden.

3.6.3.1 Verbindung Oberteil/Unterteil

Es wurde eine Konstruktion entworfen, welche aus einer durchbohrten Glasplatte und einem gläsernen Gasleitungssystem bestand. Die Verbindung zum Geräteunterteil wurde durch O-Ringe mit V-förmigem Querschnitt aus Silikon abgedichtet (vgl. Abb. 3.74, Abb. 3.76, Abb. 3.79, Abb. 3.81). Am Unterteil wurden 90° Winkel aus Aluminium angebracht, die eine sichere Positionierung des Aufsatzes zuließen. Der Aufsatz wurde mit Edelstahlspiralen an das Unterteil gepreßt. Die Dichtigkeit der Verbindung wurde durch Flußmessungen und Durchleitung von Wasser überprüft. Sie erwies sich als sehr zuverlässig. Die Fixierung des Oberteils auf dem Unterteil durch Spannung der Metallspiralen erwies sich als eine praktikable und ebenso zuverlässige Lösung. (Gesamtbild vgl. Abb. 3.86).

3.6.3.2 Gasverteilung, -einlaß, und -wiederfindung

Konzept 1: Gasverteilung durch Strömungsführung

Eine gleichmäßige Strömungsverteilung sollte hier durch eine spezielle Strömungsführung erreicht werden. Die Glasrohre zum Gasantransport und zur Gasableitung wurden gegensinnig angeordnet. Dies geschah derart, daß der Strömungsweg zur Anströmung für das erste Transwell am kürzesten war, der dazugehörige Strömungsweg zur Gasabführung hingegen am längsten. Auf diese Weise sollten *in summa* für alle drei Transwell-Plätze gleichlange Strömungswege und damit gleiche Strömungswiderstände und Volumenströme erreicht werden.



Abb. 3.74 Aufsatz zur Gasverteilung nach Konzept 1 - Gasverteilung durch Strömungsführung. Strömungswege zur Anströmung (schwarz) und zum Abtransport des Gases (weiß) sind gegensinnig angeordnet.

Die Qualität der Strömungsverteilung wurde durch Verwendung von Ozon als Modellgas und Detektion des Ozons mittels einer kolorimetrischen Messung im Transwell überprüft.

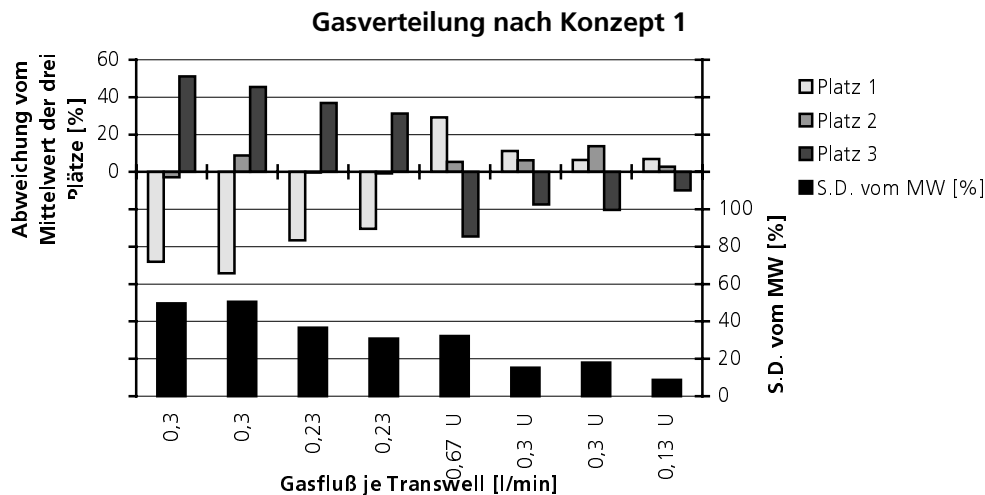


Abb. 3.75 Messung der Strömungsverteilung nach Konzept 1 - Gasverteilung durch Strömungsführung
 Bedingungen: Messung des Ozons im Testgas (Ozon in synth. Luft) mit Ozonreagenz im Transwell. Meßzeit
 5 Minuten bei variiertem Gasfluß. U: umgekehrte Strömungsrichtung (Teflonrohr als Auslaß, vgl. Abb. 3.74)

Es wurden acht Messungen unter verschiedenen Strömungsbedingungen durchgeführt. Im oberen Teil der Abb. 3.75 wurden die Abweichungen der Einzelplätze vom Mittelwert der drei Plätze aufgetragen. Im unteren Teil der Abbildung ist die Standardabweichung der Meßwerte für die drei Transwells relativ zum Mittelwert der drei Meßwerte als Maß für die Schwankungsbreite der Gasverteilung dargestellt. Bei vier der Messungen wurde das Testgas Ozon in vorgesehener Strömungsrichtung durch das Expositionsgerät geleitet, bei den restlichen in umgekehrter Richtung (Teflonrohr als Auslaß). Die Ergebnisse zeigen unabhängig von den Strömungsbedingungen starke systematische Ungleichverteilungen des Gasstromes über die drei Transwells in der Größenordnung von 30 %. Die Art der Systematik war jedoch mit jedem einzelnen Aufsatz verbunden, nicht mit dem Funktionsprinzip. So zeigte ein weiterer, parallel gefertigter Aufsatz ebenfalls systematische Schwankungen, diese aber in anderer Weise. Dort war Platz 2 (Mitte) stets derjenige, an dem der höchste Ozonumsatz gemessen wurde. Es wurde daraus gefolgert, daß bei der glastechnischen Verarbeitung herstellungsbedingte Ungleichheiten in den Rohrgeometrien entstanden waren, welche die Strömungswiderstände wesentlich und unvorhersehbar verändert hatten. Nachbesserungen aufgrund optischer Eindrücke brachten keine prinzipielle Verbesserung.

Konzept 2: Gasverteilung durch Einsatz von Drosselscheiben

Strömt ein Gas durch eine Öffnung, die im Verhältnis zum umliegenden Strömungsquerschnitt klein ist, so wird sein Strömungsverhalten mit steigendem Volumenstrom zunehmend durch Stoffeigenschaften des Gases wie Viskosität, Dichte und Temperatur, sowie durch den Durchmesser der Öffnung bestimmt. Seine Abhängigkeit von Reibungswiderständen im davor liegenden und folgenden Rohrabschnitt und von der Höhe des angelegten negativen Druckes wird dabei kleiner. Im Grenzfall geht diese Abhängigkeit vollständig verloren und man kommt zu dem Prinzip einer kritischen Düse.

Zur Erzeugung derartiger Verhältnisse wurden Lochscheiben aus Teflon in die Konstruktion nach Konzept 1 eingesetzt, in die Löcher verschiedenen Durchmessers gebohrt wurden. Das Konzept der Verteilung des Gases durch gegensinnige Anordnung von an- und abfließenden Strömen wurde dabei beibehalten.

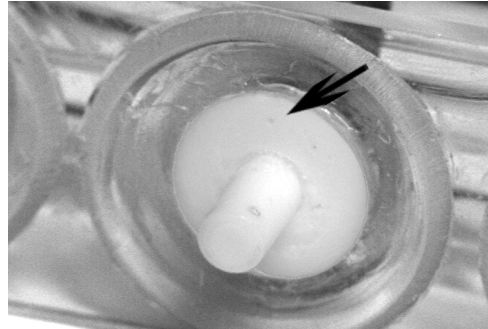


Abb. 3.76 Aufsatz zur Gasverteilung nach Konzept 2 - Gasverteilung durch Drosselscheiben aus Teflon

Die Untersuchung der Gasverteilung über die drei Transwell-Plätze eines Expositionsmoduls für ein Loch der Größe 0,5 mm brachte das folgende Ergebnis.

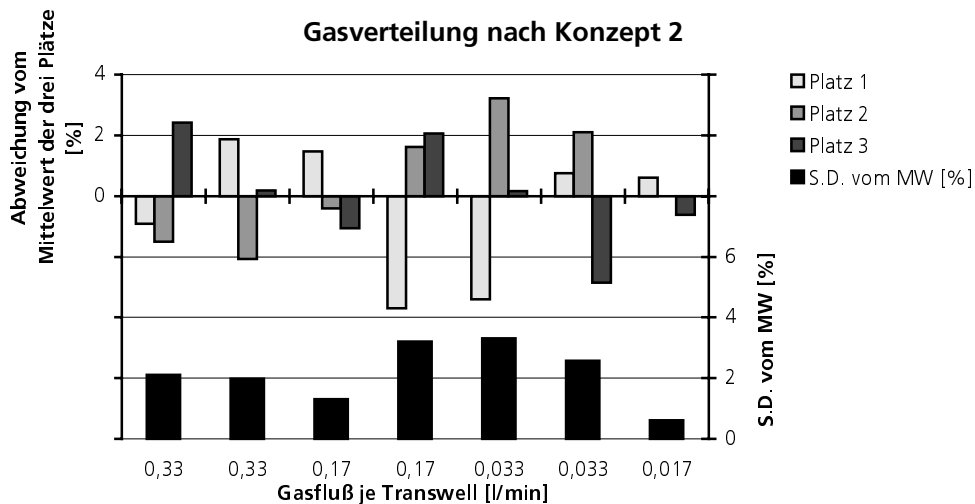


Abb. 3.77 Messung der Strömungsverteilung nach Konzept 2 - Gasverteilung durch Drosselscheiben aus Teflon Bedingungen: Messung des Ozons im Testgas (Ozon in synth. Luft) mit Ozonreagenz im Transwell. Meßzeit 5 Minuten bei variiertem Gasfluß, Lochdurchmesser 0,5 mm

Die Ergebnisse aus sieben Messungen unter verschiedenen Strömungsbedingungen zeigten Einzelabweichungen der Plätze vom Mittelwert der Plätze und Schwankungsbreiten in der Größenordnung von 2-3 %. Die nur sehr kleinen Schwankungen ließen keine Systematik erkennen, sondern schienen zufällig zu sein. Derartige Messungen wurden für verschiedene Lochdurchmesser und Volumenströme durchgeführt. Die Ergebnisse werden in der folgenden Abbildung zusammengefaßt.

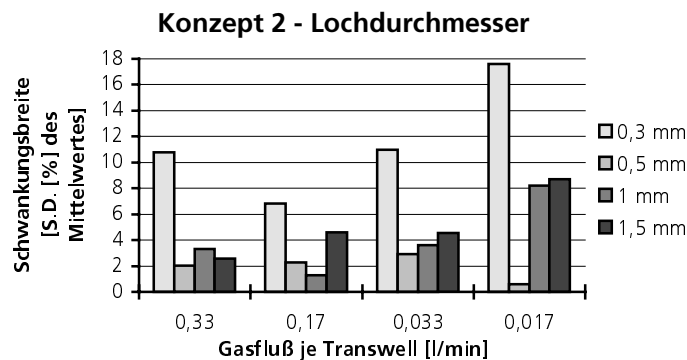


Abb. 3.78 Strömungsverteilung nach Konzept 2 - Einfluß von Lochdurchmesser und Strömungsgeschwindigkeit auf die Gasverteilung. Zusammenstellung von Ergebnissen aus Messungen entspr. Abb. 3.77 für die Lochdurchmesser 0,3/0,5/1,0 und 1,5 mm.

Die Daten zeigen die geringsten Schwankungsbreiten für den Lochdurchmesser von 0,5 mm. Im Umgang mit derartig modifizierten Aufsätzen wurde indes offenkundig, daß die Löcher in den Tefloneinsätzen sehr empfindlich gegen mechanische Schäden waren. Durch kleine Veränderungen der Lochgeometrie und geringste Vermutungen wie partikuläre Bestandteile im Probegas wurde sofort die Qualität der Gasgleichverteilung deutlich negativ beeinflusst. Ebenso problematisch war die Gewährleistung einer vollständigen Dichtigkeit des Tefloneinsatzes insbesondere bei den Lochgrößen 0,3 mm und 0,5 mm, da hier schon bei kleinen Volumenströmen hohe Druckabfälle präsent waren. Das Prinzip einer derartigen Gasverteilung erwies sich somit als erfolgversprechend, in dieser Form der Realisation aber nicht als praxistauglich.

Konzept 3: Gasverteilung durch Edelstahlkapillaren

Einem dem Konzept 2 ähnlichen Funktionsmodell folgend, wurde eine praxistauglichere experimentelle Lösung durch die Verwendung von Edelstahlkapillaren gesucht. Es wurden Aufsätze entworfen, welche eine durchgehende Grundplatte mit einem Loch zum Einstecken des weiterhin wechselbaren Einleitungsrohres sowie eine konische Bohrung aufwiesen. In die konische Bohrung wurde, mittels einer Teflonhülle abgedichtet, eine Edelstahlkapillare mit einem Innendurchmesser von 0,5 mm und einer Länge von ca. 10 mm eingelassen (Abb. 3.79).

Die einzelnen Edelstahlkapillaren wurden durch Anpassung von Länge und Geometrie der Rohrenden auf gleiche strömungstechnische Eigenschaften geeicht. Die Kalibrierung fand durch Messung des durch die Kapillare erzeugten Druckabfalls in einem Volumenstrom von 10 l/min statt.

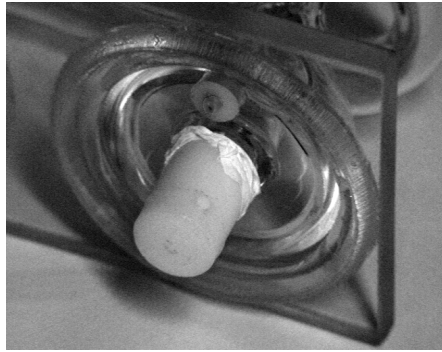


Abb. 3.79 Aufsatz zur Gasverteilung nach Konzept 3 - Gasverteilung durch Edelstahlkapillaren

Auch hier wurde die Verteilung des Testgases über die exponierten Transwells experimentell überprüft.

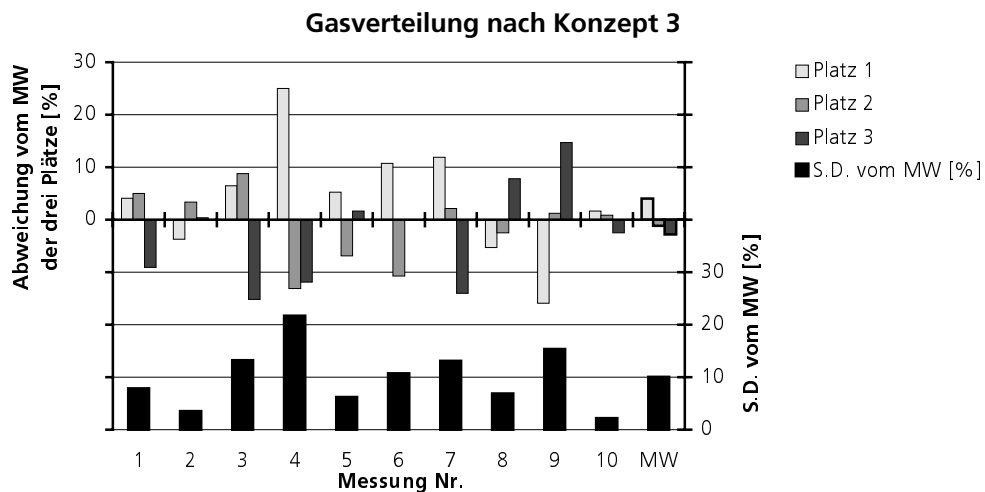


Abb. 3.80 Messung der Strömungsverteilung nach Konzept 3 - Gasverteilung durch Edelstahlkapillaren. Bedingungen: Messung des Ozons im Testgas (Ozon in synth. Luft) mit Ozonreagenz im Transwell. Meßzeit 5 Minuten, Gasfluß 8,3 ml/min je Transwell, 10 unabhängige Messungen, MW = Mittelwert der Messungen

Die Ergebnisse von 10 Meßwiederholungen ließen hohe, unsystematische Schwankungen in der Gasverteilung über drei parallel exponierte Transwells erkennen. Die Schwankungsbreiten lagen mit Werten von 4 bis 20 % deutlich über denen, welche mit durchbohrten Teflonscheiben erreicht wurden. Dies galt ebenso für den Mittelwert der 10 Messungen (10 % Schwankungsbreite).

Konzept 4: Gasverteilung durch kalibrierte Bohrungen

Aufgrund der mit Teflonscheiben und Edelstahlkapillaren erhaltenen Meßergebnisse wurde dieses Konzept als Funktionsprinzip zur gleichmäßigen Dreiteilung des Probegasvolumenstromes aufgegeben. Es wurden nun Teflonhülsen mit Bohrungen des Durchmessers 1,5 mm in die Glaskonstruktion des Konzeptes 3 eingesetzt (Abb. 3.81).

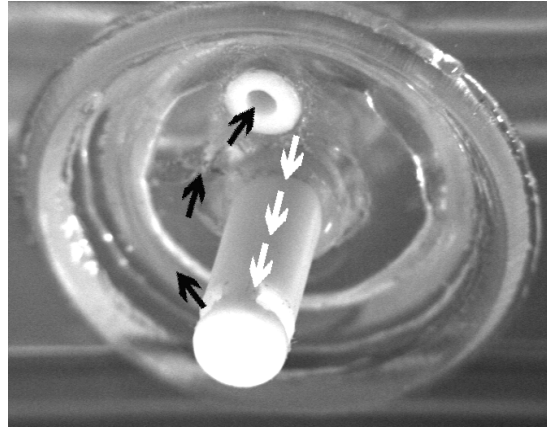


Abb. 3.81 Aufsatz zur Gasverteilung nach Konzept 4 - Gasverteilung durch kalibrierte Bohrungen in Tefloneinsätzen

Mit Stickstoffdioxid und dem Saltzman-Reagenz als kolorimetrisches Meßreagenz für NO_2 wurde die Gasverteilung in den Transwells überprüft. Die Größe der Bohrungen in den Teflonhülsen wurden den Meßergebnissen entsprechend für jeden Expositionsplatz individuell korrigiert. Nach Abschluß der Kalibrierung wurden bei der Überprüfung der Gleichverteilung die folgenden Resultate erhalten.

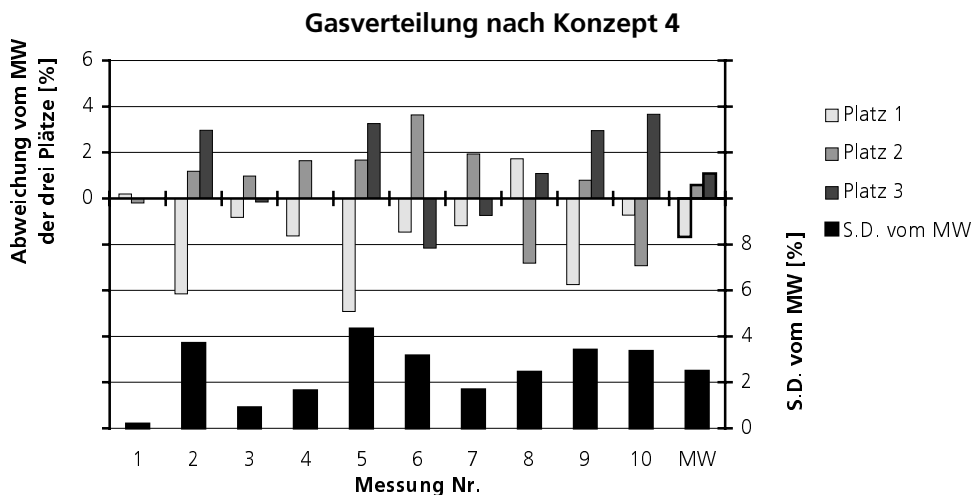


Abb. 3.82 Messung der Strömungsverteilung nach Konzept 4 - Gasverteilung durch kalibrierte Bohrungen in Tefloneinsätzen. *Bedingungen:* Messung des NO_2 im Testgas (NO_2 in synth. Luft) nach Saltzman im Transwell. Meßzeit 5 Minuten, Gasfluß 8,3 ml/min je Transwell, 10 unabhängige Messungen, MW = Mittelwert der Messungen

Die Ergebnisse dokumentieren im Mittel von zehn Messungen eine Einzelabweichung der Plätze von Mittelwert von weniger als 2 %, Schwankungsbreiten von weniger als 3 % und innerhalb der 10 unabhängigen Messungen keine Einzelmessung mit einer Abweichung oder Schwankung von mehr als 5 %. Aufgrund der Größe der Bohrungen (ca. 1,5 - 2 mm Durchmesser) erwiesen sie sich trotz des weichen Materials Teflon auch in der praktischen Anwendung als robust. Daher wurde diese experimentelle Lösung für alle weiteren Untersuchungen verwendet.

Gasverteilung - Vermeidung von Kondensation

Es wurde festgestellt, daß bei der Exposition von Zellen im Rohrleitungssystem des gasführenden Oberteils Kondensationswasser auftrat. Dieses Wasser bewirkte durch Veränderung der inneren Querschnitte der kalibrierten Bohrungen und des sonstigen Leitungssystems Veränderungen der strömungstechnischen Eigenschaften und damit eine Verschlechterung der Gasverteilung. Das Oberteil wurde deshalb mit einem Glasmantel versehen, der eine Beheizung mittels temperierten Wassers zuließ (vgl. Abb. 3.86). Das Oberteil wurde dafür an den Wasserauslaß der Unterteils angeschlossen, so daß keine weitere Warmwasserquelle benötigt wurde. Durch die Thermostatisierung des Oberteils konnte die Abscheidung von Kondenswasser darin vollständig verhindert werden.

Einlaßrohre

Zur Realisation einer möglichst dichten Heranführung der Expositionsgasmischung an die Zellen unter Vermeidung einer direkten Anströmung wurden ebenfalls verschiedene Konzepte erprobt. Es wurden gerade Teflonhülsen verwendet (vgl. Abb. 3.74) und am Einlaßende verschlossene Teflonhülsen mit seitlichen Löchern im Durchmesser 1 mm (vgl. Abb. 3.76, Abb. 3.79). Am günstigsten erwiesen sich am Einlaßende verschlossene Teflonhülsen mit großen seitlichen Auslässen (vgl. Abb. 3.81). Sie wurden in ihrer Länge so abgestimmt, daß sie ca. 2 mm über der Transwell Membran endeten. Auf diese Art war gleichzeitig eine hohe Sicherheit gegen Berührung der Membran durch das Einlaßrohr und eine dichte Heranführung des Gases an die Zellen gegeben.

Quantifizierung der Gaswiederfindung auf der Kulturmembran

Zum Nachweis des Kontaktes des Prüf gases mit der Kulturmembran wurden Messungen mit Stickstoffdioxid und der kolorimetrischen Analytik nach Saltzman durchgeführt.

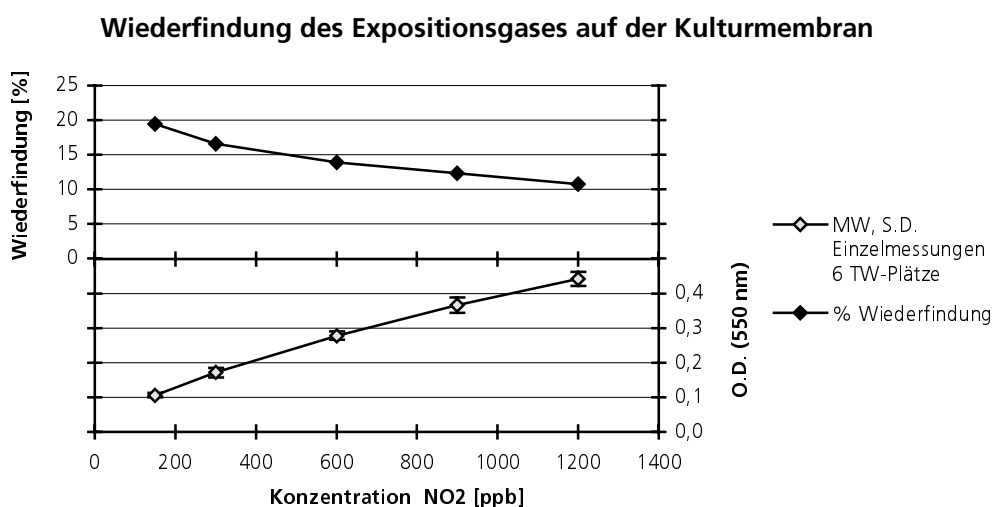


Abb. 3.83 Messung der Wiederfindung des Expositionsgases auf der Kulturmembran. Bedingungen: Meßzeit jeweils 30 Minuten, Konzentration NO₂ in synth. Luft wie angegeben, je Konzentration 6 parallele Einzelmessungen in 2 Expositionsgeräten, Volumenstrom 25 ml/min (je Expositionsgerät)

Es wurde hier, wie in allen weiteren Experimenten, die Konstruktion nach Konzept 4 mit Teflon-Gaseinleitung mit seitlichen Auslässen verwendet. Unter Bedingungen, welche denen der Zellexposition hinsichtlich Volumenstrom und Expositionszeit näherungsweise entsprachen, wurde Prüfgas mit verschiedenen Konzentrationen Stickstoffdioxid durch die Expositionsmodule geleitet und das NO_2 durch kolorimetrische Analyse auf der Membran gemessen.

Die Ergebnisse der Absorptionsmessungen mittels Saltzman Reagenz wurden über eine Eichreihe mit Natrium-Nitrit auf die entsprechenden Stickstoffdioxid-Konzentrationen umgerechnet. Dieses Ergebnis wurde mit dem theoretischen Meßergebnis bei vollständigem Umsatz des durch die Expositionsapparatur geleiteten Stickstoffdioxids verglichen. Aus diesen beiden Werten wurde die prozentuale Wiederfindung errechnet.

3.6.4 Neuentwicklung eines Expositionsapparatur-Unterteiles

Die Neugestaltung der als Ausgangspunkt der Entwicklung gewählten Glaskonstruktion sollte einen Einsatz von Transwell-Inserts mit Mediumfluß gewährleisten. Gleichzeitig sollte eine vollständige Trennung von Gas- und Mediumstrom erfolgen, eine hohe Sicherheit gegen Austrocknen der Membran durch eine Fehlfunktion gegeben sein, eine Rückvermischung von altem mit frischem Medium ausgeschlossen werden und ein gleichmäßiger Mediumtausch für alle drei Transwells einer Glaskonstruktion stattfinden.

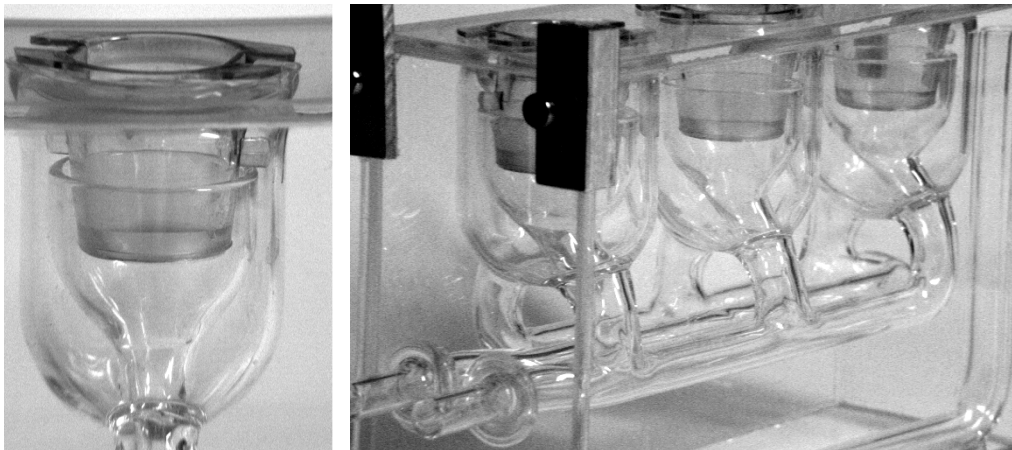


Abb. 3.84 Neukonstruktion eines gläsernen Unterteils zur Exposition von drei Transwells im 12-Well-Format gegen Gase. links - einzelner Transwell Einsatz, rechts - Rohrsystem zur Mediumleitung

Die erarbeitete experimentelle Lösung sah eine Aufnahmeeinheit für jedes der drei Transwells aus zwei ineinander gefügten Glasnäpfen vor. Das Kulturmedium wurde von unten in den inneren Behälter geführt, floß von dort am Transwell vorbei über den Rand dieses Behälters, um von außen wiederum abgepumpt zu werden. Drei dieser Behälter waren über ein Rohrsystem innerhalb einer Expositionsapparatur miteinander verbunden. Entsprechend der Konstruktion der Gasleitung im Oberteil des Expositionsgerätes wurde der Fluß zu seiner gleichmäßigen Verteilung auch hier

gegenseitig an- und abgeführt. Durch eine Schlauchpumpe wurde das Medium sowohl in das Gerät gepumpt, als auch daraus abgezogen. Eine qualitativ gleichmäßige Verteilung des Kulturmediumflusses auf die drei Transwells wurde durch Testläufe mit Wasser und Farbstofflösungen nachgewiesen.

Die Überschichtung der Zellen mit Kulturmedium in einem Gasexpositionssystem ist ein Parameter, der wesentlichen Einfluß auf den Vitalitätserhalt und die Sensitivität des biologischen Testsystems hat (vgl. Kapitel 3.7). Es sollte versucht werden, Einfluß auf den auch im air/liquid-System verbleibenden Flüssigkeitsfilm über dem Zellrasen zu nehmen. Dazu sollte untersucht werden, die Dicke des überschichtenden Filmes durch den hydrostatischen Druck des Kulturmediums unterhalb der Membran zu beeinflussen. Da dieser Druck der Eintauchtiefe des Transwell-Inserts in das Kulturmedium proportional ist (vgl. Diskussion, Kapitel 4.2.1.4), wurde der Aufbau so verändert, daß der Parameter reproduzierbar in einem großen Bereich eingestellt werden konnte.

Zur Arbeit mit verschiedenen hohen Mediumständen außerhalb des Transwells wurde die Konstruktion daher um je zwei Silikonbänder pro Transwell Einsatz erweitert, welche in dem Raum zwischen innerem und äußeren Glasnapf saßen.

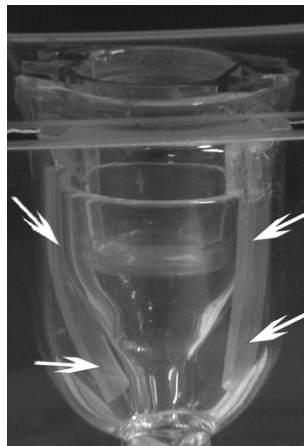


Abb. 3.85 Neukonstruktion eines gläsernen Unterteils zur Exposition von drei Transwells im 12-Well-Format gegen Gase. Erweiterung zur Arbeit mit verschiedenen hohen Mediumständen

Die Silikoneinsätze schafften eine Kriechstrecke zum gleichmäßigen Abfluß des Kulturmediums. Auf diese Weise konnte mit verschiedenen Mediumständen außerhalb des Transwells gearbeitet werden. In Gasexpositionen (vgl. Kapitel 3.7) wurden die Effekte folgender Mediumstände außerhalb des Transwells erprobt.

- Mediumstand hoch:
der Mediumspiegel außerhalb des Transwells lag deutlich oberhalb des Randes des inneren Glasnapfes.
- Mediumstand mittel:
der Mediumspiegel lag leicht unterhalb des Randes des Inneren Glasgefäßes.

Bei beiden Expositionsmodi wurde ohne Mediumfluß gearbeitet. Der Betrieb mit Mediumfluß war im neu entwickelten Expositionsgerät bei diesen Mediumständen

möglich. Die Expositionen fanden wahlweise im neu entwickelten Expositionsgerät-Unterteil oder in der ursprünglichen Glaskonstruktion unter Einsatz von Transwell-Inserts mit Membranen der Porengröße 0,4 µm statt.

- Mediumstand tief:
der Mediumspiegel lag deutlich unterhalb des Höhenniveaus der Transwell-Membran.

Durch die Konstruktion mit innerem und äußeren Napf und Silikoneinsätzen war auch bei diesem Mediumspiegel eine Benetzung der Transwell-Membran von unten sichergestellt. Expositionen nach diesem Konzept wurden ausschließlich mit Mediumfluß im neu entwickelten Expositionsgerät durchgeführt.

3.6.5 Gesamtansicht des neu entwickelten Expositionsgerätes

In der Gesamtansicht stellte sich die Expositionsapparatur wie folgt dar.

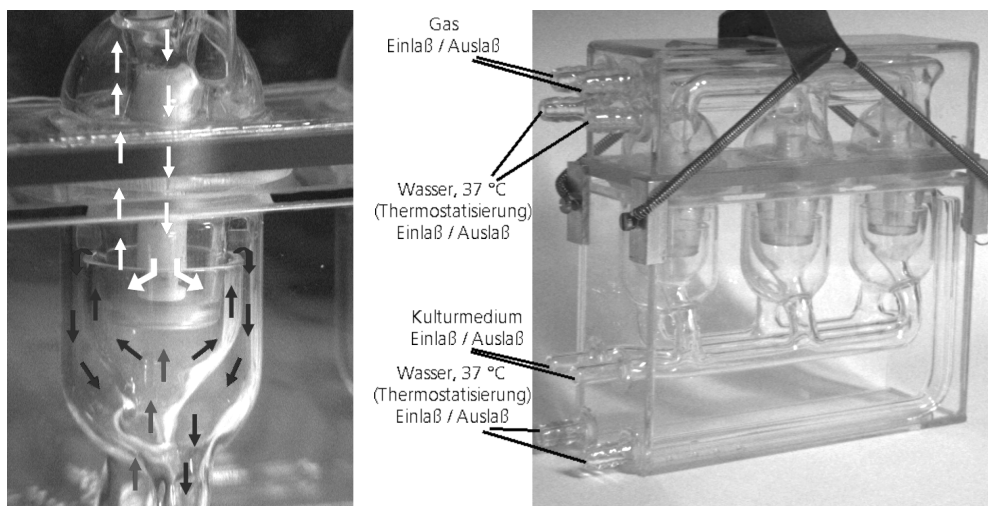


Abb. 3.86 Neuentwurf einer Expositionsapparatur zur brutschrankunabhängigen Exposition von eukaryontischen Zellen gegen Gase *in vitro*. links - Transwell Einsatz mit Mediumstrom (schwarz) und Gasstrom (weiß), rechts - Gesamtansicht Oberteil und Unterteil. Ungefähre Ausmaße (b x h x t): 12,5 cm x 10,5 cm x 5 cm

3.6.6 Zusammenfassung

Es wurde eine Expositionsapparatur zur Untersuchung von atmosphärischen Gasen *in vitro* entworfen und realisiert. Grundlage hierfür war das in der Einleitung vorgestellte Konzept für einen Aufbau unter Einhaltung der Randbedingungen, die für den Expositionsvorgang von Seiten des Zellsystems und des Gases gestellt werden.

Das entwickelte Expositionsgerät unterstützte eine brutschrankferne Exposition. Es handelte sich um eine kleine Apparatur, die vollständig aus chemisch inerten Materialien aufgebaut war und in der parallel Zellaussaaten in drei Transwells im 12-Well-Format exponiert werden konnten.

Durch Unterdruckbetrieb war eine Gasprobenahme aus drucklosen Gasmischungen möglich. Es wurde ausführlich mit verschiedenen Konzepten experimentiert, um eine gleichmäßige Versorgung der drei Transwell-Inserts mit Probegas zu gewährleisten. Die letztlich gewählte experimentelle Lösung erreichte eine Ungleichverteilung über die Inserts von weniger als 5 %. Das Probegas wurde durch ein Leitungssystem bis auf eine sehr kurze Distanz an die Membran des Inserts transportiert und trat dort ohne direkte Anströmung derselben aus. Der Kontakt der Membranoberfläche mit dem Probegas wurde in Modellmessungen nachgewiesen.

Zur Zelleexposition war der Betrieb mit mikroporösen Membranen der Porengröße 0,4 µm vorgesehen. Die Einstellung verschieden hoher Mediumständen außerhalb der Transwell-Inserts war zur Beeinflussung des Mikroklimas um die Zellen möglich. Unabhängig davon konnte ein Mediumfluß angelegt werden, durch den alle drei Transwells ohne Rückvermischung von „frischem“ und „altem“ Medium versorgt werden. Ein Kontakt des Kulturmediums mit dem Probegas konnte nur in vernachlässigbarer Größenordnung stattfinden und war bei Anliegen eines Mediumflusses vor dem Zellkontakt des Mediums völlig auszuschließen. Unabhängig von der Höhe des Mediumstandes war eine hohe Sicherheit gegen den Verlust des Mediumkontaktes mit der Membran und damit gegen die Gefahr des Austrocknens der Zellen gegeben.

3.7 Expositionen gegen Modellgase im neu entwickelten Aufbau

Es wurden Expositionen von eukaryontischen Kulturzellen im neu entwickelten Expositionsaufbau durchgeführt. Die Strategie der Experimente zielte darauf, die Effekte denkbarer Einflußgrößen auf den Expositionsverlauf getrennt zu erfassen. Die untersuchten Einflußgrößen waren:

- die Umstellung der submers Kultur auf air/liquid-Bedingungen ohne Gasstrom
- die CO₂-Konzentration in der Gasphase über Zellen einer air/liquid-Kultur
- die Expositionszeit
- die Größe des Gasflusses über Zellen einer air/liquid-Kultur
- die Höhe des Mediumstandes außerhalb der Transwells

Zur Trennung der Einzeleffekte wurde dazu nach folgender Strategie vorgegangen:

Kategorie	Expositionsart	untersuchte Effekte
Expositionen ohne Gasfluß	<u>submers</u>	– Kulturdauer
	<u>air/liquid</u>	– Feuchte/CO ₂ – Mediumstand – Expositionszeit
Expositionen mit Gasfluß	<u>synthetische Luft</u>	– Feuchte – Flußgeschwindigkeit des Gases – Expositionszeit – Mediumstand
	<u>Ozon/Stickstoffdioxid</u>	– Gaskonzentration – Expositionszeit – Mediumstand

Zunächst wurden Zellen ohne Gasfluß im air/liquid-System exponiert. Dadurch sollten die Effekte Kulturdauer, Einfluß der Feuchte bzw. des CO₂-Gehaltes, Einfluß der Höhe des Mediumspiegels, Effekt der Expositionszeit einzeln im Vergleich zum submersen System betrachtet werden. Im nächsten Schritt wurde zur Beurteilung der Einflußgrößen Feuchte und Fließgeschwindigkeit des Gasstromes, Expositionszeit und Höhe des Mediumspiegels ein Gasfluß mit synthetischer Luft berücksichtigt. Die Exposition der Zellen gegen die Modellgase Ozon und Stickstoffdioxid wiederum sollte die Meßbarkeit von konzentrations- und zeitabhängigen Wirkungen der Gase auf das Zellsystem sowie den Einfluß des Mediumspiegels hierauf untersuchen.

Zur Validierung der Ergebnisse wurden die Experimente von der Verwendung des ausgiebig charakterisierten biologischen Indikatorsystems unter Verwendung von Lk004-Zellen auf ein weiteres Zellsystem ausgedehnt. HFBE-Zellen, deren Kultivierbarkeit unter den für Lk004-Zellen optimierten Bedingungen bereits nachgewiesen worden war (vgl. Kapitel 3.2.5), wurden dazu in die Expositionsexperimente einbezogen.

Zugunsten der Vielzahl der zu untersuchenden Einflußgrößen wurden in der Mehrzahl der Expositionen ausschließlich die Vitalitätsparameter Zellzahl und Tetrazoliumsalzumsatz analysiert. Exemplarisch wurde in ausgewählten Experimenten auch der Glutathion-Gehalt der Zellen und der Adenosinphosphat-Gehalt untersucht.

Der Zeitpunkt der Aufarbeitung der Zellen zur Analyse der Parameter orientierte sich an den durchgeführten Experimenten mit Modellsubstanzen. Demzufolge wurden an die air/liquid-Expositionen mit einer Länge von bis zu 120 Minuten 2- bis 24stündige Nachinkubationsperioden unter submersen Kulturbedingungen angeschlossen, nach deren Ablauf die Messungen durchgeführt wurden.

3.7.1 Expositionen ohne Gasfluß: submers, air/liquid

3.7.1.1 Zellsystem Lk004

Lk004-Zellen wurden auf Membranen der Porengröße 0,4 µm kultiviert und für bis zu 4 Stunden air/liquid gegen Umgebungsluft (ca. 40-50 % rH/25 °C, 0,03 % CO₂) ohne Gasfluß im Expositionsgerät exponiert. Dabei wurde der Mediumstand ruhend auf mittlerem Niveau gehalten oder im fließenden System auf niedriges Niveau abgesenkt (vgl. Kapitel 3.6.4). Nach Abschluß einer Nachinkubationsphase von 2 Stunden (submers) unter zelltypspezifischen Bedingungen wurden die Zellzahl, der Tetrazoliumsalzumsatz und der ATP-Gehalt analysiert. Im Vergleich hierzu wurden die Parameter ebenfalls nach einer air/liquid-Exposition im Brutschrank bei einem Kohlendioxidgehalt von 5 % und 95 % Feuchte bei 37 °C (zelltypspezifische Bedingungen) bestimmt. Zusätzlich fand eine Untersuchung der Parameter bei nicht exponierten eukaryontischen Zellen statt (submers).

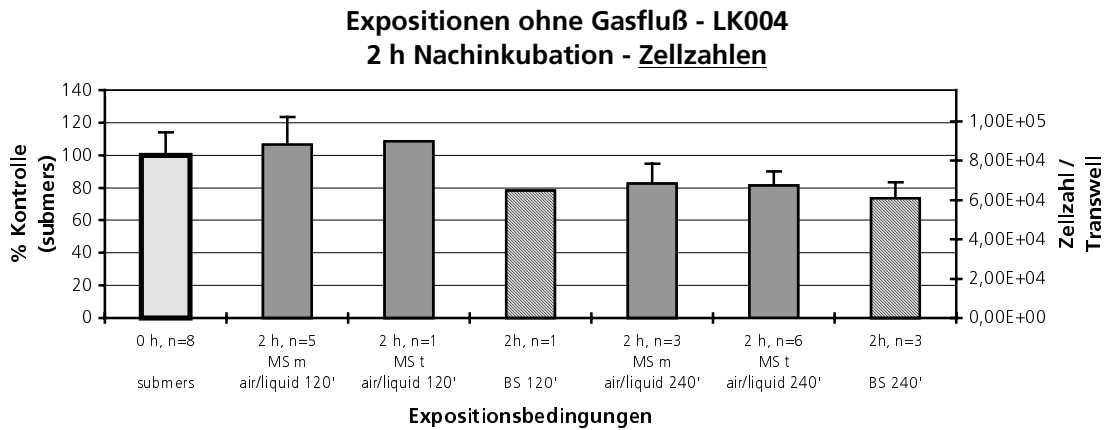


Abb. 3.87 Expositionen von Lk004-Zellen ohne Gasfluß. Bestimmung der Zellzahl nach 2stündiger postexperimenteller Nachinkubation. 120' - 2 h Exposition, 240' - 4 h Exposition, MS m - Mediumstand mittel, ruhend, MS t - Mediumstand tief, fließend, BS - Exposition air/liquid im Inkubator (5 % CO₂, 95 % rH/37 °C)

Die Ergebnisse zeigen für air/liquid-Expositionen gegen Raumluft ohne Gasfluß im Zeitraum von 2 Stunden vergleichbare Zellzahlen zu nicht-exponierten Zellen. Nach 4stündiger Exposition fiel die Zellzahl auf ca. 80 % des Wertes der submers Kontrolle. Bei der air/liquid-Exposition im Brutschrank wurde dieser Wert bereits nach 2stündiger Exposition erreicht. Er verringerte sich hier in den nächsten 2 Stunden um weitere 5 % (BS 240'). Ein Unterschied zwischen Zellen nach Exposition bei mittlerem bzw. tiefem Mediumstand wurde in diesen Messungen nicht sichtbar.

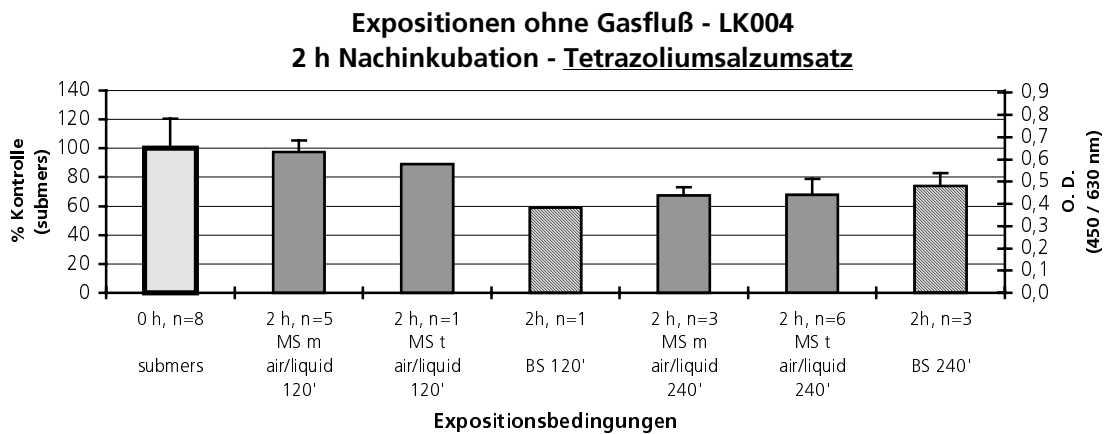


Abb. 3.88 Expositionen von Lk004-Zellen ohne Gasfluß. Bestimmung des Tetrazoliumsalzumsatzes nach 2stündiger postexperimenteller Nachinkubation. 120' - 2 h Exposition, 240' - 4 h Exposition, MS m - Mediumstand mittel, ruhend, MS t - Mediumstand tief, fließend, BS - Exposition air/liquid im Inkubator (5 % CO₂, 95 % rH/37 °C)

Die Analyse des Tetrazoliumsalzumsatzes bestätigte die Trends der Zellzahlbestimmung. Allerdings wurde hier bereits ein leichter Unterschied zwischen der Exposition bei verschiedenen Medienständen nach 120minütiger Exposition sichtbar. Diese Beobachtung - im Sinne einer höheren Belastung von Zellen, welche mit niedrigem Mediumspiegel exponiert wurden - dokumentierte sich deutlicher in der Analyse des intrazellulären ATP-Gehaltes und des ATP/ADP-Verhältnisses.

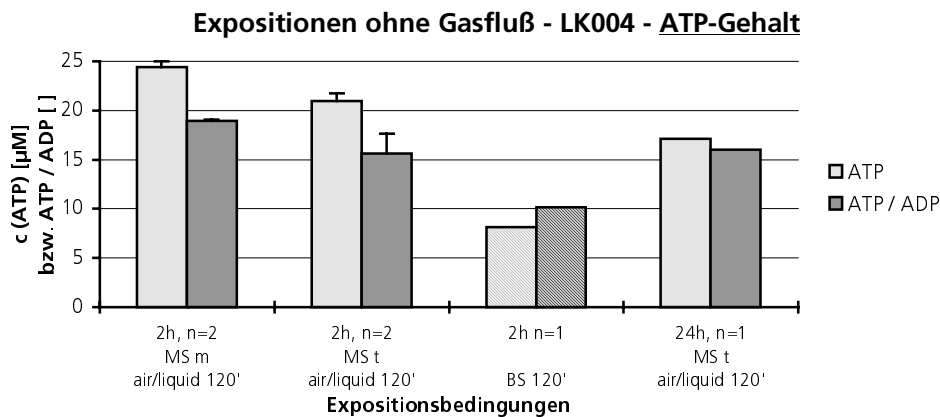


Abb. 3.89 Expositionen von Lk004-Zellen ohne Gasfluß. Bestimmung des ATP-Gehaltes und des ATP/ADP-Verhältnisses nach 2- bzw 24stündiger postexperimenteller Nachinkubation. 120' - 2 h Exposition, MS m - Mediumstand mittel, ruhend, MS t - Mediumstand tief, fließend, BS - Exposition air/liquid im Inkubator (5 % CO₂, 95 % rH/37 °C)

Im System mit fließendem, tiefem Mediumspiegel wurde ein um 14 % verringerter ATP-Gehalt und ein um 18 % verringertes ATP/ADP-Verhältnis gegenüber dem System mit mittlerem Mediumspiegel gefunden. Während der ATP-Gehalt nach einer Nachinkubationszeit von weiteren 22 Stunden wiederum um 15 % sank, blieb das ATP/ADP-Verhältnis nach dem Ergebnis der hier analysierten Stichprobe unverändert. Der ATP-Gehalt und das ATP/ADP-Verhältnis von Zellen, welche im Brutschrank air/liquid inkubiert worden waren, lag bereits nach 2stündiger Expositionszeit gefolgt von einer ebenso langen Nachinkubationsperiode bei 33 % bzw. 53 % der air/liquid mit mittlerem Mediumstand gegen Raumluft exponierten Zellen.

Derartige Experimente mit einer Expositionsdauer von 120 Minuten wurden wiederholt und der Zellzahlgehalt und Tetrazoliumsalzumsatz im Anschluß an eine 24stündige Nachinkubationsphase bestimmt.

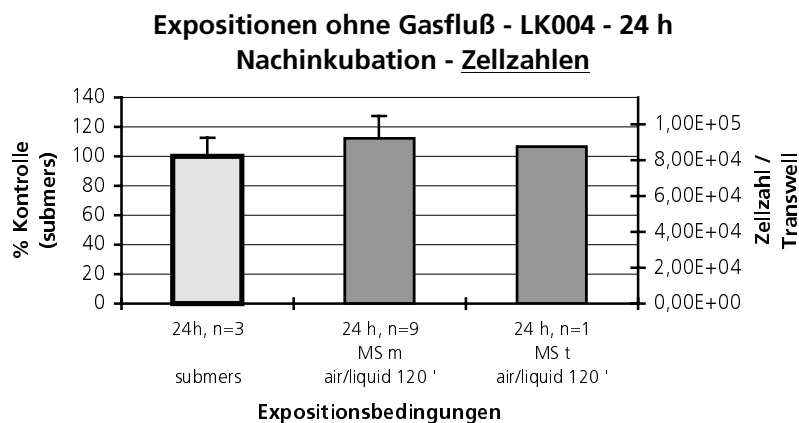


Abb. 3.90 Expositionen von Lk004-Zellen ohne Gasfluß. Bestimmung der Zellzahl nach 24stündiger postexperimenteller Nachinkubation. 120' - 2 h Exposition, MS m - Mediumstand mittel, ruhend, MS t - Mediumstand tief, fließend.

Die Analyse des Zellzahlgehaltes ließ auch nach 24stündiger Nachinkubation weder einen Einfluß der 120minütigen air/liquid-Exposition gegenüber den submers-Kontrollen

noch einen Unterschied zwischen den Expositionsbedingungen bei mittlerem bzw. tiefem Mediumstand erkennen. Die Zellzahl der submers kultivierten Zellen blieb über den untersuchten Zeitraum ebenso unverändert ($8,27 \times 10^4/0h$ bzw. $8,25 \times 10^4/24h$).

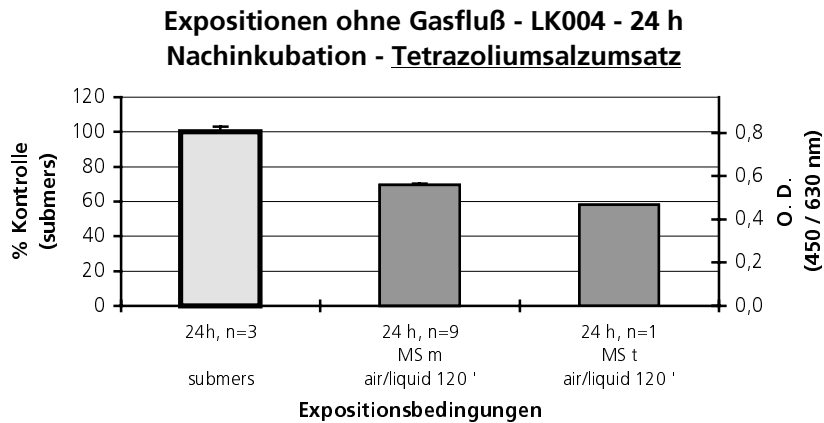


Abb. 3.91 Expositionen von Lk004-Zellen ohne Gasfluß. Bestimmung des Tetrazoliumsalzumsatzes nach 24stündiger postexperimenteller Nachinkubation. 120' - 2 h Exposition, MS m - Mediumstand mittel, ruhend, MS t - Mediumstand tief, fließend.

In der Analyse des Tetrazoliumsalzumsatzes im Anschluß an eine 24stündige Nachinkubation nach 120 Minuten Exposition im air/liquid-System ohne Gasfluß wurden hingegen deutliche Unterschiede zu rein submers kultivierten Zellen sichtbar. Der Tetrazoliumsalzumsatz nach air/liquid-Exposition mit mittlerem Mediumspiegel war um 30 % geringer als bei submers kultivierten Zellen. Bei Übergang zum air/liquid-System mit niedrigem Mediumspiegel sank er um weitere 10 %.

3.7.1.2 Zellsystem HFBE

Das Zellsystem HFBE wurde in Expositionen ohne Gasfluß in ähnlicher Weise untersucht wie zuvor das Zellsystem LK004. Die Analyse der Zellzahlen führte dabei dem in Abb. 3.92 dargestellten Ergebnis.

Air/liquid-Expositionen für 120 Minuten gegen Umgebungsluft ohne Gasfluß ließen nach Analyse des Parameters Zellzahl weder nach 2stündiger Nachinkubation noch nach 24stündiger Nachinkubation deutliche Unterschiede zu durchgängig submers kultivierten Zellen erkennen. Die Zellzahl der HFBE-Zellen fiel im Zeitraum von 24 Stunden etwas ab. Auch hier wurde bei Zellen, welche im Brutschrank air/liquid 2 Stunden unter zelltypspezifischen Bedingungen kultiviert wurden (5 % CO₂, 95 % rH/37 °C) eine deutlich niedrigere Zellzahl als in submers Kulturen gemessen.

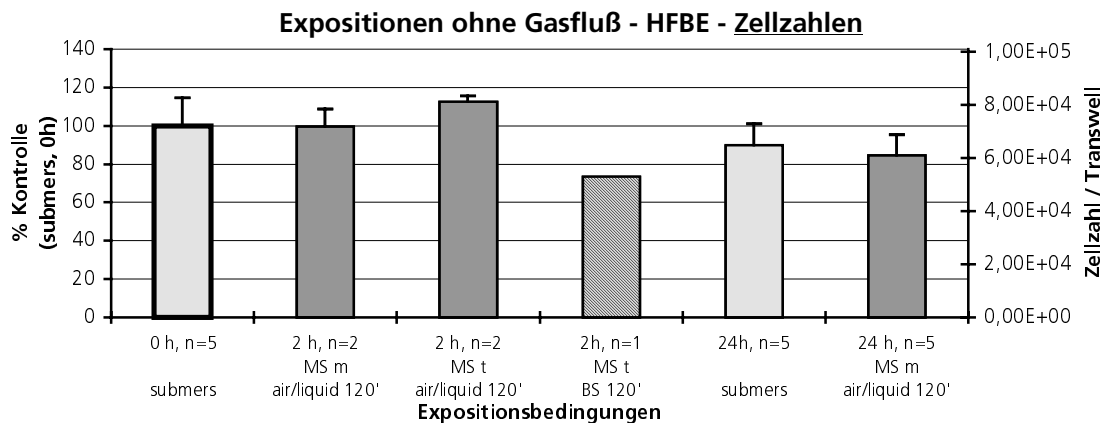


Abb. 3.92 Expositionen von HFBE-Zellen ohne Gasfluß. Bestimmung der Zellzahl nach 2- bzw. 24stündiger postexperimenteller Nachinkubation. 120' - 2 h Exposition, MS m - Mediumstand mittel, ruhend, MS t - Mediumstand tief, fließend, BS - Exposition air/liquid im Inkubator (5 % CO₂, 95 % rH/37 °C)

Die Analyse des Tetrazoliumsalzumsatzes ließ eine deutlich höhere Aktivität der air/liquid gegen Raumluft exponierten Zellen gegenüber der submers Kultur erkennen. Ebenso deutlich war der Unterschied der Systeme für mittleren und tiefen Mediumstand. Der Tetrazoliumsalzumsatz von air/liquid im Brutschrank inkubierten Zellen lag bei nur 70 % der submers-Kultur.

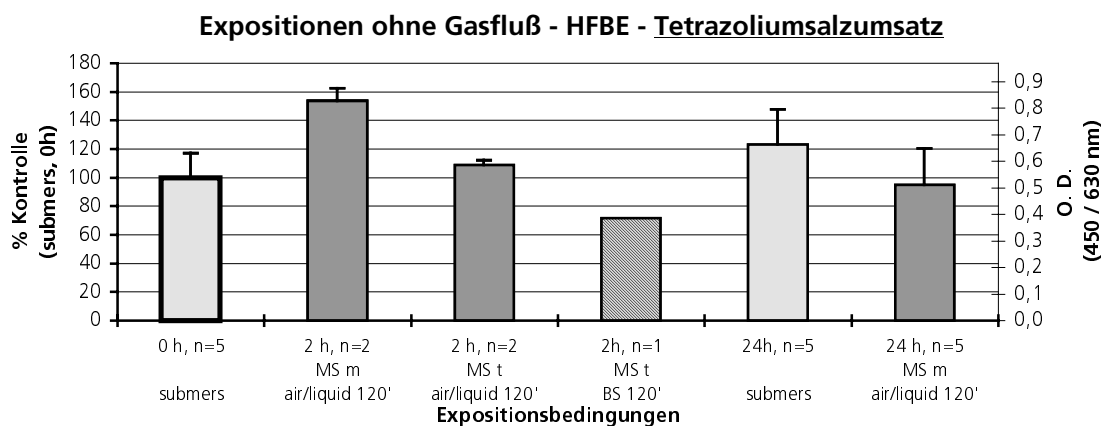


Abb. 3.93 Expositionen von HFBE-Zellen ohne Gasfluß. Bestimmung des Tetrazoliumsalzumsatzes nach 2- bzw. 24stündiger postexperimenteller Nachinkubation. 120' - 2 h Exposition, MS m - Mediumstand mittel, ruhend, MS t - Mediumstand tief, fließend, BS - Exposition air/liquid im Inkubator (5 % CO₂, 95 % rH/37 °C)

Obwohl die Zellzahl im Zeitraum von 2 bis 24 Stunden Nachinkubation sank (vgl. Abb. 3.92) stieg der Tetrazoliumsalzumsatz im gleichen Zeitraum auf 120 % der submers Kultur zum Zeitpunkt 0 h. Auch nach 24 Stunden war ein deutlicher Unterschied zwischen air/liquid exponierten Zellen und submers kultivierten Zellen erkennbar. Jedoch lag der Tetrazoliumsalzumsatz zu diesem Zeitpunkt in der submers-Kultur höher.

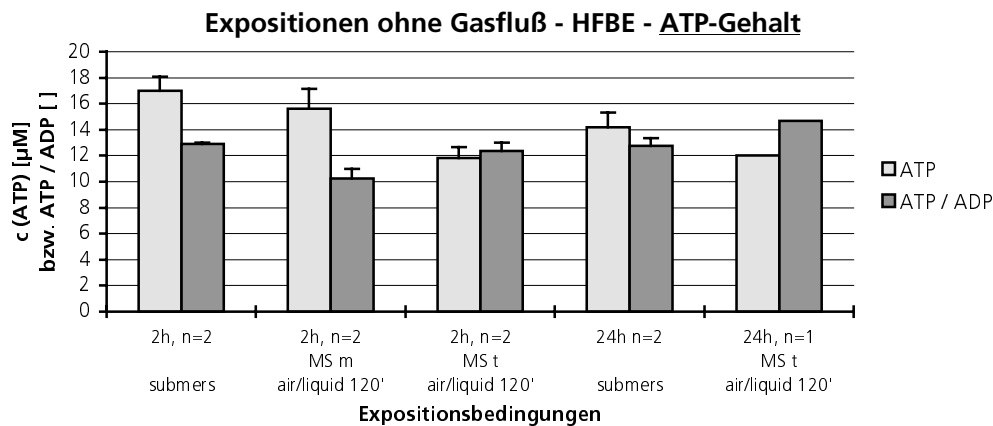


Abb. 3.94 Expositionen von HFBE-Zellen ohne Gasfluß. Bestimmung des ATP-Gehaltes und des ATP/ADP-Verhältnisses nach 2- bzw. 24stündiger postexperimenteller Nachinkubation. 120' - 2 h Exposition, MS m - Mediumstand mittel, ruhend, MS t - Mediumstand tief, fließend

Die air/liquid-Exposition von HFBE-Zellen gegen Raumluft für 120 Minuten führte im System mit mittlerem Mediumstand zu keinem signifikanten Unterschied zu den für die submers Kultivierten Zellen ermittelten Werten. Im Gegensatz hierzu lag der ATP-Gehalt von air/liquid exponierten Zellen bei tiefem Mediumstand niedriger. Er fiel innerhalb der Nachinkubationszeit von 24 Stunden jedoch nicht weiter und lag dann auf dem Niveau der durchgängig submers kultivierten Zellen.

3.7.2 Exposition mit Gasfluß: synthetische Luft

3.7.2.1 Zellsystem Lk004

Bei der Exposition der Zellen gegen synthetische Luft wurden zwei verschiedene Zielrichtungen verfolgt. Zunächst wurde der Effekt der Strömungsgeschwindigkeit bearbeitet. In einem zweiten experimentellen Ansatz wurde der Einfluß des Mediumspiegels und der Befeuchtung untersucht.

Lk004-Zellen wurden für einen Zeitraum von 5 bis 120 Minuten gegen befeuchtete synthetische Luft (20,5 % O₂ in N₂, ca. 90 % rH/25 °C) gegen unterschiedliche Gaströme im Bereich von 8,3 ml/min bis 667 l/min je Transwell exponiert. Direkt nach der Exposition (667 l/min, 33 ml/min und 16,7 ml/min) bzw. nach Abschluß einer 2stündigen Nachinkubation wurde die Zellzahl gemessen. Die Exposition bei dem Gasfluß 667 l/min wurde einmalig durchgeführt und dort der Parameter Tetrazoliumsalzumsatz nach der Exposition gemessen (Abb. 3.95).

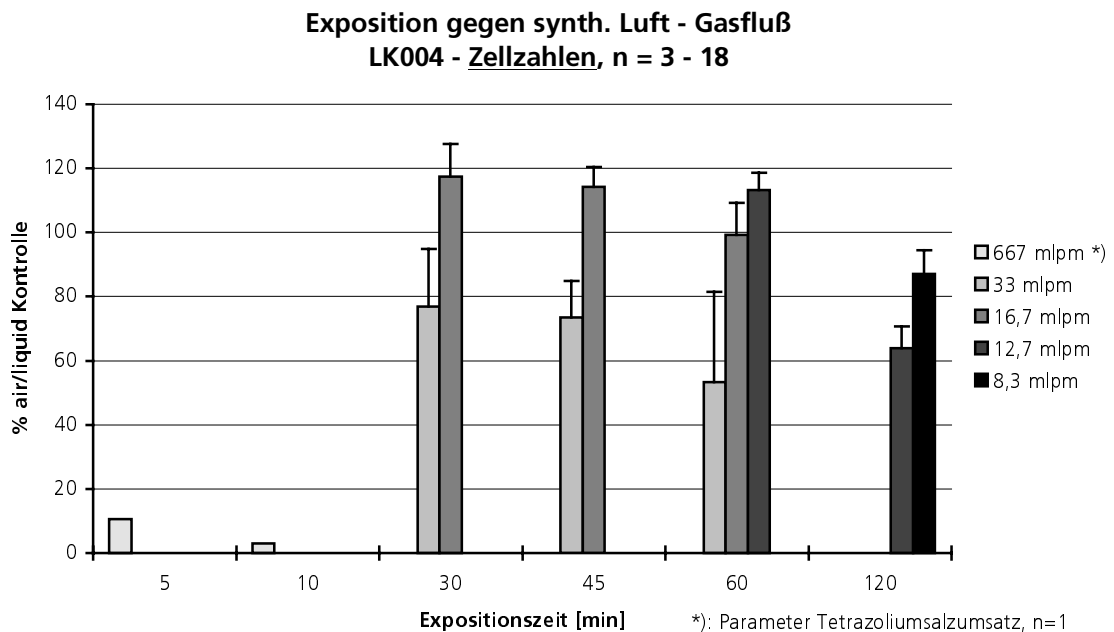


Abb. 3.95 Expositionen von Lk004-Zellen gegen synth. Luft. Bestimmung der Zellzahl. Relative Darstellung zu Ergebnissen von air/liquid-Expositionen der Zellen über einen gleichen Zeitraum. Bedingungen: synth. Luft (20,5 % O₂ in N₂), ca. 90 % rH/25 °C Mediumstand mittel, ruhend.

Deutlich ist eine starke Abhängigkeit der Zellüberlebensrate von der Größe des Gasstromes erkennbar. Eine Strömungsgeschwindigkeit von 667 ml/min pro Transwell-Insert führte zu einem Vitalitätsverlust von mehr als 90 % innerhalb von 10 Minuten. Hingegen wurden bei einer Strömungsgeschwindigkeit von maximal 16,7 ml/min nach 60minütiger Exposition ebenso viele Zellen wiedergefunden wie in einer nicht überströmten air/liquid-Kontrolle. Nach 2stündiger Exposition wurden bei einem Gasstrom von 8,3 ml/min ca. 90 % der Zellen einer air/liquid-Kontrolle gefunden.

Zur Untersuchung des Effektes von Mediumstand und -fluß sowie der Befeuchtung wurden Lk004-Zellen unter zwei verschiedenen Expositionsmodi für 120 Minuten bei einem Gasfluß von 8,3 ml/min gegen synthetische Luft exponiert. Einerseits wurde bei ruhendem Mediumstand eine mittlere Mediumhöhe eingestellt und die synthetische Luft nicht befeuchtet (ca. 15% rH/25 °C). Andererseits wurde das fließende Mediumniveau auf tiefen Stand abgesenkt und die synthetische Luft auf einen realitätsnahen Wert von ca. 70 % rH/25 °C angefeuchtet. Die Meßwerte sind in der folgenden Grafik relativ zu entsprechend air/liquid ohne Gasfluß exponierten Zellen aufgetragen (Abb. 3.96).

Die Ergebnisse der Messungen lassen eine Belastung der Zellen in beiden Expositionsmodi erkennen. Im Falle des mittleren Mediumstandes bei nicht angefeuchteter Gasmischung lag die Zellzahl in der Größenordnung von 90 % der air/liquid-Kontrolle. Dieser Wert wurde ebenfalls für eine Exposition bei ca. 90 % rH/25 °C unter sonst gleichen Bedingungen erreicht.

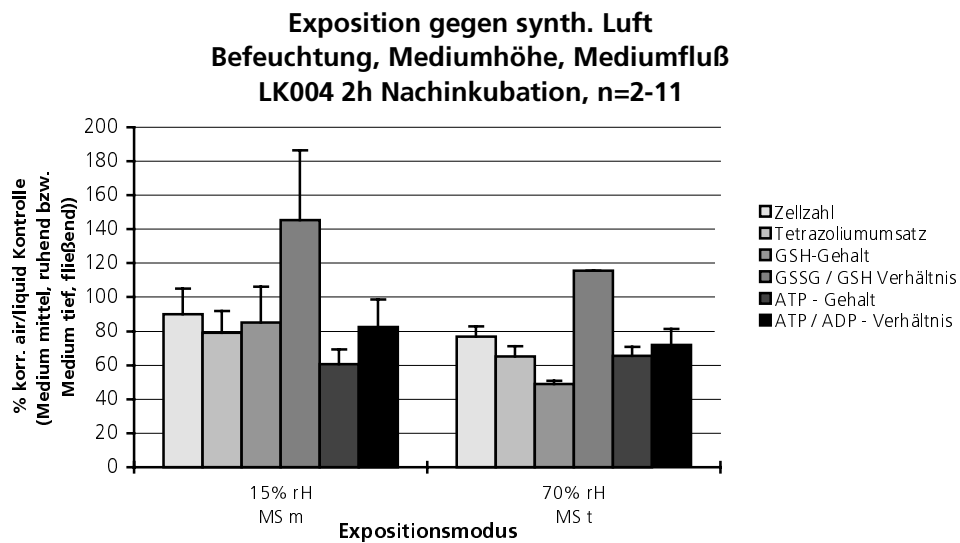


Abb. 3.96 Expositionen von Lk004-Zellen gegen synth. Luft. Bestimmung der Zellzahl, des Tetrazoliumsalzumsatzes, des Glutathion- und des ATP-Gehaltes. Relative Darstellung zu Ergebnissen von air/liquid-Expositionen der Zellen ohne Gasstrom unter sonst gleichen Bedingungen über einen gleichen Zeitraum. Bedingungen: synth. Luft (20,5 % O₂ in N₂), ca. 15 % rH/25 °C oder ca. 70 % rH/25 °C, Gasfluß 8,3 ml/min. MS m - Mediumstand mittel, ruhend, MS t - Mediumstand tief, fließend. 120 Minuten Exposition, Nachinkubationszeit 2h. Die Ergebnisse der Messungen wurden nicht auf die Zellzahl normiert.

Der Tetrazoliumsalzumsatz war auf 80 %, der GSH-Gehalt auf 85 %, der ATP-Gehalt auf nur 60 % und das ATP/ADP auf 80 % der air/liquid-Kontrolle verringert. Das GSSG/GSH-Verhältnis stieg auf 140 % der Kontrolle. Für den Expositionsmodus mit tiefem, fließendem Mediumstand und ca. 70 % rH/25 °C wurden 80 % der Zellmenge der air/liquid-Kontrolle gefunden. Der Tetrazoliumsalzumsatz, ATP-Gehalt sowie das ATP/ADP-Verhältnis sanken auf ca. 70 % der Kontrolle. Der GSH-Gehalt fiel auf 50 % der Kontrolle ab und das GSSG/GSH-Verhältnis war gegenüber der air/liquid-Kontrolle auf 115 - 120 % erhöht.

3.7.2.2 Zellsystem HFBE

Für das Zellsystem HFBE wurden ebenfalls vergleichende Expositionen in den beiden oben beschriebenen Expositionsmodi durchgeführt. Die Ergebnisse der Messungen sind wiederum relativ zu entsprechend air/liquid ohne Gasstrom exponierten Zellen in Abb. 3.97 aufgetragen.

HFBE-Zellen ließen im Vergleich der Expositionen im nicht-überströmten System zum System mit Gasstrom und mittlerem, ruhenden Mediumstand für die Parameter Zellzahl, Tetrazoliumsalzumsatz und GSH-Gehalt keine signifikanten Unterschiede erkennen. Der ATP-Gehalt der Zellen hingegen war auf ca. 65 % des Meßwertes der air/liquid-Kontrolle abgesenkt und das ATP/ADP-Verhältnis fiel auf ca. 80 %.

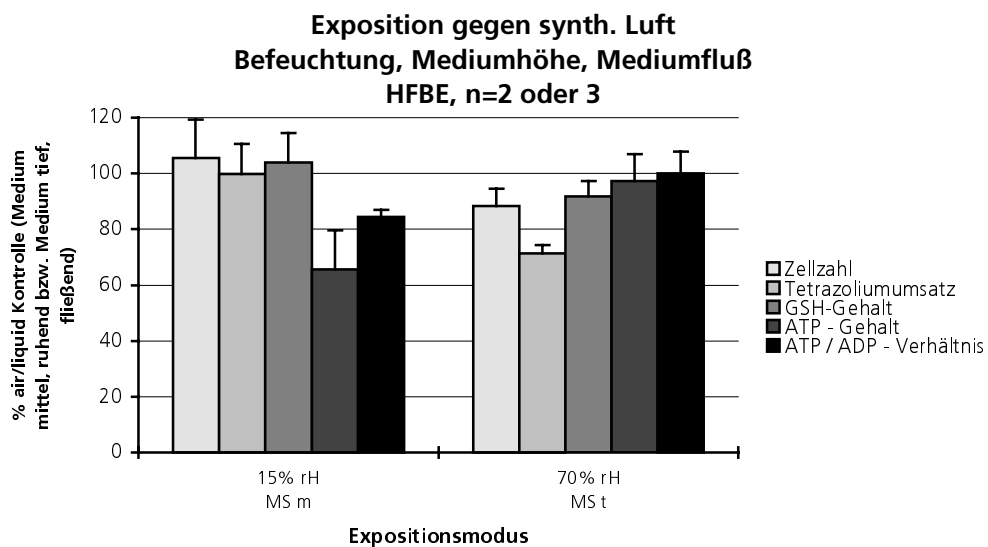


Abb. 3.97 Expositionen von HFBE-Zellen gegen synth. Luft. Bestimmung der Zellzahl, des Tetrazoliumsalsumsatzes, des Glutathion- und des ATP-Gehaltes. Relative Darstellung zu Ergebnissen von air/liquid-Expositionen der Zellen ohne Gasstrom unter sonst gleichen Bedingungen über einen gleichen Zeitraum. Bedingungen: synth. Luft (20,5 % O₂ in N₂), ca. 15 % rH/25 °C oder ca. 70 % rH/25 °C, Gasfluß 8,3 ml/min. MS m - Mediumstand mittel, ruhend, MS t - Mediumstand tief, fließend. 120 Minuten Exposition, Nachinkubationszeit 2h. Die Ergebnisse der Messungen wurden nicht auf die Zellzahl normiert.

Im System mit tiefem, fließendem Mediumstand waren die gefundenen Meßwerte für die Zellzahl, den Tetrazoliumsalsumsatz und den GSH-Gehalt auf 70 - 90 % der Kontrolle abgesenkt, wohingegen sich bei der Analyse des ATP-Gehaltes und des ATP/ADP-Verhältnisses kein Unterschied zur air/liquid-Kontrolle darstellte.

3.7.3 Exposition mit Gasfluß: Ozon

3.7.3.1 Zellsystem Lk004

Es wurden Expositionen von Lk004-Zellen gegen Gasmischungen von Ozon in synthetischer Luft im Konzentrationsbereich 125 bis 2700 ppb durchgeführt. Innerhalb dieses Bereiches wurden unter Variation der Expositionszeit von 60 und 120 Minuten stichprobenartig verschiedene Expositionskonzentrationen ausgewählt, um die Sensitivität des Systems durch Dosis-/Wirkungsbeziehungen zu charakterisieren. Die exakte Einstellung der Ozon-Konzentrationen wurde durch apparative Gegebenheiten bestimmt.

Die Expositionsbedingungen hinsichtlich der Mediumversorgung wurden entsprechend den vorangegangenen Experimenten variiert. Es fanden Expositionen bei hohem und mittlerem Mediumspiegel mit ruhendem Medium sowie tiefem Mediumspiegel mit fließendem Medium statt. Für diese und alle folgenden Expositionen wurde ein Gasfluß von 8,3 ml/min je Transwell-Insert genutzt.

Expositionen bei hohem Mediumspiegel

Lk004-Zellen wurden für 120 Minuten gegen Gasmischungen mit den Ozonkonzentrationen 243 ppb, 862 ppb und 2250 ppb exponiert. Nach einer postexperimentellen Inkubationsphase von 2 oder 24 Stunden wurden die Zellzahl und der Tetrazoliumsalzumsatz gemessen.

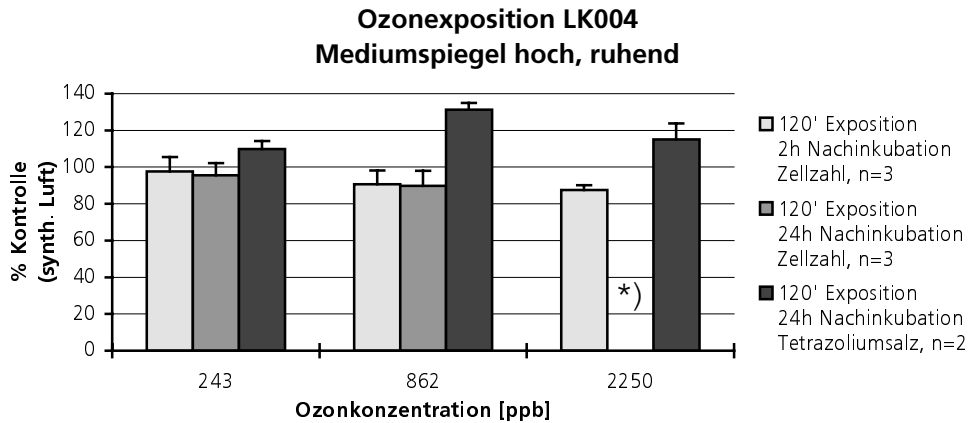


Abb. 3.98 Expositionen von Lk004-Zellen gegen Ozon bei hohem Mediumstand. Bestimmung der Zellzahl und des Tetrazoliumsalzumsatzes. Relative Darstellung zu Ergebnissen von Expositionen der Zellen gegen synth. Luft unter sonst gleichen Bedingungen über einen gleichen Zeitraum. Die Ergebnisse der Messungen wurden nicht auf die Zellzahl normiert. *): Messung nicht durchgeführt

Die Ergebnisse ließen eine mit zunehmender Ozonkonzentration abnehmende Zellzahl erkennen. Nach einer Exposition gegen 2250 ppb Ozon wurden nach 2stündiger Nachinkubation noch ca. 90 % der Zellzahl der gegen synth. Luft exponierten Zellen wiedergefunden. Bei verlängerter Nachinkubationszeit von 24 Stunden fiel die Zellzahl der bei kleineren Ozonkonzentrationen exponierten Zellen nicht weiter. Der Tetrazoliumsalzumsatz war unabhängig von der Ozonkonzentration auf Werte von 110 - 130 % der Kontrolle gesteigert.

Expositionen bei mittlerem Mediumstand

Es wurden Expositionen von Lk004-Zellen gegen die Ozonkonzentrationen 125 +/- 10 % ppb, 300 +/- 10 % ppb, 700 +/- 10 % ppb, 831 ppb und 2697 ppb Ozon durchgeführt. Dabei wurde nach 2- und 24stündiger Nachinkubation die Zellzahl analysiert (Abb. 3.99).

Die Analyse des Zellzahl-Gehaltes nach Exposition im System mit mittlerem Mediumstand ließ eine klare Dosisabhängigkeit erkennen. Im Konzentrationsbereich von 125 ppb Ozon wurde der Meßwert der gegen synthetische Luft exponierten Zellen erreicht. Nach 2stündiger Exposition gegen 700 ppb Ozon wurden ca. 85 % der Kontrollzellen wiedergefunden. Dieser Wert verringerte sich mit weiter zunehmender Ozon-Konzentration auf ca. 65 % der Kontrolle bei einer Konzentration von 2700 ppb Ozon.

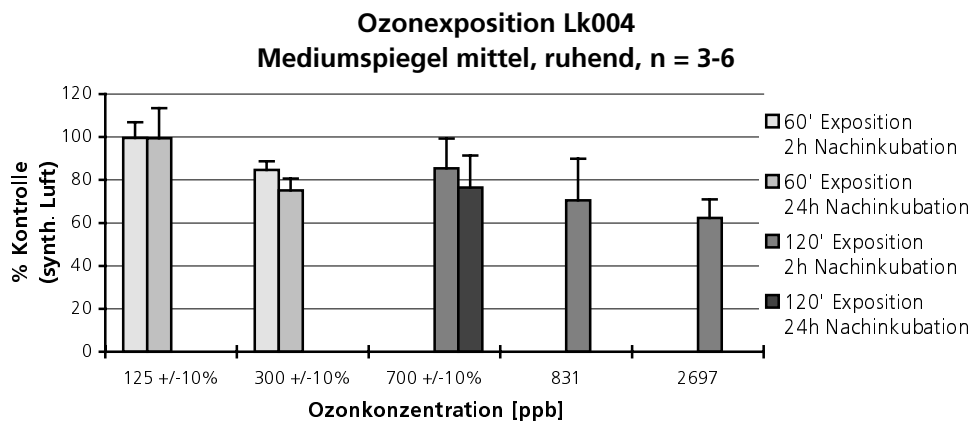


Abb. 3.99 Expositionen von Lk004-Zellen gegen Ozon bei mittlerem Mediumstand. Bestimmung der Zellzahl. Relative Darstellung zu Ergebnissen von Expositionen der Zellen gegen synth. Luft unter sonst gleichen Bedingungen über einen gleichen Zeitraum.

Expositionen bei tiefem Mediumstand

Es wurden 60- und 120minütige Expositionen von Lk004-Zellen gegen 202 ppb und 510 ppb Ozon durchgeführt. Nach Ablauf einer Nachinkubationsphase von 2 Stunden wurden die Zellzahl, der Tetrazoliumsalzumsatz, der GSH- und der ATP-Gehalt analysiert.

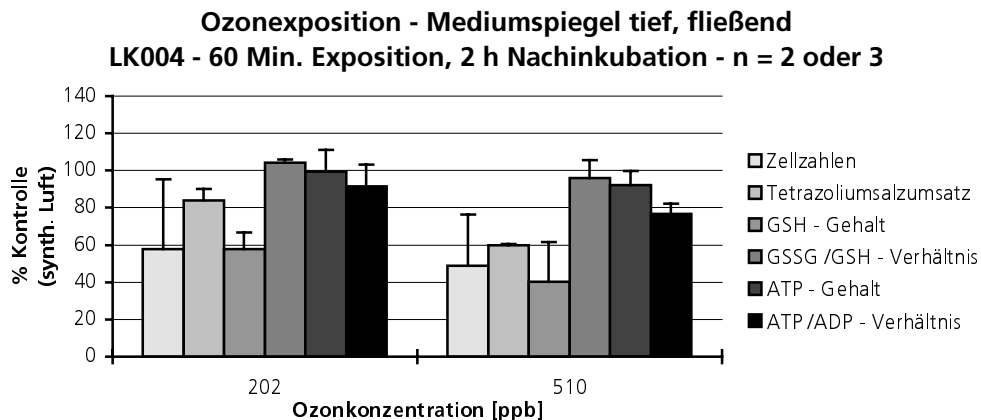


Abb. 3.100 60minütige Expositionen von Lk004-Zellen gegen Ozon bei tiefem Mediumstand und fließendem Medium. Relative Darstellung zu Ergebnissen von Expositionen der Zellen gegen synth. Luft unter sonst gleichen Bedingungen über einen gleichen Zeitraum. Die Ergebnisse der Messungen wurden nicht auf die Zellzahl normiert.

Die Meßergebnisse dokumentieren eine stark toxische Wirkung der Gasmischung schon nach einer Expositionszeit von 60 Minuten und einer Ozon-Konzentration von 202 ppb. Die Zellzahl ist auf einen Wert im Bereich von 50 % der Kontrolle gefallen, der Tetrazoliumgehalt auf 80 % resp. 60 %, der GSH-Gehalt auf 60 % resp. 40 % der Kontrolle. Das GSSG/GSH-Verhältnis blieb hingegen unverändert, ATP-Gehalt und ATP/ADP-Verhältnis zeigen konzentrationsabhängig eine leichte Abnahme. Es fällt auf, daß die ermittelten Zellzahlen eine deutlich stärkere Schwankung zeigten als nach den zuvor durchgeführten Experimenten zu erwarten war. Die mikroskopische Kontrolle der Zellen zeigte, daß unter diesen Expositionsbedingungen bereits nach 60minütiger

Exposition und den eingesetzten Ozonkonzentrationen sehr große zellfreie Bereiche im exponierten Zellrasen entstanden, welche teilweise mit einer großflächigen Ablösung der Zellen einhergingen (vgl. Abb. 3.101). Diese Beobachtung war auch in Experimenten mit Ozon unter anderen Expositionsbedingungen (Medium mittel, Medium hoch) gemacht worden, jedoch in weitaus geringerem Umfang, deutlich höheren Ozonkonzentrationen und ausschließlich 120minütiger Exposition. Derartige Ablösungen des Zellrasens führten methodisch bedingt zu größeren Ungenauigkeiten bei der Zellzahlmessung als üblich.

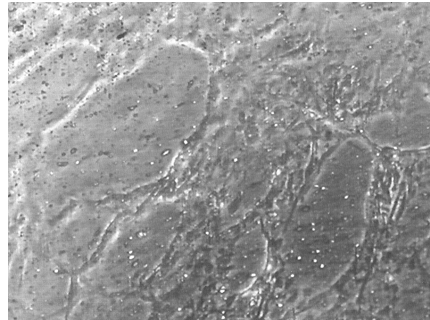


Abb. 3.101 Exposition von Lk004-Zellen gegen Ozon im System mit tiefem Mediumstand und fließendem Medium. Repräsentatives Bild für einen Ausschnitt aus dem Zellrasen nach Ozon-Exposition (hier: 60 Minuten, 202 ppb). Es sind großflächige Löcher im Zellrasen zu erkennen. Phasenkontrastmikroskopische Aufnahme, 60x.

Expositionen in diesem System für 2 Stunden gegen Ozon dieser Konzentrationen führten zu folgenden Meßergebnissen.

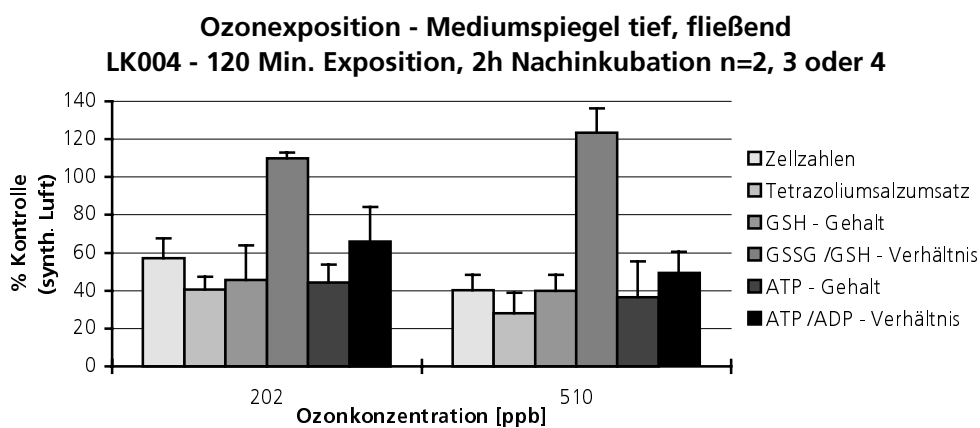


Abb. 3.102 120minütige Expositionen von Lk004-Zellen gegen Ozon bei tiefem Mediumstand und fließendem Medium. Relative Darstellung zu Ergebnissen von Expositionen der Zellen gegen synth. Luft unter sonst gleichen Bedingungen über einen gleichen Zeitraum. Die Ergebnisse der Messungen wurden nicht auf die Zellzahl normiert.

Wiederum dokumentieren die Ergebnisse eine stark toxische Wirkung des untersuchten Gases. Die Zellzahl fiel in Relation zur Kontrolle auf 57 % bzw. 40 %. Der Tetrazoliumsalzumsatz wurde auf 40 % bzw. 28 % abgesenkt. Der Gehalt an reduziertem Glutathion wurde mit 40 % der Kontrolle bestimmt. In der gleichen Größenordnung lag der ATP-Gehalt. Das ATP/ADP-Verhältnis fiel dosisabhängig auf 66 % bzw. 48 % der Kontrolle. Das GSSG/GSH-Verhältnis stieg dosisabhängig auf 110 % resp. 123 % der Kontrolle.

3.7.3.2 Zellsystem HFBE

Expositionen bei tiefem Mediumstand

Mit dem Zellsystem HFBE wurden 60minütige Expositionen gegen die Ozonkonzentrationen 202 und 510 ppb durchgeführt. Es wurden die Parameter Zellzahlgehalt, Tetrazoliumsalzumsatz, GSH- und ATP-Gehalt gemessen.

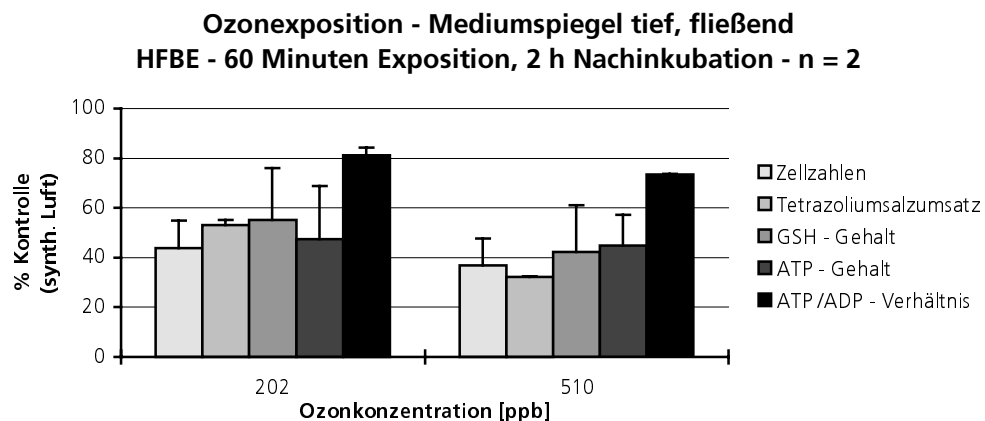


Abb. 3.103 60minütige Expositionen von HFBE-Zellen gegen Ozon bei tiefem Mediumstand und fließendem Medium. Relative Darstellung zu Ergebnissen von Expositionen der Zellen gegen synth. Luft unter sonst gleichen Bedingungen über einen gleichen Zeitraum. Die Ergebnisse der Messungen wurden nicht auf die Zellzahl normiert.

Auch im Zellsystem HFBE wurden bereits nach 60minütiger Exposition bei Gaskonzentrationen von 202 und 510 ppb Ozon stark toxische Wirkungen in den Meßergebnissen sichtbar. Alle Endpunkte lieferten konzentrationsabhängig von der Gaskonzentration Werte unterhalb von 60 % der Kontrollen. Das ATP/ADP-Verhältnis fiel auf 81 % bzw. 74 %. Auch hier wurden bereits nach kurzer Expositionsdauer große Schäden im Zellrasen beobachtet.

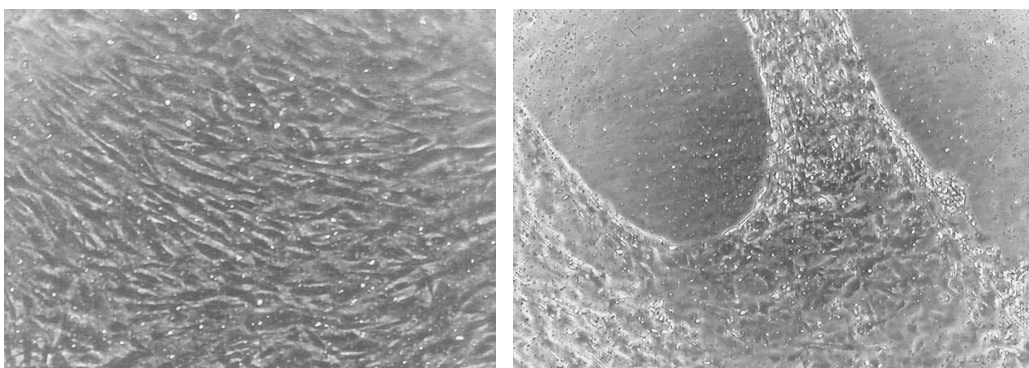


Abb. 3.104 Exposition von HFBE-Zellen gegen synth. Luft (links) und Ozon (rechts) im System mit tiefem Mediumstand und fließendem Medium. Repräsentatives Bild für Ausschnitte aus dem Zellrasen nach entspr. Expositionen (hier: 120 Minuten synth. Luft bzw. 60 Minuten Ozon, 202 ppb). Es sind großflächige Löcher im Zellrasen zu erkennen. Phasenkontrastmikroskopische Aufnahmen, 60x

3.7.4 Expositionen mit Gasfluß: Stickstoffdioxid

3.7.4.1 Zellsystem Lk004

Lk004-Zellen wurden im Expositionssystem mit hohem und mit tiefem Mediumstand für bis zu 120 Minuten gegen Stickstoffdioxidkonzentration im Bereich von 39 bis 1200 ppb exponiert. Die stichprobenartige Auswahl der Konzentrationen innerhalb dieses Bereiches diente wie bei Expositionen gegen Ozon auch hier der Charakterisierung des Systems durch Dosis-/Wirkungsbeziehungen.

Expositionen bei hohem Mediumstand

Im System mit hohem Mediumstand und ruhendem Medium wurden im Anschluß an eine Nachinkubationsphase von 2 Stunden die Parameter Zellzahl und Tetrazoliumsalzumsatz gemessen.

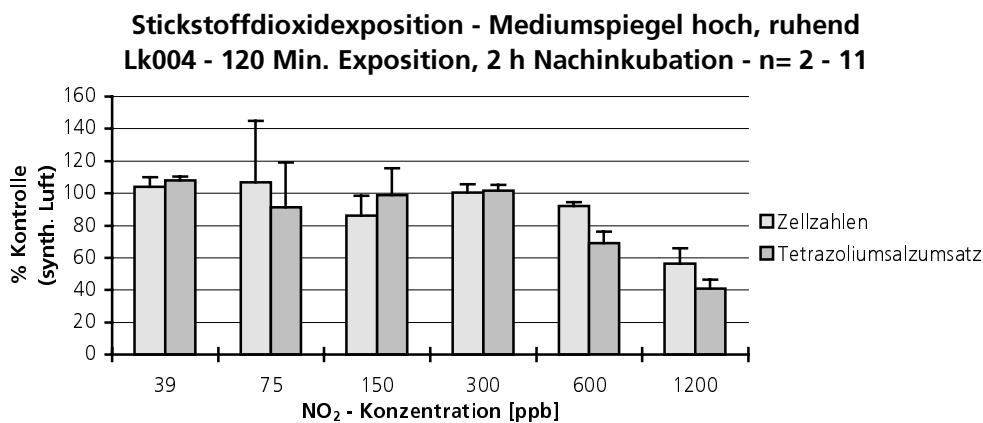


Abb. 3.105 Expositionen von Lk004-Zellen gegen Stickstoffdioxid bei hohem Mediumstand. Bestimmung der Zellzahl und des Tetrazoliumsalzumsatzes.. Relative Darstellung zu Ergebnissen von Expositionen der Zellen gegen synth. Luft unter sonst gleichen Bedingungen über einen gleichen Zeitraum. Die Ergebnisse der Messungen wurden nicht auf die Zellzahl normiert.

Bis zu einer Konzentration von 300 ppb Stickstoffdioxid lagen die erhaltenen Meßergebnisse im Schwankungsbereich der Kontrollzellen (Exposition gegen synthetische Luft). Für die Konzentrationen 600 ppb und 1200 ppb wurde eine dosisabhängige Abnahme der Zellzahlen und des Tetrazoliumsalzumsatzes bis auf 56 % resp. 41 % der Kontrollen gefunden.

Expositionen bei tiefem Mediumstand

Im diesem Expositionssystem wurden 60minütige und 120minütige Expositionen gegen Stickstoffdioxid im Konzentrationsbereich 75 - 1200 ppb durchgeführt. Es wurden nach Ablauf einer Nachinkubationszeit von 2 Stunden die Parameter Zellzahl, Tetrazoliumsalzumsatz, GSH- und ATP-Gehalt gemessen.

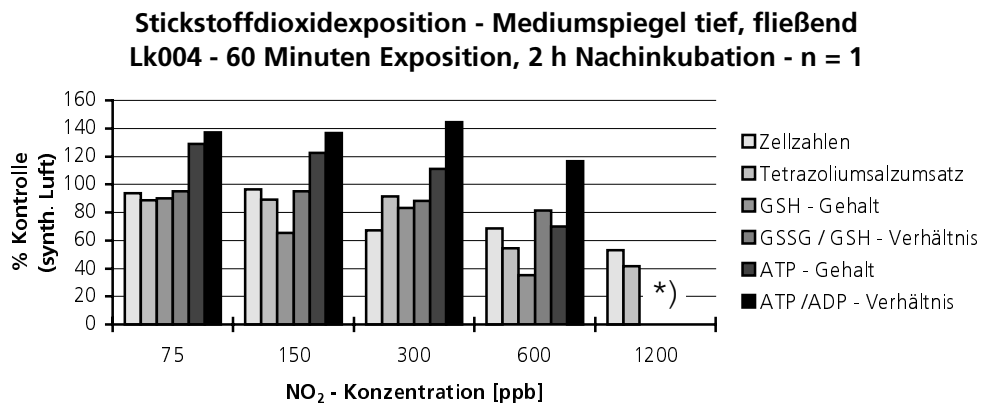


Abb. 3.106 Expositionen von Lk004-Zellen gegen Stickstoffdioxid bei tiefem Mediumstand. Ergebnis aus Einzelexperimenten. Relative Darstellung zu Ergebnissen von Expositionen der Zellen gegen synth. Luft unter sonst gleichen Bedingungen über einen entsprechenden Zeitraum. Die Ergebnisse der Messungen wurden nicht auf die Zellzahl normiert. *) Messungen zum Glutathion- und ATP-Gehalt wurde bei Exposition gegen 1200 ppb NO₂ nicht durchgeführt.

Im Konzentrationsbereich von 75 bis 300 ppb wurde in den durchgeführten Einzelexperimenten durchgängig ein gegenüber der Kontrolle erhöhter ATP-Gehalt und ein erhöhtes ATP/ADP-Verhältnis gefunden. Im Konzentrationsbereich von 300 ppb bis 600 ppb dokumentierte sich durch deutlich verringerte Zellzahl, verringerten Tetrazoliumsalzumsatz und verringerten ATP-Gehalt das Einsetzen einer toxischen Wirkung des Gases.

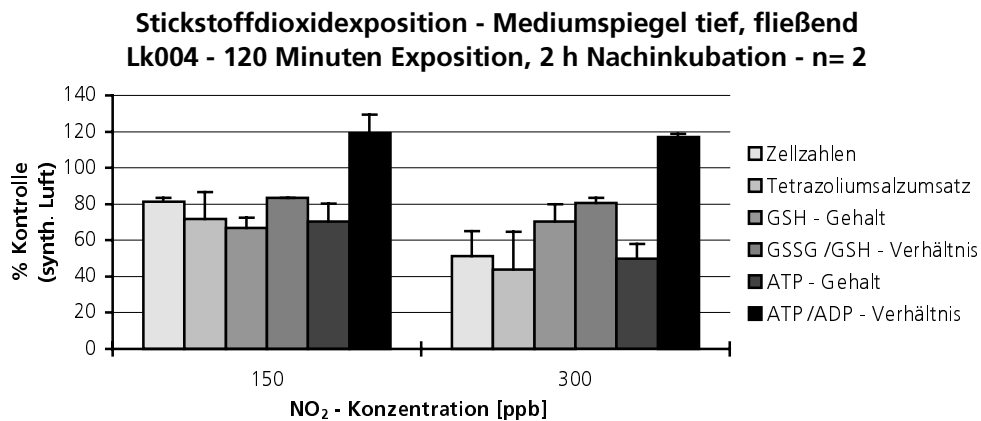


Abb. 3.107 Expositionen von Lk004-Zellen gegen Stickstoffdioxid bei tiefem Mediumstand. Relative Darstellung zu Ergebnissen von Expositionen der Zellen gegen synth. Luft unter sonst gleichen Bedingungen über einen gleichen Zeitraum. Die Ergebnisse der Messungen wurden nicht auf die Zellzahl normiert.

Nach 2stündiger Exposition gegen Stickstoffdioxid im System mit niedrigem Mediumstand und fließendem Medium wurden bereits in den Konzentrationen 150 ppb und 300 ppb deutliche Wirkungen des untersuchten Gases sichtbar. Mit Ausnahme des ATP/ADP-Verhältnisses (119 % der Kontrolle) lagen für die Konzentration 150 ppb alle untersuchten Parameter im Bereich von 70 - 80 % der Kontrollzellen. Bei erhöhter Konzentration auf 300 ppb NO₂ fielen die Zellzahl, der Tetrazoliumsalzumsatz und der ATP-Gehalt weiter auf 40 % bis 50 % der Kontrolle.

3.7.4.2 Zellsystem HFBE

Expositionen bei tiefem Mediumstand

HFBE-Zellen wurden für 60 Minuten gegen Stickstoffdioxidkonzentrationen von 75 bis 1200 ppb exponiert. Nach 2 Stunden postexperimenteller Inkubation unter submersen zelltypspezifischen Bedingungen wurde die Zellzahl, der Tetrazoliumsalzumsatz, der Glutathion- und der ATP-Gehalt der Zellen bestimmt.

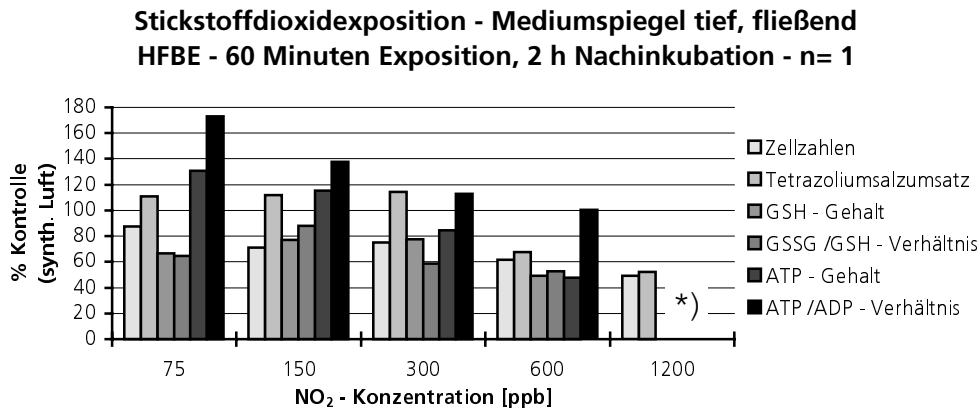


Abb. 3.108 Expositionen von HFBE-Zellen gegen Stickstoffdioxid bei tiefem Mediumstand. Ergebnis aus Einzelerperimenten. Relative Darstellung zu Ergebnissen von Expositionen der Zellen gegen synth. Luft unter sonst gleichen Bedingungen über einen entsprechenden Zeitraum. Die Ergebnisse der Messungen wurden nicht auf die Zellzahl normiert. *) Messungen zum Glutathion- und ATP-Gehalt wurde bei Exposition gegen 1200 ppb NO₂ nicht durchgeführt.

Die Ergebnisse der Einzelerperimente zeigen bis zu einer Konzentration von 300 ppb NO₂ einen gegenüber der Kontrolle erhöhten Tetrazoliumsalzumsatz und ATP-Gehalt sowie ein deutlich erhöhtes ATP/ADP-Verhältnis. Die Messungen zum Glutathion-Gehalt zeigten durchgängig niedrigere Meßwerte als in der Kontrolle. Eine konzentrationsabhängige Verringerung der Zellzahl dokumentierte sich im Konzentrationsbereich oberhalb 300 ppb NO₂. Der Kontrollwert der Zellzahl wird in diesem Einzelerperiment - wie auch in dem entsprechenden Experiment mit Lk004-Zellen - allerdings auch in der kleinsten Stickstoffdioxid-Konzentration nicht erreicht.

3.7.5 Zusammenfassung

Es wurden Expositionen von Lk004-Zellen und HFBE-Zellen unter Variation der experimentellen Bedingungen gegen Umgebungsluft (ohne Gasfluß), synthetische Luft, Ozon und Stickstoffdioxid im neu entwickelten Expositionsgerät durchgeführt. Dabei wurde vorwiegend der Effekt der Einflußgrößen Gasfluß, Feuchte und Höhe des äußeren Mediumstandes auf die Vitalität der Zellsysteme und die Detektierbarkeit der biologischen Wirkung der eingesetzten Modellgase untersucht.

Ergebnisse von Expositionsexperimenten ohne Gasfluß zeigten, daß beide Zellsysteme unter diesen air/liquid-Bedingungen bei mittlerem äußerem Mediumspiegel für 2 Stunden exponiert werden konnten, ohne daß an den Parametern Zellzahl, Tetrazoliumsalzumsatz und ATP/ADP-Gehalt ein deutlicher Vitalitätsverlust erkennbar wurde. Die Exposition bei tiefem Mediumstand ließ eine stärkere Belastung des Zellsystems erkennen. Die Verlängerung der Expositionszeit auf 4 Stunden führte im Zellsystem Lk004 zu einem meßbaren Vitalitätsverlust. Expositionen gegen Brutschrankatmosphäre führten zu einem höheren Vitalitätsverlust als die entsprechenden Expositionen gegen Umgebungsluft.

Expositionen gegen synthetische Luft (20,5 % O₂ in N₂) mit Gasfluß zeigten eine direkte Abhängigkeit der Zellvitalität von der Größe des angelegten Gasstromes. Expositionen gegen einen bei 25 °C befeuchteten Gasstrom von 667 ml/min pro Transwell führten zu einem Vitalitätsverlust von mehr als 90 % nach 10 Minuten Expositionszeit. Bei einem Gasstrom von 8,3 ml/min hingegen konnten Lk004-Zellen für 120 Minuten bei einem Vitalitätserhalt - nach Messung der Zellzahl - von ca. 90 % exponiert werden.

Es wurden bei dem letztgenannten Gasfluß Experimente unter Variation seiner Befeuchtung und des äußeren Mediumstandes durchgeführt. Die Ergebnisse ließen für beide Zellsysteme erkennen, daß die Höhe der Befeuchtung unter diesen Bedingungen keinen meßbaren Einfluß auf die Zellvitalität hatte. Bei der Absenkung des äußeren Mediumspiegels von mittlerer Höhe auf tiefes Niveau dokumentierte sich jedoch eine stärkere Belastung des Zellsystems in den Ergebnissen der Analyse der Zellzahl, des Tetrazoliumsalzumsatzes, sowie des GSH- und des ATP-Gehaltes.

Expositionen gegen Ozon wurden im Konzentrationsbereich von 125 ppb bis 2700 ppb durchgeführt. Dabei wurden die Expositionszeit und die Höhe des äußeren Mediumspiegels unter Verwendung des Zellsystems Lk004 variiert.

Unabhängig von den eingestellten experimentellen Bedingungen zur Expositionszeit und zum Mediumstand wurden in jedem System toxische Wirkungen in Abhängigkeit von der Ozonkonzentration gefunden. Die Wirkung des Gases auf das Zellsystem stieg dabei deutlich zeitabhängig und mit Absenkung des äußeren Mediumspiegels an. Die stark toxische Wirkung auf die Zellen in diesem System dokumentierte sich auch im mikroskopischen Bild des exponierten Zellayers. Bereits nach einer kurzen Expositionszeit von 60 Minuten und kleinen Ozonkonzentrationen von 202 ppb wurden großflächige

Ablösungen und Löcher im Zellrasen sichtbar. Die Exposition von HFBE-Zellen bei tiefem Mediumstand bestätigte die beschriebenen Ergebnisse.

Gegen Stickstoffdioxid wurden Expositionen im System mit hohem und tiefem äußeren Mediumstand im Konzentrationsbereich von 39 bis 1200 ppb durchgeführt.

Wie in den Expositionsexperimenten gegen Ozon konnten jeweils und zeit- und konzentrationsabhängig vom NO₂ und in Abhängigkeit vom äußeren Mediumstand Vitalitätsverluste und Veränderungen der zellulären Parameter Zellzahl, Tetrazoliumsalzumsatz, Glutathion- und ATP-Gehalt im Vergleich zu Kontrollexpositionen gegen synthetische Luft bei Experimenten mit beiden Zellsysteme gemessen werden.

4 Diskussion

4.1 Das biologische Indikatorsystem

Humane Fibroblasten der Lunge wurden in Experimenten zur Entwicklung eines Systems für Untersuchungen der biologischen Aktivität atmosphärischer Gase *in vitro* eingesetzt. Ziel dieser Experimente war die Optimierung des Zellsystems für Expositionen in einem air/liquid-System, die Bereitstellung von analytischen Methoden zur Untersuchung des zellulären Status nach Expositionen und die Charakterisierung des kompletten Systems in Expositionen gegen Modellsubstanzen.

4.1.1 Auswahl des Zellsystems

Zur toxikologischen Prüfung einer Substanz erscheint das Zellsystem am geeignetsten, welches die Situation *in vivo* am ehesten repräsentiert. Für die hier vorliegende Fragestellung der Etablierung eines Systems zur Untersuchung der Wirkung inhalativ wirksamer Gase sind dies zunächst Zellen des menschlichen Respirationstraktes. Die Auswahl der Zielzellen muß sich an der Frage des Wirkortes der zu untersuchenden Substanz orientieren. Diese Frage ist jedoch nicht global für jedes atmosphärische Gas zu beantworten. In Bereichen des oberen Atemtraktes werden bereits 50 % aller eingeatmeten Gase und Partikel abgeschieden und erreichen nicht die unteren Atemwege (Menzel, 1993). Für den Weg in den unteren Teil des Atemweges bis hin zu den Alveolen entscheiden physikalisch/chemische Substanzeigenschaften wie z. B. ihre Wasserlöslichkeit und chemische Reaktivität und die Strömungsverhältnisse beim Atemvorgang über die maximale Transportweite in das Atemwegsystem. Für Ozon zeigen tierexperimentelle Daten in Übereinstimmung mit Modellrechnungen (Miller *et al.*, 1985) beispielsweise, daß die bronchioalveolären Bereiche deutlich stärker gegen Ozon exponiert werden als andere Teile des Atemtraktes (Menzel, 1993). Die sich demzufolge substanzabhängig unterscheidenden Wirkorte sind jedoch morphologisch und funktionell verschieden ausgestattet. So findet man im oberen Atemweg im Nasenbereich Zilien tragendes Nasenepithelgewebe, im unteren Teil der Trachea Bronchialepithel mit Zilien- und Becherzellen, das von Mukus bedeckt ist und innerhalb

der Alveoli Pneumozyten I und II unter einer Surfactant-Schicht. Das unter diesem Gesichtspunkt optimal zu bewertende biologische Testsystem müßte demzufolge stark an die zu untersuchende Substanz angepaßt sein, um relevante *in vivo*-Bedingungen nachzubilden.

In der vorliegenden Arbeit wurde jedoch keine experimentelle Lösung für die Studie einer Einzelsubstanz gesucht. Zielsetzung war die Entwicklung eines Systems zur Untersuchung verschiedener atmosphärischer Gase und Gasmischungen ohne Eingrenzung ihrer chemisch/physikalischen Eigenschaften. Eine exakte Abstimmung des Testsystems auf den Wirkort der Substanz wurde daher von vornherein ausgeschlossen. Die experimentelle Lösung sollte vielmehr einer weiteren Forderung gerecht werden, nämlich der Durchführung von Experimenten mit hoher Reproduzierbarkeit. Zellsysteme, die gerade einem hohen Anspruch im Hinblick auf die Reproduzierbarkeit gerecht werden, sind Zelllinien. Daher wurde daher als Kompromiß hinsichtlich der Erfüllung einer Spezies- und Organrelevanz bei möglichst guter Reproduzierbarkeit der Zellkulturführung ein kryokonservierbares, nicht immortalisiertes, humanes Zellsystem der Lunge in einer niedrigen Kulturpassage ausgewählt.

Der Zelltyp des ausgewählten Zellsystems, Fibroblasten, ist keiner, der *in vivo* in direkten Substanzkontakt kommt. Fibroblasten stehen dort nur mittelbar einer durch andere Zelltypen wie Epithel- oder Endothelzellen vermittelten Substanzwirkung gegenüber. Das biologische System wird in dieser Arbeit vielmehr als Indikatorsystem für die Detektion biologischer Wirkungen auf grundlegende zelluläre Prozesse verstanden. Dies steht in Übereinstimmung mit anderen *in vitro*-Ansätzen, die zum Teil sogar die Aspekte der Organ- und Speziesrelevanz unberücksichtigt lassen. So wurde die Zytotoxizität von Biomaterialien im Zahnersatz auf Maus-Fibroblasten untersucht (Yourtee *et al.*, 1994), Nahrungsmittelkontaminationen mit Fibroblasten der Hamster-Lunge (De Angelis *et al.*, 1994) und die biologische Aktivität von Mycotoxinen mit Maus-Fibroblasten (Terse *et al.*, 1993). Ebenso wurde die biologische Wirkung von Zigarettenrauch (Doolittle *et al.*, 1990; Salomaa *et al.*, 1988; Weitberg, 1993) oder Zigarettenrauchkondensat (Bombick *et al.*, 1998; Bombick *et al.*, 1997) mit Ovarialzellen des chinesischen Hamsters untersucht. In den meisten dieser Studien wurden Substanzwirkungen hinsichtlich der Vitalität des Zellsystems studiert und daher vorwiegend Vitalitätsmarker wie Neutralrot-Einschluß, Tetrazoliumsalzumsatz und ähnliche analysiert. Doch Fibroblasten werden auch als toxikologische Modelle für spezifische Fragestellungen eingesetzt. So wurden Fibroblasten-Zelllinien der Ratte und der Maus als Modell für molekular-toxikologische Fragestellungen etabliert (Erexson *et al.*, 1999) oder zur pharmakotoxikologischen Untersuchung von Collagensynthese und Fibrose eingesetzt (Frey *et al.*, 1980).

Die Frage, die sich für den Einsatz jedes biologischen Testsystems stellt, muß auf seine Funktionalität im Bereich der untersuchten Wirkungen gerichtet sein. Vor seiner Anwendung in einer toxikologischen Studie muß das System dahingehend charakterisiert werden, ob es für die untersuchten Endpunkte reproduzierbare Ergebnisse liefert, die im Sinne bekannter Mechanismen, zellulärer oder biochemischer

Zusammenhänge interpretierbar sind und die in anderen Arbeiten mit ähnlichen Systemen wiedergefunden werden können. Für die Fragestellung dieser Arbeit bedeutet dies die Charakterisierung des biologischen Indikatorsystems - bestehend aus dem Zellsystem humaner Lungenfibroblasten LK004 und der etablierten biochemischen Analytik - hinsichtlich seiner Eigenschaften bei Substanzwirkungen in Zusammenhang mit dem Modell „oxidativer Streß“.

Zu diesem Zweck sollen zunächst die Ergebnisse aus Untersuchungen des Zellkultursystems und der Etablierung der biochemischen Analytik diskutiert werden. Danach folgt die Diskussion der Ergebnisse aus Modellexpositionen gegen die Substanzen *tert.*-Butylhydroperoxid (tBuOOH), Wasserstoffperoxid und Zigarettenrauchkondensat (CSC) und die sich daraus ergebende Schlußfolgerung bzgl. der Eignung des Systems für den Einsatz in der beschriebenen Fragestellung.

4.1.2 Das Zellkultursystem humaner Lungenfibroblasten Lk004

Es wurde ein in der Medizinischen Hochschule Hannover etabliertes Zellsystem humaner Lungenfibroblasten (Aufderheide *et al.*, 1999) eingesetzt. Das Zellsystem war hinsichtlich Mykoplasmen, bakterieller Infektionserreger, Pilze, und viralem Profil getestet worden und hatte einen normalen, stabilen männlichen Karyotyp gezeigt. Unter proliferativen Bedingungen, das heißt bei Kultivierung unter Zusatz von fetalem Kälberserum (FKS) zum Kulturmedium, wurde in dieser Arbeit für das Zellsystem eine mittlere Verdopplungszeit von 24 Stunden gemessen. Dabei ließen sowohl die Meßergebnisse wie auch das mikroskopische Bild das Einsetzen einer Dichtebegrenzung erkennen. Die morphologische Erscheinung in konfluenter Kultur bipolarer Zellen, deren Länge bei paralleler nicht übereinander liegender Anordnung mehr als doppelt so groß ist wie ihre Breite, entsprach dem Erwartungsbild eines fibroblastenartigen Zelltyps (Freshney, 1990).

4.1.2.1 Kulturführung im nicht-proliferativen System

Ziel der Untersuchungen war der Einsatz einer serumfreien Kulturführung ohne Zusatz von FKS. Die Forderung ergab sich aus zwei Gründen. Einerseits stellt Serum eine sehr protein- und enzymhaltige Lösung dar. Protein findet man in Konzentrationen von 30 g/l, darunter z. B. Albumine in einer Größenordnung von 20 g/l. Lactat-Dehydrogenase und Alkalische-Phosphatase sind in einer Aktivität von etwa 300 - 400 U/l enthalten (Analyse Fa. Biochrom, Berlin). Allein diese Komponenten können durch quantitativ schwer zu erfassende Komplexierungs- oder andere chemische/enzymatische Reaktionen in Wechselwirkung mit der zu untersuchenden Substanz treten. Zum anderen enthält Serum eine große Anzahl von Substanzen wie Hormone und Wachstumsfaktoren, die entscheidenden Einfluß auf die Zellproliferation haben. Die Verwendung eines nicht-proliferierenden Zellkultursystem bei Studien biochemischer Veränderungen wurde angestrebt, um für den Zeitraum der Untersuchung eine konstante Zellmenge vorliegen zu haben. Die Überlagerung einer

Zellzahlveränderung durch Zellproliferation und der Veränderung biochemischer Endpunkte innerhalb jeder Einzelzelle sollte vermieden werden, um die Analyseergebnisse reproduzierbarer und eindeutiger interpretierbar zu machen.

Die Ergebnisse der Untersuchung der Kulturkinetiken des Zellsystems bei Kultivierung mit, bzw. ohne FKS zeigten eindeutig, daß durch Kulturführung ohne FKS ein nicht-proliferierendes Zellkultursystem erhalten wurde. Weiterhin zeigten die Ergebnisse der Untersuchung, daß die Lactat-Dehydrogenase-Freisetzung in das Kulturmedium - als Marker für Zytotoxizität - und die Aktivität der Glutathion-S-Transferasen - als Beispiel für eine Enzymaktivität außerhalb eines direkten Zusammenhanges zum Energiestoffwechsel der Zelle - zwischen proliferativem und nicht-proliferativem System nicht signifikant verschieden waren. Im Bereich des zellulären Energiestoffwechsels wurden jedoch deutliche Unterschiede zwischen beiden Systemen gefunden. Im nicht-proliferativen System war der Tetrazoliumsalzumsatz* deutlich höher und die Aktivität der Phosphofruktokinase deutlich niedriger als im proliferativen System.

Hinweise auf ähnlich veränderte Stoffwechselbedingungen beim Wechsel vom nicht-proliferativen zum proliferativen System wurden auch in anderen Arbeiten, z. B. bei der Untersuchung von Maus-Fibroblasten gefunden (Winkles, 1998). Durch die Studie des differentiellen mRNA-Expressionsmusters zwischen beiden Systemen ließ sich dort nachweisen, daß durch Wachstumsfaktoren und Serum Enzyme der Nukleotid- und DNA-Synthese sowie der Glucose-Metabolisierung induziert werden. Andere Untersuchungen an Ratten-Fibroblasten (Joaquin *et al.*, 1997) und Ratten-Hepatozyten-Primärkulturen (Joaquin *et al.*, 1996) belegen die Induzierbarkeit der 6-Phosphofrukto-2-Kinase durch Wachstumsfaktoren. Dieses Enzym katalysiert die Umsetzung von Fructose-6-Phosphat zu Fructose-2,6-bisphosphat (Van Schaftingen *et al.*, 1981a), welches wiederum als Aktivator der Phosphofruktokinase (Van Schaftingen *et al.*, 1981b) wirkt. Die diesbezüglich in dieser Arbeit gefundenen Ergebnisse reihen sich daher zwanglos in die genannten Zusammenhänge ein.

Eine Absenkung der glykolytischen Aktivität der Zelle bedeutet, daß der Synthesebeitrag an ATP, den die Glykolyse direkt pro Glukosemolekül liefert, wegfällt. Dies sind zwei Moleküle ATP und zwei Moleküle NADH, die in der oxidativen Phosphorylierung zur Synthese von zwei weiteren Molekülen ATP genutzt werden können. Der fehlende Beitrag muß zur Erhaltung des Energiestoffwechsels der Zelle ausgeglichen werden. Nimmt man an, daß dieser Ausgleich durch erhöhte Verarbeitung von NADH und FADH₂ aus anderen Quellen als der Glykolyse - etwa der β -Oxidation der Fettsäuren - in der mitochondrialen Atmungskette erreicht wird, so wäre dies eine Erklärung für den deutlich erhöhten Tetrazoliumsalzumsatz, der bei Umstellung vom proliferativen System zum nicht-proliferativen System gefunden wurden.

* Tetrazoliumsalzumsätze sind häufig eingesetzte Assays zur Untersuchung der Zellzahl und der Zellvitälität (Mosmann, 1983). Sie beruhen auf der Reduktion verschiedener Tetrazoliumsalze (WST, MTT, INT, MTT und andere) vorwiegend durch Aktivitäten in der mitochondrialen Atmungskette (Slater *et al.*, 1963). Sie werden daher üblicherweise als Maß für die mitochondriale Aktivität interpretiert.

Die proliferative Phase der Kultur wurde zur besseren Adaption der Zellen und Einsparung von Zellmaterial verlängert. Die mit diesem System erhaltenen Ergebnisse ließen - ebenso wie der Zusatz von Natrium-Selenit in einer Konzentration von 60 nmol/l - weder eine verringerte Reproduzierbarkeit noch andere nachteilige Einflüsse auf das Zellsystem erkennen.

4.1.2.2 Etablierung einer Kulturführung für air/liquid-Bedingungen

Zielsetzung für die zu etablierende Kulturführung war die Einsetzbarkeit des Systems für die Untersuchung atmosphärischer Gase. Wie in der Einleitung dargestellt, sollte dabei das zu untersuchende Gas nativ, d.h. ohne Beimengung von Kohlendioxid eingesetzt werden können.

Kohlendioxid wird üblicherweise bei der Zellkultivierung in der Gasphase des Inkubators in einem Volumenanteil von 5 - 10 % zur Stabilisierung des pH-Wertes im Kulturmedium eingesetzt. Aus der temperaturabhängigen Löslichkeit des Gases CO_2 im Medium, dem Partialdruck des Gases über der flüssigen Phase und der Natriumhydrogencarbonat-Konzentration im Kulturmedium ergibt sich im Gleichgewicht ein pH-Wert, der für die eingesetzte Zelllinie bei pH 7,3 liegen sollte. Dieses System liefert Kohlendioxid gewissermaßen in einem unendlichen Überschuß nach. Dadurch ist es möglich, auch für eine längere Kulturdauer, in der viele saure zelluläre Stoffwechselprodukte entstehen und trotz der niedrigen Pufferkapazität des eingesetzten Hydrogencarbonat-Puffers (4 - 24 mmol/l) einen konstanten pH-Wert zu sichern.

Für die Etablierung eines Systems, welches diesen pH-Wert für den begrenzten Zeitraum einiger Stunden auch für einen atmosphärischen Volumenanteil von 0,03 % gewährleisten kann, gibt es verschiedene Möglichkeiten.

- Die Kultivierung des Zellsystems ohne Natriumhydrogencarbonat oder sonstige Pufferung.

Dieser Ansatz wurde bei den Experimenten zu Gasexpositionen nach gängigem air/liquid-Konzept mit Lungenzellen der Ratte gewählt. Er erwies sich dort für die durchgeführten orientierenden Experimente als tragfähig. Doch barg er einige Nachteile, die im Rahmen der durchgeführten Weiterentwicklung des Expositions-konzeptes abgebaut werden sollten.

So ist eine durchgehende Kultivierung der Zellen von der Anzucht über den Expositionszeitraum bis zu einer potentiellen Nachinkubation in diesem System nicht möglich. Die zelltypspezifischen Kulturbedingungen für R3/1-Rattenzellen sehen für die Anzuchtphase einen CO_2 Partialdruck von 10 % im Brutschrank vor. Bei diesem Partialdruck kann ein ungepuffertes Kultursystem nicht inkubiert werden. Daher mußte direkt mit Einsetzen der Exposition eine Umstellung der Zellkultur vom System mit Carbonatpuffer auf ein System ohne Carbonatpuffer erfolgen. Ein so drastischer Wechsel der Kulturbedingungen mit gleichzeitigem Expositionsbeginn bedeutet eine Überlagerung zweier Effekte, die sich beide auf die Vitalität des Zellsystems auswirken müssen und analytisch bei der folgenden Bewertung des

Expositionseffektes nicht voneinander zu trennen sind. Die gleiche Umstellung muß wiederum vor einer potentiellen Nachinkubation erfolgen, wo sie gleichermaßen zu bewerten ist.

Vorwiegend saure Stoffwechselprodukte der Zellen werden nicht abgepuffert, damit ist eine längerfristige Kultivierung in einem derartigen Kulturmedium von vornherein ausgeschlossen.

Es ist bekannt, daß Zellkulturen das System $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-/\text{H}_2\text{CO}_3$ längerfristig zum Vitalitätserhalt benötigen (Freshney, 1990), so daß dies grundsätzlich keine optimale Lösung sein kann.

- Die Kultivierung des Zellsystems bei einer Natriumhydrogencarbonat-Konzentration von 4 mmol/l.
Dies ist die Gleichgewichtskonzentration zum Erhalt eines pH-Wertes von 7,3 - 7,4 bei einem Partialdruck von 0,03 % in der Gasphase (Freshney, 1990). Auch hier muß beim Übergang von den Kultur- zu den Expositionsbedingungen ein Mediumwechsel mit deutlicher Änderung der Kulturbedingungen vorgenommen werden, da dieses Medium für die Inkubation im Brutschrank unter zelltypspezifischen Standardbedingungen nicht geeignet ist.
- Ein erhöhter Zusatz von Natriumpyruvat zum Kulturmedium.
Hierdurch kann die endogene CO_2 -Produktion der Zellen so gesteigert werden, daß bei atmosphärischem Kohlendioxid-Partialdruck keine zusätzliche Hydrogencarbonat Pufferung nötig ist (Leibowitz, 1963). Doch auch hier stellt sich wie bei den beiden anderen vorgestellten Lösungsmöglichkeiten das Problem der Inkompatibilität mit den zelltypspezifischen Kulturbedingungen.
- Der Tausch des Hydrogencarbonat-Puffersystems gegen eines, das nicht mit der Kohlendioxid-Konzentration der darüber befindlichen Gasphase in Wechselwirkung steht.
Zu diesem Zweck können Puffer wie HEPES oder TRICIN eingesetzt werden (Good *et al.*, 1966), die aufgrund relativer hoher Pufferkapazität auch über einen Zeitraum einen stabilen pH-Wert garantieren. Es wurde jedoch festgestellt, daß eine Kulturführung ausschließlich mit diesen Puffersystemen ohne Hydrogencarbonat von vielen Kultursystemen nicht toleriert wird (Itagaki *et al.*, 1974).

Das in dieser Arbeit verwendete Konzept sieht eine Pufferung durch Natriumhydrogencarbonat in einer Konzentration von 24 mmol/l entsprechend dem Volumenanteil von 5 % Kohlendioxid im Brutschrank unter zelltypspezifischen Bedingungen vor. Zusätzlich wird der pH-Wert durch HEPES gepuffert. Durch diese Kombination sollte erreicht werden, daß bei Einhaltung zelltypspezifischer Bedingungen eine Stabilisierung des pH-Wertes bei Absinken des Volumenanteils von Kohlendioxid auf 0,03 % gewährleistet ist. Diese Stabilisierung kann nur für einen sehr begrenzten Zeitraum wirksam sein, da auch hier die Diffusion von CO_2 aus dem Kulturmedium in die Gasphase nicht verhindert werden kann. Im experimentellen Aufbau sollte durch

(1) einen räumlich minimierten Kontakt (durch physikalische Trennung der Expositionsatmosphäre und des Kulturmediums) und (2) einen zeitlich minimierten Kontakt (durch einen Mediumfluß) diesem Effekt vorgebeugt werden. Die zusätzliche Verwendung des Puffersystems Hepes sollte seinen negativen Einfluß weiterhin vernachlässigbar machen. Zur Umsetzung dieses Konzeptes wurde der Einfluß des Hepes-Puffers im serumfreien Kulturmedium auf die Vitalität von Lk004- und HFBE-Zellen überprüft. Es konnte kein negativer Effekt festgestellt werden.

4.1.2.3 Kultivierung im air/liquid-System

Die Ergebnisse der Kultivierung beider Zellkultursysteme in Transwell-Inserts auf mikroporöser Membran der Porengröße 0,4 µm nach der Kulturführung „nicht-proliferatives System mit proliferativer Vorkultur“ und Verwendung von Natriumhydrogencarbonat-/Hepes-gepuffertem Kulturmedium werden im Abschnitt „Ergebnisse - Expositionen gegen Modellgase im neu entwickelten Aufbau, Expositionen ohne Gasfluß“ gezeigt. Sie dokumentieren, daß Zellen des Zellsystems Lk004 - beurteilt nach den Parametern Zellzahl und Tetrazoliumsalzumsatz - auf diese Weise submers ohne Vitalitätsverlust für einen Zeitraum von mindestens 24 Stunden nach einem potentiellen Expositionsbeginn kultiviert werden konnten. HFBE-Zellen erlitten in diesem Zeitraum einen leichten Vitalitätsverlust (Zellzahl) von etwa 10 %.

Auch die Exposition gegen Raumluft (ca. 50 % rH/25 °C, 0,03 % CO₂) in einem air/liquid-System ohne Gasfluß über den Zellen wurde für einen Zeitraum von bis zu 120 Minuten von beiden Zellsystemen toleriert. In diesem System lagen die Zellen apikal frei gegen die Umgebungsluft und wurden basal durch die mikroporöse Membran mit Feuchtigkeit und Nährstoffen aus dem Kulturmedium versorgt. Ein möglichst effektiver Kontakt der Zellen mit der Gasphase wurde dabei durch restlose Entfernung des Kulturmediumüberstandes und Spülen der Zellen mit PBS erreicht.

Schon an diesen Ergebnissen werden zwei Aspekte sichtbar, die für die im folgenden diskutierten Ergebnisse von Expositionen gegen atmosphärische Gase von Bedeutung waren.

Zum einen dokumentiert sich in den Ergebnissen der Analyse des ATP-Gehaltes, des ATP/ADP-Verhältnisses, der Analyse des Tetrazoliumsalzumsatzes nach 24stündiger Nachinkubation bei beiden Zellsystemen, sowie in den Ergebnissen der Analyse des Tetrazoliumsalzumsatzes nach 2stündiger Nachinkubation im Zellsystem HFBE, ein deutlicher Einfluß der Höhe des äußeren Mediumspiegels (vgl. Kapitel 4.2.1.4) um das Transwell-Insert auf den Zellstatus.

Zum anderen belegen die Ergebnisse gleichartiger Expositionen der Zellen nicht gegen Raumluft, sondern gegen Brutschrankatmosphäre (ca. 95 % rH/37 °C, 5 % CO₂) einen Kontakt der Zellen mit der darüber liegenden Gasphase. In allen dazu durchgeführten experimentellen Stichproben wurden Ergebnisse erhalten, die nach derartigen Expositionen einen höheren Vitalitätsverlust der Zellen als nach Expositionen gegen Raumluft schließen lassen. Die Zellzahl, der Tetrazoliumsalzumsatz, der ATP-Gehalt und das ATP/ADP-Verhältnis waren gegenüber den Expositionen gegen Raumluft verringert.

Da der Zellmonolayer vor der Exposition mit PBS gespült wurde und Flüssigkeitsreste so vollständig wie möglich entfernt wurden, stand den Zellen apikal kein Hydrogencarbonat-Puffersystem zur Verfügung. Die Lösung des CO₂ aus der Gasphase in dem verbleibenden Flüssigkeitsfilm konnte demzufolge eine deutlichen Azidifizierung bewirken. Die Ergebnisse sprechen dafür, daß dieser negative Effekt auf die Zellsysteme schwerer wirkte als der positive Effekt einer vollständigen Humidifizierung durch die bei 37 °C an Feuchtigkeit gesättigte Brutschrankatmosphäre.

Abschließend betrachtet wurden durch die durchgeführten Veränderungen in der Kulturführung - Umstellung auf nicht-proliferatives System, Verlängerung der Proliferationsphase, Einführung einer Vorkultur mit Selenzusatz, Kultivierung mit zusätzlichem Hepes-Puffersystem und Kultivierung der Zellsysteme auf mikroporösen Membranen - die erwarteten Effekte erzielt. Die erhaltenen Ergebnisse sind vor dem Hintergrund anderer Arbeiten sinnvoll interpretierbar. Das Zellkultursystem humaner Lungenfibroblasten Lk004 wurde deshalb als geeignet erachtet, in die Etablierung eines biologischen Indikatorsystems für die folgenden Screening-Experimente in Mikrotiterplatten und in Experimente zur Exposition von Zellen gegen atmosphärische Gase einbezogen zu werden.

4.1.3 Analytische Assays

Es wurden Methoden zur analytischen Bestimmung biochemischer Parameter an eukaryontischen Zellkulturen etabliert. Die Methoden wurden für die Anwendung an kleinen Zellaussaaten in Mikrotiterplatten und in Transwell-Inserts mit einer Wachstumsfläche von 0,3 bis 1,09 cm² optimiert. Die Parameter beziehen sich auf drei zelluläre mechanistische Zusammenhänge hinsichtlich (1) allgemeiner Zellvitalität, (2) dem zellulären Energiestoffwechsel und (3) dem Glutathion-Redox-Zyklus, einem Ausschnitt aus bekannten Mechanismen des Reaktionsmodells „oxidativer Streß“.

Die Kriterien, nach denen diese Methoden bewertet werden sollen, sind die Durchführbarkeit der Bestimmung, ihre Reproduzierbarkeit, Sensitivität, und Spezifität im Rahmen der angestrebten Anwendung.

4.1.3.1 Durchführbarkeit

Zielsetzung für die Anwendung der Methoden war die Untersuchung der biologischen Wirkung von Modellsubstanzen zur Charakterisierung des biologischen Indikatorsystems und der biologischen Wirkung von atmosphärischen Gasen. Ein wesentliches Kriterium für die Durchführbarkeit der Messung verschiedener Endpunkte in kurzen kinetischen Intervallen war eine unaufwendige Probenaufarbeitung und ein möglichst einheitliches Arbeitsschema für alle durchzuführenden Methoden. Aus diesem Grund wurden die etablierten Methoden nach Möglichkeit in die gleiche Formulierung aus „Extraktionsschritt“, „Vorinkubation“, „Premix“, „Startreagenz“ und „Messung“ gebracht. Durch diese pragmatische Maßnahme war es möglich, in einem einzigen Experiment unter Einsatz von Mikrotiterplatten kinetische Messungen zu verschiedenen

Endpunkten mit 6 Meßwiederholungen mit nur geringem zeitlichen Versatz durchzuführen.

Ein Beispiel hierfür bieten die Expositionen gegen Zigarettenrauchkondensat. Hier wurden innerhalb eines Experimentes die Parameter DNA-Gehalt, Tetrazoliumsalzumsatz und die Aktivitäten der Enzyme Glutathion-Peroxidase, Superoxid-Dismutase, Glutathion-S-Transferasen und Katalase für verschiedene Zeitwerte (Meßzeitpunkte nach 1 Stunde, 6 und 24 Stunden) bestimmt. Die restlichen Endpunkte - die Aktivitäten der Phosphofruktokinase, der Enolase, der Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase, der Glutathion-Reduktase, die LDH-Freisetzung in das Kulturmedium, der Gehalt an Adenosinphosphaten ATP, ADP und AMP und der Gehalt an Gesamtglutathion sowie oxidiertem und reduziertem Glutathion - konnten in nur zwei weiteren experimentellen Durchläufen analysiert werden. Dabei wurde in jedem Experiment, unabhängig von den sonst durchgeführten Bestimmungen, der DNA-Gehalt und der Tetrazoliumsalzumsatz untersucht. Auf diese Weise konnten die Experimente auf ihre Vergleichbarkeit untersucht werden. Insgesamt wurden in diesen Expositionen für die Bestimmung von 14 Endpunkten in mindestens 3 unabhängigen Experimenten mit jeweils 6 Meßwiederholungen bei 3 kinetischen Zeitwerten nur neun Einzelexperimente benötigt. Für den Parameter Glutathion wurde die Zahl unabhängiger Experimente erhöht, da nach drei Einzelexperimenten höhere Schwankungsbreiten als in den anderen Parametern erhalten wurden. Nach Verdoppelung der Anzahl unabhängiger Experimente veränderte sich diese jedoch nicht, so daß sie in Zusammenhang mit der starken Relevanz dieses Parameters bei der Exposition gegen Zigarettenrauchkondensat als biologisch-systemische Schwankung interpretiert wurde.

4.1.3.2 Reproduzierbarkeit

Die Reproduzierbarkeit der analytischen Assays wurde in dieser Arbeit durch Messung von Eichgeraden mit kommerziellen Reagenzien als Standards überprüft. In der Regel wurden dabei Regressionskoeffizienten mit einem Werte $R^2 > 0,99$ gefunden. Standardabweichungen bei Meßwiederholungen lagen in der Größenordnung von 5 % des Meßwertes oder niedriger. Damit lag die Schwankungsbreite unterhalb derjenigen des Zellsystems, bei dem üblicherweise bei der Untersuchung des Zellwachstums solche in der Größenordnung von 5 - 10 % gefunden wurden.

4.1.3.3 Sensitivität

Das Kriterium für die Sensitivität der analytischen Methoden war die Meßbarkeit des entsprechenden Endpunktes in Mikrotiterplatten-Aussaaten, das heißt in einer Zellmenge von 5000 - 20000 Zellen. Hier zeigte sich, daß die Messung von enzymatischen Aktivitäten mit hoher zellulärer Aktivität wie der Phosphofruktokinase, der Enolase und der Katalase durch die Anpassung einfacher photometrischer Assays realisierbar war. Für andere Endpunkte war dies nicht der Fall. Die Aktivitäten der Superoxid-Dismutase, der Glutathion-Peroxidase, der Glutathion-Reduktase und der Gehalt an oxidiertem Glutathion, an ADP und AMP waren nur nach Auswahl einer

geeigneten Alternativmethode oder eingehenden Veränderungen der Assay-Bedingungen erfaßbar. Die Experimente zu Modell- und Gasexpositionen zeigten jedoch, daß die Assays in der vorliegenden Form dann eine ausreichende Sensitivität zur sicheren Detektion der entsprechenden Endpunkte *in vitro* boten.

4.1.3.4 Spezifität

Die Spezifität der analytischen Bestimmungen ist ein Aspekt, der von Endpunkt zu Endpunkt verschieden zu bewerten ist und daher für die Methoden einzeln diskutiert werden soll.

Methoden der Zellzahlquantifizierung

Methoden der Zellzahlquantifizierung wurden nach Exposition von Zellen gegen eine Prüfsubstanz in zwei Zielrichtungen verfolgt. Einerseits wurden sie zur Abschätzung der toxischen Wirkung der Substanz in Form einer Verringerung der Lebendzellzahl durchgeführt. Andererseits sollten die Veränderungen anderer Parameter wie z. B. Enzymaktivitäten zellspezifisch, also für die Einzelzelle betrachtet werden. Hierfür war eine Normierungsgröße notwendig, wobei dieser Parameter möglichst präzise die Anzahl lebensfähiger Zellen erfassen sollte. Es mußte demzufolge ein Meßwert ermittelt werden, der pro Zelle, möglichst unabhängig vom zellulären Stoffwechselstatus, eine konstante Größe hat.

Der Proteingehalt der Zellen ist im wesentlichen von zwei Faktoren abhängig, dem intrazellulären Proteinstoffwechsel und dem Proteingehalt des Mediums. Zudem bestehen viele Methoden zur Proteinbestimmung aus einer Anfärbung mit Farbstoff und anschließender Entfernung nicht gebundenen Reagenzes durch Waschschriffe. Damit ist eine deutliche Abhängigkeit des Analyseergebnisses auch von der methodischen Durchführung gegeben.

Der DNA-Gehalt sollte im nicht-proliferativen System direkt proportional der Zellzahl sein. Da durch methodische Maßnahmen eine Mitbestimmung von RNA unterdrückt werden sollte (vgl. Kapitel 3.3.1), ist diese Bestimmung demzufolge prinzipiell nur abhängig von der Spezifität der Analytik für doppelsträngige DNA, welche bei den eingesetzten Interkalationsfluorophoren als hoch eingeschätzt werden kann.

In der elektronischen Zellzahlbestimmung wird die Anzahl der Zellen in Abhängigkeit von ihrem Durchmesser erfaßt. Aus diesem Grund lassen sich Zelltrümmer, „tote“ und vitale Zellen prinzipiell voneinander unterscheiden, so daß diese Messung am ehesten einer „Lebendzellzahlbestimmung“ entspricht.

Messung von Enzymaktivitäten

Die Spezifität der etablierten Methoden wird durch die Möglichkeiten der Umsetzung des im Assay angebotenen Substrates im Zellextrakt bestimmt. Dabei ist einerseits möglich, daß das angebotene Substrat von verschiedenen zellulären Aktivitäten umgesetzt werden kann. In diesem Fall wäre das Meßergebnis dem falschen Endpunkt zugeordnet. Die andere Möglichkeit besteht darin, daß Isoformen des gleichen Enzyms

das Substrat mit unterschiedlicher Effizienz umsetzen. Im Extremfall bedeutete dies, nur einen Teil der zellulären Aktivität des entsprechenden Endpunktes zu erfassen. Assays, für die einer dieser Effekte wahrscheinlich ist, sollen im folgenden diskutiert werden.

Die Glutathion-Peroxidase trägt im aktiven Zentrum ein Selenatom. Zur Steigerung der Meßbarkeit dieser Aktivität wurde dieser Arbeit eine Vorinkubation der kultivierten Zellen mit Selen zur Induktion des Enzyms durchgeführt. Screeningexperimente zur toxischen Wirkung des verwendeten Natrium-Selenits hatten zu einer Inkubationskonzentration von 60 nmol/l Na_2SeO_3 geführt, einer Konzentration die in anderen Arbeiten zu dem gleichen Zweck eingesetzt wurde (Ochi, 1990; Ochi *et al.*, 1989). Die Messung der Glutathion-Peroxidase-Aktivität zeigte hier eine deutliche Erhöhung bei unveränderter Aktivität der Glutathion-Reduktase als nicht Selen-abhängiges Enzym.

Man unterscheidet verschiedene Selen-abhängige Isoenzyme unter den Glutathion-Peroxidasen. Die klassische zelluläre Glutathion-Peroxidase (Rotruck *et al.*, 1973), die Phospholipid-Hydroperoxid-Glutathion-Peroxidase (Maiorino *et al.*, 1990), und die Plasma-Glutathion-Peroxidase (Maddipati *et al.*, 1987; Takahashi *et al.*, 1987). Es wurde ein weiteres Isoenzym gefunden, dessen Aktivität aber nur in anderem als humanem Lungengewebe nachgewiesen werden konnte (Chu *et al.*, 1993). Die klassische Glutathion-Peroxidase und die Plasma-Glutathion-Peroxidase haben ähnliche Substratspezifitäten. Sie setzen Wasserstoffperoxid ebenso wie Fettsäurehydroperoxide und *tert.*-Butylhydroperoxid mit hoher Effizienz um, aber reagieren weniger gut mit Phospholipid-Hydroperoxiden und Cholesterol-Hydroperoxiden. Für die Phospholipid-Hydroperoxid-Glutathion-Reduktase liegen die Verhältnisse genau andersherum. Ebenfalls sind Glutathion-Peroxidase-Aktivitäten von Glutathion-S-Transferase-Proteinen bekannt, die vorwiegend mit Cumenhydroperoxid und Wasserstoffperoxid reagieren (Carmagnol *et al.*, 1983; Lawrence *et al.*, 1976).

In der Zusammenfassung dieser theoretischen Betrachtung ergibt sich damit, daß in die hier durchgeführte Analytik - der Messung unter Verwendung von *tert.*-Butylhydroperoxid - vorwiegend die Aktivität der Selen-abhängigen, klassischen Glutathion-Peroxidase eingehen sollte. Die experimentell nachgewiesene deutliche Induzierbarkeit der Aktivität bestätigt diese Annahme.

Glutathion-S-Transferasen katalysieren Konjugationsreaktionen zwischen vielen hydrophoben Elektrophilen und Glutathion (Habig *et al.*, 1974). Es handelt sich um eine Gruppe von Isoenzymen, die in der Rattenleber zum Teil im Zytosol (Tipping *et al.*, 1981) und zum Teil im endoplasmatischen Retikulum lokalisiert sind (Morgenstern *et al.*, 1983). Die Isoenzyme haben eine unterschiedliche Affinität zu verschiedenen Substraten und auch zu CDNB, welches als das zumeist in der Aktivitätsbestimmung eingesetzte Substrat auch in dieser Arbeit Verwendung findet (Alin *et al.*, 1985; Habig *et al.*, 1974; Vandenberghe *et al.*, 1988). Damit werden in diesem Assay ausschließlich Glutathion-S-Transferasen erfaßt, jedoch spiegelt das Meßergebnis nur einen nicht charakterisierten Ausschnitt der zellulären Aktivitäten dieses Typs wieder.

Die Katalase setzt Wasserstoffperoxid um. Dieses Substrat wird ebenfalls durch Glutathion-Peroxidasen umgesetzt. Eine Messung des Wasserstoffabbaus (Aebi, 1974) im nicht aufgereinigten Enzymextrakt aus kultivierten Zellen würde demzufolge die Gesamtaktivität beider Enzyme erfassen. Innerhalb der in dieser Arbeit verwendeten Methoden wird die Glutathion-Peroxidase-Aktivität jedoch unter Verwendung von *tert.*-Butylhydroperoxid und die Katalase als peroxidative Aktivität (vgl. Kapitel 3.3.3), das heißt unter Umsetzung von Wasserstoffperoxid und Methanol, gemessen. Ein gegenseitiger Einfluß auf das Ergebnis der Analyse der Enzymaktivität ist mithin auszuschließen.

Sauerstoffradikale O_2^{\bullet} werden durch die Superoxid-Dismutasen zu Wasserstoffperoxid umgesetzt. In der analytischen Reaktion (vgl. Kapitel 3.3.7) wird gemessen, welcher Anteil an einer angebotenen Gesamtmenge Radikale durch ein Radikal-Scavenger-System abgefangen wird. Das Radikal-Scavenger-System kann durch die Superoxid-Dismutase gestellt werden, es kann aber auch jedes andere Molekül sein, das in der Lage ist, mit Superoxidradikalen in Reaktion zu treten. Es wurden verschiedene zelluläre Bestandteile identifiziert, die als „Superoxid-Dismutase Mimics“ dafür in Frage kommen (Kim *et al.*, 1995). Unter den wasserlöslichen Molekülen waren dies vorwiegend Ascorbinsäure, Ascorbinsäure-6-palmitat, reduziertes Glutathion und verschiedene Katchine. Lecithin wurde als eine lipidlösliche Substanz mit derartigen Eigenschaften identifiziert. In einer weiteren Studie wurden verschiedene Eisen- und Mangankomplexe untersucht und auch unter ihnen Stoffe mit ähnlichen Eigenschaften gefunden (Weiss *et al.*, 1993).

Durch den Extraktionsschritt wird eine Vorauswahl unter den zellulären Bestandteilen getroffen. So ist beispielweise nicht damit zu rechnen, daß reduziertes Glutathion in die Reaktion eingeht, denn durch die neutrale Enzymextraktion in Triton X-100 werden zelluläre Enzyme nicht denaturiert, und daher werden Metaboliten wie ATP, NADH, reduziertes Glutathion etc. weiterhin umgesetzt oder können Kopplungsreaktionen mit Proteinen eingehen (Griffith, 1985). Grundsätzlich ist die Spezifität einer derartigen Messung für die Superoxid-Dismutase-Aktivität jedoch als gering einzuschätzen. Diese Überlegung trifft auf alle Reaktionssysteme zur Analyse der Superoxid-Dismutase-Aktivität zu, die nach dem verwendeten Prinzip mit Radikalerzeugungs-, und Detektorreaktion ablaufen, unabhängig von der Art der verwendeten Systeme zur Radikalerzeugung und -detektion. Insofern mußte diese geringe Spezifität akzeptiert werden.

Es sind verschiedene Superoxid-Dismutasen bekannt. Unter ihnen die mitochondriale Mangan-Superoxid-Dismutase (MnSOD), die zytosolische Kupfer-Zink-Superoxid-Dismutase (CuZnSOD) und extrazelluläre Superoxid-Dismutasen (EcSOD). Man weiß weiterhin, daß die verschiedenen Dismutasen bei toxikologisch relevanten Prozessen unterschiedlichen Regulatorien unterliegen. So wurde z. B. bei der Exposition von Ratten gegen Zigarettenrauch eine Erhöhung der MnSOD-, nicht aber der CuZnSOD-Expression gemessen (Gilks *et al.*, 1998). Es stellt sich somit hier eine ähnliche Situation wie bei der Analyse der Glutathion-S-Transferasen dar. Es wird die Summe der Aktivitäten

verschiedener Superoxid-Dismutasen erfaßt, die im Assay nicht unterschieden werden können. Diese Limitation kann jedoch bei Bedarf ausgesetzt werden. Kupfer-Zink- und Mangan-Superoxid-Dismutasen zeigen eine unterschiedliche Sensitivität gegenüber Zyanid und N,N-Diethyldithiocarbamat (DDC). Durch Zusatz eines dieser Reagenzien sind die Enzyme im Assay unterscheidbar. Es konnte gezeigt werden, daß DDC zur Hemmung der CuZnSOD auch in der hier verwendeten analytischen Methode benutzt werden kann (Corbisier *et al.*, 1987). Eine Erweiterung des Assays unter diesem Gesichtspunkt erscheint jedoch nur dann sinnvoll, wenn durch eine andere Methode, z. B. der Analyse der Enzymexpression über eine mRNA-Analytik, detailliertere Untersuchungen möglich sind.

Messung von Glutathion und Adenosinphosphaten

Methoden zur Messung der Konzentrationen von Glutathion und Adenosinphosphaten wurden so etabliert, daß die Ergebnisse zweier prinzipiell völlig verschiedener Meßmethoden zur Validierung der Analyse verglichen werden können. Die zelluläre Gesamtmenge Glutathion wird enzymatisch gemessen und reduziertes und oxidiertes Glutathion getrennt voneinander auf der HPLC nachgewiesen. Der ATP-Gehalt wird einerseits luminometrisch bestimmt und andererseits neben ADP und AMP per HPLC analysiert. Somit ist die Spezifität bei einem übereinstimmenden Analyseergebnis beider Methoden für den Nachweis von ATP als hoch einzuschätzen.

Für die Messung von Glutathion im enzymatischen Recycling-Assay muß dieser Aspekt anders beurteilt werden. Die Spezifität der im Enzymassay eingesetzten Glutathion-Reduktase für oxidiertes Glutathion ist nicht so hoch wie die Spezifität der Luziferase für ATP. Der Tietze-Assay beruht beispielsweise darauf, daß neben oxidiertem Glutathion auch das Kopplungsprodukt zwischen reduziertem Glutathion und DTNB durch die Glutathion-Reduktase umgesetzt wird. Man weiß, daß das gemischte Disulfid aus GSH und Cystein nicht in der Reaktion erfaßt wird, wohingegen die Glutathion-Reduktase das gemischte Disulfid aus GSH und γ -Glutamylcystein umsetzt. Die Spezifität hinsichtlich Glutathionanalogen wie Aspartathion und γ -Glutamylcysteinyl- β -alanin ist nicht bekannt (Griffith, 1985). Es ist weiterhin anzunehmen, daß die verschiedenen, von der Glutathion-Reduktase umgesetzten Substrate mit unterschiedlicher Geschwindigkeit reagieren, so daß ihr Beitrag zur Recycling-Reaktion substanzabhängig wird.

Reduziertes Glutathion kommt intrazellulär hingegen in einem deutlichen Konzentrationsüberschuß gegenüber jedem anderen zellulären Thiol vor. Insgesamt bedeutet dies, daß das Analyseergebnis vorwiegend die Konzentration von reduziertem Glutathion widerspiegelt, in dem zusätzlich oxidiertes Glutathion und Kopplungsprodukte mit kleinen Polypeptiden erfaßt werden. Die Vergleichbarkeit der Ergebnisse zum Gesamtglutathion-Gehalt und Gehalt an reduziertem Glutathion nach Exposition von Lk004-Zellen gegen Zigarettenrauchkondensat (vgl. Kapitel Exposition gegen Zigarettenrauchkondensat 3.5, Abb. 3.71) bestätigt diese Annahme.

4.1.3.5 Abschließende Betrachtung

Zur eingehenden Studie der Veränderung von enzymatischen Aktivitäten und mechanistischen Zusammenhängen nach toxikologisch relevanten Ereignissen müßten weitere Methoden einbezogen werden. Durch die Messung der apparenten Enzymaktivität und einzelner Stoffwechselmetaboliten kann diese Fragestellung nur ausschnitthaft behandelt werden. Aktivierungen bzw. Inaktivierungen von Enzymaktivitäten beispielsweise sind unter anderem durch transkriptionelle Kontrolle möglich, durch Veränderungen der mRNA-Stabilität, durch translationelle Eingriffe, durch Transportvorgänge und durch Phosphorylierungsreaktion und allosterische Kontrolle des aktiven Proteins. Zur vollständigen Klärung derartiger Fragestellungen wären folglich z. B. Untersuchungen des zugehörigen mRNA-Transkriptes, der zugehörigen Proteinmasse oder der Phosphorylierung notwendig.

In der hier relevanten Fragestellung, der Untersuchung von Zellkulturen nach Expositionen gegen Gase und in Screening-Experimenten, sollten jedoch keine Erkenntnisse zu vollständigen Mechanismen der Enzyminduktion oder -inhibition o. ä. gewonnen werden. Es sollte vielmehr ein System etabliert werden, das biologische Effekte von Gasen oder anderen Substanzen auf ausgewählte mechanistische Zusammenhänge im Zellsystem qualitativ und reproduzierbar dokumentiert. Die Ergebnisse der Etablierung biochemischer Analysemethoden lassen diese nach den Gesichtspunkten Spezifität, Sensitivität, Reproduzierbarkeit und Durchführbarkeit dafür geeignet erscheinen. Modellexpositionen gegen *tert.*-Butylhydroperoxid, Wasserstoffperoxid und Zigarettenrauchkondensat sollten dokumentieren, inwieweit das gesamte biologische Indikatorsystem, bestehend aus Zellsystem und biochemischer Analytik, diese Zielsetzung erfüllen kann.

4.1.4 Expositionen gegen Modellsubstanzen

Zur Charakterisierung der Eigenschaften des biologischen Indikatorsystems und zur Prüfung auf seine Eignung zur späteren Untersuchung von atmosphärischen Gasen wurden submerse Expositionen gegen Modellsubstanzen durchgeführt. Ziel dieser Experimente war die Überprüfung folgender Fragestellungen:

- Ist die Reproduzierbarkeit des Systems ausreichend zur Untersuchung zeit- und konzentrationsabhängiger Substanzwirkungen?
- Können substanzspezifische Effekte determiniert werden?
- Können Abläufe nach den Zusammenhängen des vorgestellten Reaktionmodells detektiert werden?
- Ist die Vitalität des Zellsystems ausreichend, um durch anti-oxidative Mechanismen erfolgreich oxidative Substanzwirkungen abzuwehren?
- Sind die Ergebnisse vor dem Hintergrund bekannter Substanzeffekte sinnvoll interpretierbar?

Als Modellschubstanzen wurden Wasserstoffperoxid, *tert.*-Butylhydroperoxid (tBuOOH) und Zigarettenrauchkondensat (CSC) ausgewählt. H₂O₂ und tBuOOH sind gut, bzw. mäßig wasserlösliche Reagenzien, die häufig als Modellschubstanzen für oxidativen Streß eingesetzt werden. Im Molekül R-OOH tragen sie die gleiche reaktive Peroxygruppe -OOH und unterscheiden sich durch den Rest R-, der im Falle des tBuOOH eine höhere Lipophilie der Substanz bewirkt. Ebenfalls ist dadurch eine unterschiedliche Neigung zur Bildung und Stabilisierung von Radikalen und eine unterschiedliche Reaktionsfähigkeit mit den Enzymen Katalase und Glutathion-Peroxidase gegeben.

CSC ist eine Lösung der Partikelphase von Zigarettenrauch in DMSO und enthält somit eine große Anzahl verschiedener Substanzen. Es wurde hier eingesetzt, um die Eignung des Testsystems auch für die Untersuchung komplexer Mischungen aufzuzeigen.

4.1.4.1 Toxizitätsscreening zur Etablierung von Behandlungsmodellen

Erste Expositionsexperimente mit tBuOOH hatten gezeigt, daß bei einer stark toxischen Substanzwirkung keine zellspezifischen Veränderungen der gemessenen Endpunkte detektiert werden konnten. Das bedeutet, es wurde nur der Zelltod quantifiziert, Änderungen z. B. in Enzymaktivitäten jeder Einzelzelle wurden bei den Experimenten nicht gefunden. Um die Beobachtung der für die Analyse ausgewählten Parameter möglich zu machen, wurde daher ein Konzept entwickelt, das die Exposition des Zellsystems nur im subtoxischen Bereich vorsah. Dadurch sollte erreicht werden, daß bei Einsetzen einer toxischen Wirkung die Vitalität des Zellsystems noch ausreichend war, um zelluläre Stoffwechselveränderungen zur Reaktion auf die Wirkung der Expositionsschubstanz zu aktivieren.

Als Parameter für ein konzentrations- und zeitabhängiges Toxizitätsscreening wurde zunächst die Lactat-Dehydrogenase-Freisetzung analysiert. Da es sich dabei um eine Analytik unter Verwendung von Kulturmedium handelt, waren kinetische Untersuchungen durch wiederholte Probenahme aus einer einzigen Zellaussaat mit diesem Endpunkt besonders unaufwendig durchzuführen. Die Ergebnisse zeigten jedoch, daß der nach diesen Experimenten ermittelte Konzentrationsbereich für eine subtoxische Wirkung zu hoch war. In diesem Bereich war bereits kein Tetrazoliumsalzumsatz mehr zu messen (vgl. Kapitel 4.1.4.2 „Lipidperoxidation“)

Die Verwendung des Parameters Tetrazoliumsalzumsatz zum Toxizitätsscreening erwies sich hingegen als erfolgreich. Es wurden für alle drei Modellschubstanzen Konzentrations/Wirkungskurven erhalten, innerhalb derer bereits drei Konzentrationsbereiche unterschieden werden konnten, die in den folgenden Experimenten durch die Analyse weiterer Endpunkte bestätigt wurden:

– *Konzentrationsbereich ohne Substanzwirkung*

Die zelluläre Situation ist nach den untersuchten Endpunkten nicht von derjenigen der Kontrollzellen zu unterscheiden.

- *Konzentrationsbereich mit einsetzender toxischer Wirkung, „subtoxischer/sublethaler Bereich“*
Konzentrationsabhängig von der einwirkenden Substanz können in diesem Bereich Veränderungen der zellulären Stoffwechsellage wie Aktivierungen/Inaktivierungen von Enzymaktivitäten detektiert werden.
- *Konzentrationsbereich mit toxischer Wirkung*
Vitalitätsmarker wie der DNA-Gehalt, die Zellzahl, der Tetrazoliumsalzumsatz und die LDH-Freisetzung dokumentieren eine deutliche Zytotoxizität mit Vitalitätsverlusten von mehr als 50 %

Derartige Konzentrationsabhängigkeiten wurden nach Etablierung individueller Behandlungsmodelle für Expositionen gegen H_2O_2 und tBuOOH - mit Kurzzeitexposition und Nachinkubation - und CSC - mit durchgehender Exposition - erhalten. Es zeigte sich, daß der subtoxische Bereich für die Substanzen H_2O_2 und tBuOOH im gleichen Konzentrationsbereich bei 0,5 mM lag.

Reproduzierbarkeit

Expositionen im Rahmen der Experimente mit Modellsubstanzen wurden nach Möglichkeit mindestens 3fach durchgeführt. Es zeigte sich, daß diese Anzahl unabhängiger Experimente ausreichte, um konsistente Ergebnisse zu erhalten. Üblicherweise lagen die Standardabweichungen des Mittelwertes in der Größenordnung von 10 %, teilweise auch kleiner. Dieser Wert war auch schon bei Experimenten zur Kulturführung erhalten worden. Die Messungen von Kinetiken nach Expositionen gegen H_2O_2 und tBuOOH und CSC bleiben trotz teilweise enger kinetischer Intervalle von einer Stunde zumeist ebenfalls innerhalb dieser Schwankungsbreite. Die Tendenz zu größeren Schwankungsbreiten war abhängig vom untersuchten Konzentrationsbereich der Wirksubstanz gefunden worden. Sie trat z. B. nach Expositionen gegen CSC bei der Analyse des Glutathion-Gehaltes bei einer Konzentration von 75 $\mu\text{g}/\text{ml}$ und nach Expositionen gegen tBuOOH und H_2O_2 bei der Analyse des Tetrazoliumsalzumsatzes im Konzentrationsbereich 0,7 - 1,2 mmol/l auf. Die Erhöhung der Anzahl unabhängiger Experimente in diesen Fällen auf $n=7$ bzw. $n=10$ brachte hier keine Veränderung. Es ist daher wahrscheinlich, daß es sich in diesen Grenzbereichen zwischen nicht vorhandener und starker Toxizität tatsächlich um biologische und nicht um methodische Schwankungen handelt.

Die Größenordnung der erhaltenen Schwankungen von 10 % spricht für ein reproduzierbares biologisches System und stellt es als geeignet für den geplanten Einsatz dar.

Die Ergebnisse der Expositionen gegen Zigarettenrauchkondensat bestätigten eine gute Übereinstimmung der Analysen zum ATP per Lumineszenz vs. HPLC und zum Glutathion per MTP-Assay vs. HPLC. Auch wurden deutlich verschiedene Ergebnisse in den Kinetiken der Glutathion-Peroxidase, Glutathion-S-Transferase und Katalase-Aktivitäten gefunden. Die theoretischen Überlegungen, die einen gegenseitigen Einfluß auf die

jeweilige Aktivitätsbestimmung dieser Enzyme aufgrund der Reaktionsführung in der Bestimmungsmethode ausschlossen, werden damit bestätigt.

4.1.4.2 Expositionen gegen Wasserstoffperoxid und *tert.*-Butylhydroperoxid

Es wurden kinetische Messungen zu den Endpunkten Gesamtglutathion-Gehalt, Glutathion-Reduktase-Aktivität, Glutathion-Peroxidase-Aktivität und ATP/ADP-Verhältnis innerhalb von 24 Stunden nach Kurzzeitexposition gegen beide Modellsubstanzen durchgeführt. Die Parameter DNA-Gehalt, Tetrazoliumsalsumsatz (auch H_2O_2), Phosphofruktokinase-, Enolase-, Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase-, Katalase- und Superoxid-Dismutase-Aktivität, sowie die LDH-Freisetzung wurden nach Exposition gegen tBuOOH konzentrationsabhängig nach 24stündiger Nachinkubation untersucht. Für die Substanzkonzentrationen von 0,5 mmol/l wurden deutliche Unterschiede in den Ergebnissen kinetischer Messungen zum Glutathion-Gehalt, der Glutathion-Reduktase und -Peroxidase-Aktivitäten zwischen beiden Substanzen gefunden.

Glutathion-Peroxidase

Die kinetische Untersuchung der intrazellulären Aktivität der Glutathion-Peroxidasen über 24 Stunden hatte nach Exposition gegen tBuOOH eine zeitunabhängige Inhibition gezeigt. Nach Exposition gegen Wasserstoffperoxid hingegen war die Aktivität im Bereich von 4 Stunden Nachinkubation bis auf 150 % der Kontrollen angestiegen und nach 24 Stunden wieder auf Niveau der Kontrollzellen gefallen.

Wasserstoffperoxid penetriert leicht biologische Membranen (Gille *et al.*, 1992) und gelangt daher schnell in das Zellinnere. Dort kann es als Substrat der Glutathion-Peroxidase und der Katalase abgebaut werden. Die Glutathion-Peroxidase ist komplementär zur Katalase in den Mitochondrien und im Zytosol, nicht aber den Peroxisomen lokalisiert (Chance *et al.*, 1979). Ein Abbau der nach der Exposition erhöhten zytosolischen Wasserstoffperoxidkonzentration durch die Glutathion-Peroxidase ist daher wahrscheinlich. Dabei mag dieses Enzym im Vergleich zur Katalase vorwiegend in den Abbau kleinerer Wasserstoffperoxidkonzentrationen wie den hier vorliegenden involviert sein (Gille *et al.*, 1992). Eine Erhöhung der intrazellulären Glutathion-Peroxidase-Aktivität als Ausdruck eines aktivierten Abwehrmechanismus wäre daher eine Erklärung für das erhaltene Meßergebnis. Das Abklingen dieser Aktivierung spräche dann - in Einklang mit der Kinetik des intrazellulären Glutathions - für einen vollständigen Abbau des intrazellulären Wasserstoffperoxids nach etwa 6 Stunden.

Tert.-Butylhydroperoxid ist ebenfalls ein Substrat der Glutathion-Peroxidase, nicht aber der Katalase. Völlig gegensätzlich zu der zellulären Reaktion auf Wasserstoffperoxid induzierte es jedoch keine zeitabhängige Erhöhung der Glutathion-Peroxidase-Aktivität, sondern führte zu einer zeitunabhängigen Inhibition. Dieses Ergebnis kann auf Grundlage der durchgeführten Experimente alleine nicht erklärt werden. Eine konzentrationsabhängige Inhibition dieser Enzymaktivität nach Exposition gegen tBuOOH in ähnlichen Größenordnungen und Untersuchungszeiträumen wurde jedoch

ebenfalls in Untersuchungen mit einer Lungenzelllinie des Hamsters V79 (Ochi, 1990; Ochi *et al.*, 1989) und mit humanen Keratinozyten (Vessey *et al.*, 1993) gefunden.

Gesamtglutathion-Gehalt

Die Ergebnisse der kinetischen Untersuchung des intrazellulären Gesamtglutathion-Gehaltes ließen sowohl nach Exposition gegen Wasserstoffperoxid wie auch bei Exposition gegen tBuOOH eine initiale Konzentrationsverringering auf ca. 60 % der Kontrollzellen nach einer Stunde erkennen. Nach Exposition gegen Wasserstoffperoxid stieg die intrazelluläre Konzentration daraufhin innerhalb von 4 - 6 Stunden wieder auf das Niveau der unbehandelten Kontrollzellen. Nach Exposition gegen tBuOOH hingegen war nach Erreichen dieser Konzentration im gleichen Zeitraum in den folgenden 20 Stunden eine deutliche zusätzliche Konzentrationserhöhung bis auf ca. 200 % der Kontrollwerte gemessen worden.

Nach dem vorgestellten Reaktionsmodell reagieren Radikale und oxidierende Reagenzien spontan mit Glutathion zu Kopplungsprodukten oder führen zur Bildung von oxidiertem Glutathion. Die Verringerung der intrazellulären Glutathion-Konzentration ist demnach ein direktes Indiz für das Vorliegen derartiger Substanzen. Wasserstoffperoxid reagiert über die Fenton-Reaktion mit intrazellulären Eisen-Kationen zu Hydroxylradikalen OH• (Goldstein *et al.*, 1993). *Tert.*-Butylhydroperoxid kann je nach Art der Katalyse in Peroxyl- (tBuOO•) oder Alkoxy- (tBuO•) Radikale zerfallen (Ahmed-Choudhury *et al.*, 1998). Die Verringerung der intrazellulären Glutathion-Konzentration ist daher aus der Reaktion des Peptides mit diesen Radikalen erklärbar und wurde auch in anderen Untersuchungen mit Wasserstoffperoxid (Hoyt *et al.*, 1997) und tBuOOH (Sitar *et al.*, 1999) gefunden.

Der weitere Verlauf der Kinetik nach Exposition gegen Wasserstoffperoxid kann als Regeneration der Zellen interpretiert werden. So liegen dort der Glutathion-Gehalt und die Aktivitäten der Glutathion-Peroxidase und der Glutathion-Reduktase nach 24 Stunden übereinstimmend auf dem Niveau der Kontrollzellen.

Deutliche Erhöhungen der intrazellulären Glutathion-Konzentration nach Exposition gegen oxidativ wirksame Substanzen wie in dieser Arbeit nach Exposition gegen tBuOOH wurden ebenfalls in anderen Untersuchungen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* gefunden. Bei Expositionen von humanen Epithelzellen gegen subtoxische Konzentrationen von Dimethylfumarat (DMF) (Nelson *et al.*, 1999) und von alveolaren Ratten-Epithelzellen gegen Menadion (MQ) (Kugelman *et al.*, 1994) und 2,3-Dimethoxy-1,4-naphthoquinone (DMNQ) (Shi *et al.*, 1994) wurden ebenfalls im Zeitraum von 24 Stunden - nach einer initialen Konzentrationsverringering - Erhöhungen des intrazellulären Glutathion-Gehaltes auf 250 - 300 % der Kontrolle gefunden. *In vivo* ist der Glutathion-Gehalt in der Lunge von Ratten, die unter hyperoxischen Bedingungen gehalten wurden, ebenfalls erhöht (Fanburg *et al.*, 1989). Bei den verwendeten Substanzen handelt es sich um Michael-Akzeptoren (DMF), Quinone, die durch Redox-Cycling über einen längeren Zeitraum ständig H₂O₂ bzw. O₂• Radikale produzieren (DMNQ, MQ) oder Sauerstoff als einfaches oxidativ wirkendes Reagenz. Die *in vitro*-

durchgeführten Untersuchungen belegten weiterhin eine Induktion der γ -Glutamylcystein-Synthetase, des Schrittmacherenzym in der zytosolischen *de novo*-Glutathion-Biosynthese. Auch wurden Experimente mit Rattenepithelzellen durchgeführt, die zeigten, daß die γ -Glutamyl-Transpeptidase nach Exposition gegen DMNQ und *tert.*-Butylhydroquinon (TBHQ) ebenfalls induziert wird (Liu *et al.*, 1998). Die γ -Glutamyl-Transpeptidase ist Teil des γ -Glutamyl-Zyklus, daher am Aminosäure- und Glutathiontransport durch die Plasmamembran und somit ebenfalls an der Einstellung der intrazellulären Glutathionkonzentration beteiligt.

Die genannten Studien lassen daher die in dieser Arbeit gemessenen kinetischen Veränderungen des intrazellulären Glutathiongehaltes - sowohl initiale Verringerung als auch längerfristige Erhöhung - als mögliche, typische Ereignisse nach dem Einwirken einer oxidativen Streß induzierenden Substanz auf die Zelle erscheinen.

Glutathion-Reduktase

Nach Exposition gegen Wasserstoffperoxid wurde im Zeitraum bis 8 Stunden Nachinkubation eine geringe, nicht signifikante Aktivitätserhöhung der Glutathion-Reduktase gefunden. Nach Exposition gegen tBuOOH hingegen stieg die Aktivität dieses Enzyms innerhalb von 24 Stunden Nachinkubation bis auf ca. 160 % der nicht exponierten Kontrollzellen. Da die Aufrechterhaltung des Glutathion-Redoxverhältnisses mit einem deutlichen Überschuß an reduziertem Glutathion für die Vitalität der Zelle von grundlegender Bedeutung ist, wäre eine parallele Entwicklung dieser Aktivität mit der intrazellulären Glutathion-Konzentration eine mögliche Interpretation. Innerhalb einer anderen Studie wurde die Resistenz von CHO-Zellen mit künstlich genetisch erhöhter Glutathion-Reduktase-Aktivität verglichen mit der Resistenz der ursprünglichen Zellen mit normaler Glutathion-Reduktase-Aktivität (O'Donovan *et al.*, 1999) gegenüber tBuOOH. Das Ergebnis ließ geringere Vitalitätseinbußen bei GR-transfizierten Zellen als dem Wildtyp erkennen. Es belegt daher, daß diese Enzymaktivität in den zellulären Abwehrmechanismus gegen tBuOOH tatsächlich eingebunden ist und läßt vermuten, daß die hier gemessene Aktivitätserhöhung eine Folge dieser Mechanismen darstellt.

Weitere Endpunkte nach 24stündiger Nachinkubation nach tBuOOH-Exposition

Die Analyse der Enzymaktivitäten der Phosphofruktokinase, Enolase, Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase und der Superoxid-Dismutase wie auch des Tetrazoliumsalzumsatzes, zeigte eine leichte Erhöhung derselben. In Zusammenhang mit der zu diesem Zeitpunkt deutlich erhöhten Glutathion-Konzentration ist eine leichte Aktivierung der glykolytischen Vorgänge und der mitochondrialen Aktivität mit einem vergrößerten Energiebedarf der Zelle für die Glutathion-Biosynthese vorstellbar. Die Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase ist über das NADPH-Redoxverhältnis direkt mit der Glutathion-Reduktase-Aktivität verknüpft. Daher muß deren Aktivitätszunahme als Sekundärwirkung stets einen größeren Bedarf zur Aufrechterhaltung des NADPH/NADP-Redoxverhältnisses nach sich ziehen. Der Pentose-Phosphat-Weg mit der Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase als Schrittmacherenzym ist eine Möglichkeit, diesem Bedarf nachzukommen. Die Verringerung der Katalase-Aktivität ist jedoch aus diesen

Experimenten alleine nicht erklärbar. Die Superoxid-Dismutase ist hingegen als ein mit Radikalen reagierendes Enzym direkt in dem Metabolismus möglicher Superoxid-Radikale involviert, wodurch ihre Aktivierung im Zuge des intrazellulären Reaktionsmechanismus in diesem Zusammenhang sinnvoll erscheint.

Lipidperoxidation

Die Untersuchung der Lipidperoxidationsprodukte nach Exposition gegen Wasserstoffperoxid lieferte sinnvolle Zeit- und Konzentrationsabhängigkeiten. Trotzdem lagen die Meßwerte an der Sensitivitätsgrenze der verwendeten Assays und waren nur unter Vorbehalt auswertbar. Da zwei verschiedene Assays mit einem ähnlichen Ergebnis verwendet worden waren, lag dies vermeintlich nicht an der Methodik. Es ist vielmehr zu vermuten, daß dies eine Folge des untersuchten Konzentrationsbereiches war. Diese Schlußfolgerung beruht auf zwei Überlegungen.

Die Endpunkte Lipidperoxidation und Lactat-Dehydrogenase-Freisetzung sind auf die Untersuchung der Zellmembran fokussiert. Die Untersuchung von Lipidperoxidationsprodukten weist spezifisch einen Membranschaden nach, während die LDH-Freisetzung eher symptomatisch Hinweise auf Defekte dieses Zellkompartimentes gibt. Dieser Zusammenhang der Parameter konnte auch experimentell gezeigt werden. So wurden bei der Untersuchung von Rattenherzzellen unter oxidativem Streß durch Exposition gegen ein Antimon Salz vergleichbare konzentrationsabhängige Veränderungen beider Parameter gefunden (Tirmenstein *et al.*, 1997).

Bei Screening-Experimenten zur Eingrenzung der Expositionsdosis (vgl. Kapitel 4.1.4.1) war bei Verwendung des Parameters LDH-Freisetzung in das Kulturmedium ein Konzentrationsbereich mit zu hoher toxischer Wirkung eingegrenzt worden. In dem für die Experimente dann nach Screening mit dem Parameter Tetrazoliumsalzumsatz festgelegten Dosisbereich (2 Stunden, $c(\text{H}_2\text{O}_2) \leq 1,1 \text{ mM}$) konnte jedoch keine erhöhte LDH-Freisetzung gegenüber den Kontrollen gemessen werden (vgl. Abb. 3.46).

Diese Überlegungen lassen die bei der Untersuchung der Lipidperoxidation erhaltenen Ergebnisse plausibel erscheinen. Sie zeigen, daß die Analyse dieses Endpunktes in Zusammenhang mit der in dieser Arbeit gewählten Strategie der Exposition in subtoxischen/sublethalen Dosisbereichen nicht sinnvoll erscheint. Daher fand er in weiteren Experimenten dieser Arbeit keine Berücksichtigung.

4.1.4.3 Expositionen gegen Zigarettenkondensat

Zigarettenrauch besteht aus einem Gemisch einer äußerst großen Anzahl von Substanzen, von denen man ungefähr 3900 identifiziert hat. Man unterscheidet die Gas- und die Partikelphase des Rauches. In der Gasphase dominieren unter den biologisch aktiven Substanzen ihrem Mengenanteil nach Stoffe wie Kohlenmonoxid, Acetaldehyd, Stickstoffoxide, Blausäure, Ammoniak und Acrolein, wie auch Benzol, Formaldehyd und Vinyl-Chlorid. Die Partikelphase enthält Partikel der Größe 0,01 - 1 µm, an denen eine große Anzahl verschiedener Substanzen adsorbiert vorliegt. Nikotin, Phenol, Catechol, Aniline, Benz[a]anthracene, Benzo[a]pyrene, Chrysene, Phenanthrene und viele mehr findet man ebenso wie Nickel und Cadmium (Hoffmann *et al.*, 1986). Zur Gewinnung von Zigarettenrauchkondensat wird die Partikelphase über einen Filter abgeschieden und in DMSO gelöst. Demzufolge handelt es sich um ein Substanzgemisch, daß derart komplex ist, daß seine biologische Wirkung aus der Kenntnis der Wirkung der Einzelsubstanzen unmöglich vorhergesagt werden kann. Es wurde daher als geeignete Prüfsubstanz eingeschätzt, um die Fragestellung zu bearbeiten, ob mit dem etablierten Testsystem auch komplexe Gemische untersucht werden können. Zur Bewertung der erhaltenen Ergebnisse werden diese im folgenden zunächst vor dem Hintergrund des vorgestellten Reaktionsmodelles um den Glutathion-Redox-Zyklus und danach vor dem Hintergrund der Ergebnisse anderer Arbeiten diskutiert.

Nach den Erkenntnissen aus Screening-Experimenten mit tBuOOH und Wasserstoffperoxid sollte die Exposition gegen CSC im subtoxischen Dosisbereich durchgeführt werden. Dieses Ziel konnte mit den nach dem Screening über die Endpunkte Tetrazoliumsalzumsatz/DNA-Gehalt eingesetzten Konzentrationen und Expositionszeiten erreicht werden. Belegt wird dies durch die Endpunkte DNA-Gehalt, Tetrazoliumsalzumsatz, ATP-Gehalt und das ATP/ADP-Verhältnis.

Der DNA-Gehalt gab keinerlei Hinweise auf Zytotoxizität im Sinne eines bleibenden Vitalitätsverlustes. In Expositionskonzentrationen oberhalb von 25 µg/ml CSC wurde nach einer Expositionszeit von 1,5 Stunden zwar ein gegenüber der Kontrolle verringerter Tetrazoliumsalzumsatz gefunden, doch lag dieser selbst in der höchsten untersuchten Konzentration von 100 µg/ml CSC nach 24 Stunden wieder auf dem Niveau der Kontrollzellen. In niedrigeren Expositionskonzentrationen wurde bei diesem Endpunkt ein erhöhter Umsatz gefunden.

Der ATP-Gehalt und das ATP/ADP-Verhältnis waren nach einer Expositionszeit von 1,5 Stunden deutlich abgesenkt. So wurde in der höchsten Konzentration 100 µg/ml CSC nur noch 40 % des ATP/ADP-Verhältnisses der Kontrollen nachgewiesen. In den folgenden 22,5 Stunden Expositionszeit stiegen jedoch beide Werte, der ATP-Gehalt wie auch das ATP/ADP-Verhältnis deutlich an. So wurde zu diesem Zeitpunkt 90 % des ATP-Gehaltes der Kontrollzellen und 80 % der ATP/ADP-Verhältnisses der Kontrollzellen gefunden. Es ist denkbar, daß bei einer weiter verlängerten Expositionszeit die Kontrollwerte erreicht worden wären. Damit lassen auch diese erhaltenen Meßwerte

kein vorliegen manifester Zytotoxizität erkennen. Sie dokumentieren vielmehr eine initiale Belastung der Zellen durch die Behandlungssubstanz, die im Zeitraum von 24 Stunden nahezu vollständig überwunden wird.

Auch die Messungen zu Endpunkten des zellulären Energiestoffwechsels folgten diesem Trend. Die Aktivitäten der glykolytischen Enzyme Phosphofruktokinase und Enolase sind zu den Expositionszeiten 1,5 Stunden und 6 Stunden nicht von den Aktivitäten in den Kontrollzellen zu unterscheiden. Nach 24stündiger Exposition ist eine leichte Aktivierung beider Enzyme zu erkennen. Die gleiche Beobachtung gilt für die Enzyme des Pentose-Phosphat-Weges. Die leichte Aktivierung nach 24 Stunden findet sich sowohl in der Summe der Aktivitäten von Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase und 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase wie auch in der Aktivität der Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase alleine. Das Aktivitätsverhältnis beider Enzyme zueinander änderte sich dabei nicht.

Bei den Endpunkten in Verbindung zum Glutathion-Redox-Zyklus/oxidativem Streß dominierte der Effekt auf das intrazelluläre Glutathion. Übereinstimmend in der Analyse des Gesamtglutathion-Gehaltes mit dem Mikrotiterplatten-Assay und der Analyse des Glutathions per HPLC wurde nach 1,5 Stunden Expositionszeit eine Verringerung des intrazellulären Glutathions gefunden, die nach ca. 6 Stunden bereits mehr als ausgeglichen war, und nach 24 Stunden in eine extreme Erhöhung auf ca. 250 bis 300 % der Kontrollwerte überging. Die Superoxid-Dismutase und die Glutathion-Peroxidase zeigten eine durchgehende Aktivitätserhöhung mit einem gemeinsamen Aktivitätsmaximum bei 6 Stunden Expositionszeit. Die Aktivitäten der Glutathion-S-Transferasen, der Glutathion-Reduktase und der Katalase waren gegenüber den Kontrollzellen verringert, folgten dabei aber individuellen Konzentrationsabhängigkeiten und Kinetiken. Die Lactat-Dehydrogenase-Freisetzung in das Kulturmedium war gegenüber den Kontrollzellen verringert.

Vor dem Hintergrund des vorgestellten Reaktionsmodelles, der Interpretation der Experimente gegen tBuOOH und der Ergebnisse der Messungen zum zellulären Energiestoffwechsel lassen sich die Kinetiken der Glutathion-S-Transferase, der Katalase und der Glutathion-Reduktase nicht erklären.

Es ist zu erwarten, daß unter den zahlreichen Inhaltsstoffen des CSC auch solche sind, die durch eine Konjugation mit Glutathion in der Zelle detoxifiziert werden könnten. Diese Reaktion würde durch Glutathion-S-Transferasen katalysiert und man könnte eine Aktivitätserhöhung des Enzyms als Detoxifikationsmechanismus der Zelle erwarten. Das erhaltene Ergebnis bestätigt nicht diese Erwartung. Der Grund mag darin liegen, daß diesem Schritt eine Phase I Metabolisierung wie Oxidation, Reduktion oder Hydrolyse des Fremdstoffes vorausgehen müßte. Phase I Enzyme sind z. B. solche aus der Gruppe der Cytochrom-P450-abhängigen Enzyme, deren Aktivität in anderen als Primärkulturen stets fraglich ist (vgl. Kapitel 4.1.1), und die in diesem Zellsystem nicht untersucht wurde. Möglicherweise ist der kinetische Verlauf, der einer Aktivitätserhöhung im Zeitintervall zwischen 1,5 Stunden und 24 Stunden Expositionszeit entspricht, aber auch

als die erwartete Enzyminduktion zu interpretieren, mit dem Unterschied, daß ihr eine Enzyminhibition durch CSC vorausgeht. Die Frage kann an dieser Stelle nicht geklärt werden. Der im folgenden Abschnitt durchgeführte Vergleich mit anderen, z.T. auch *in vivo* durchgeführten Studien soll weitere Erkenntnisse hierzu bringen.

Die Aktivität der Katalase zeigte auch hier, wie in Expositionen gegen tBuOOH, eine Verringerung mit zunehmender Expositionsdauer. Auch dieser Verlauf kann nur vor dem Hintergrund anderer Arbeiten weiter beleuchtet werden.

Mit der Erhöhung der intrazellulären Glutathion-Konzentration war bei Expositionen gegen tBuOOH eine Erhöhung der Glutathion-Reduktase-Aktivität verknüpft. Diese Beobachtung wurde bei den Expositionen gegen CSC nicht gemacht. Hier wurde eine zeitunabhängige aber streng konzentrationsabhängige Enzyminhibition gefunden, für deren weitere Interpretation das gleiche gilt wie für die Interpretation der Ergebnisse der Analyse der Katalase und der Glutathion-S-Transferase.

Die Kinetik des intrazellulären Glutathions läßt sich in Anlehnung an die Ergebnisse der Expositionen gegen tBuOOH interpretieren. Die initiale Absenkung spricht für die Wirkung elektrophiler, oxidierender Substanzen, welche die freie Glutathion-Konzentration durch Konjugationsbildung schnell verringern. Die folgende deutliche Konzentrationserhöhung spricht für eine Erhöhung der zytosolischen *de novo*-Glutathion-Syntheserate, wie sie durch Induktion der γ -Glutamylcystein-Synthetase möglich wäre. Die Einwirkung solcher Substanzen, wie auch Radikalen würde in diesem Sinne durch die Erhöhung der Superoxid-Dismutase-Aktivität bestätigt, die dann als zellulärer Abwehrmechanismus interpretiert würde. Die Superoxid-Dismutase erzeugt Wasserstoffperoxid, welcher, zusammen mit anderen Peroxiden als Reaktionsprodukte der oxidierenden Fremdstoffe mit zellulären Bestandteilen durch die Katalyse der Glutathion-Peroxidase detoxifiziert werden kann. Die ähnliche Kinetik beider Enzyme - Glutathion-Peroxidase und Superoxid-Dismutase - bestätigt diesen Zusammenhang und spricht gleichzeitig dafür, daß sich die Wirkung dieser Fremdstoffe nach etwa 6 Stunden verringert, da beide Enzymaktivitäten dann wieder abgesenkt werden. In diesem Zusammenhang kann die verringerte LDH-Freisetzung als Nebeneffekt dieser Mechanismen interpretiert werden. Durch die Aktivierung der Glutathion-Peroxidase und der Superoxid-Dismutase können antioxidative Mechanismen über den Expositionseffekt hinaus wirksam sein, und damit auch einen Teil der im nicht exponierten Stoffwechsel der Kontrollzellen endogen produzierten ROS effektiver detoxifizieren, wodurch eine geringere Hintergrundschädigung der Membranen entsteht.

Zum Einfluß von Zigarettenrauchkondensat (CSC) und Zigarettenrauch (CS) auf biologische Systeme wurden verschiedene *in vitro*- und *in vivo*-Studien durchgeführt. Die folgende Tabelle stellt die Ergebnisse einiger Studien bzgl. des intrazellulären Glutathion-Gehaltes zusammen.

Glutathion-Gehalte nach Expositionen gegen CSC und CS in biologischen Testsystemen

	Spezies	Organ	Exposition	Befund		
				GSH*)	GSSG	
<i>in vitro</i>	A549	(Lunge)	CSC	+		(Rahman <i>et al.</i> , 1998)
			CSC	+		(Rahman <i>et al.</i> , 1996)
			CSC	-	0	(Rahman <i>et al.</i> , 1995)
			CSC	-		(Li <i>et al.</i> , 1994)
	3T3		CS (PBS)	-		(Muller <i>et al.</i> , 1998)
			CS (PBS)	-		(Muller <i>et al.</i> , 1997)
			CS	-		(Maranzana <i>et al.</i> , 1998)
	Ratte	humane Erythrozyten	CS	-		(Ryrfeldt <i>et al.</i> , 1988)
	Ratte, Kaninchen	Lunge (Explantat)	CS	-	0	(Joshi <i>et al.</i> , 1988)
	<i>in vivo</i>	human	ELF	Raucher	+	
Ratte		Lunge	CS	-		(Park <i>et al.</i> , 1998)
Ratte			Nikotin (mit Eth.)	+		(Ashakumary <i>et al.</i> , 1996)
Ratte		Niere	CS	-		(Anand <i>et al.</i> , 1996)
Ratte		Lunge	CSC (intratr. Instill.)	-	+	(Li <i>et al.</i> , 1996)
Ratte			CS	0	0	(Wurzel <i>et al.</i> , 1995)
Ratte			TS	-	0	(Cotgreave <i>et al.</i> , 1987)
Ratte		Lunge	CS	+		(Helen <i>et al.</i> , 1997)
Ratte		Lunge	CS	+		(Eke <i>et al.</i> , 1996)
Ratte			CSC (intratr. Instill.)	-	0	(Rahman <i>et al.</i> , 1995)
Maus	Lunge	CS	-		(Uejima <i>et al.</i> , 1990)	
Ratte	Lunge	CS	+		(Gupta <i>et al.</i> , 1988)	

Befund: + Erhöhung, - Verringerung, 0 keine Veränderung gegenüber Kontrollen *) Gesamtglutathion oder reduziertes Glutathion, CS Zigarettenrauch, TS Tabakrauch, CSC Zigarettenrauchkondensat, CS (PBS) PBS-Extrakt aus Zigarettenrauch

Die Studien belegen die auch in dieser Arbeit gefundene hohe Relevanz des Endpunktes für die biologische Wirkung von Zigarettenrauch und -kondensat. Nur in einer der zitierten Arbeiten (Wurzel *et al.*, 1995) wurde keine Veränderung des intrazellulären Glutathion-Gehalts gegenüber unexponierten biologischen Systemen gefunden. Die Art der Wirkung jedoch unterscheidet sich deutlich in Abhängigkeit von den experimentellen Bedingungen, der Generierung von CSC und CS und dem untersuchten Organ. So wurden bei chronischen Rauchern im ELF (epithelial lining fluid) höhere Glutathion-Gehalte gefunden als bei Nicht-Rauchern (Cantin *et al.*, 1987). Ein Ergebnis, das auch von einer Studie neueren Datums gestützt wird, nach der die „antioxidative Kapazität (TEAC)“ in der bronchioalveolaren Lavage Flüssigkeit (BALF) bei Rauchern gegenüber Nicht-Rauchern erhöht ist (Morrison *et al.*, 1999). Im Tierexperiment hingegen wurden nach 3tägiger Exposition in der Rattenlunge erhöhte (Eke *et al.*, 1996), nach 30tägiger Exposition verringerte (Park *et al.*, 1998) und nach 90tägiger Exposition wiederum erhöhte (Helen *et al.*, 1997) Glutathion-Gehalte gefunden. *In vitro* wurden von einer Arbeitsgruppe nach Expositionen gegen CSC verringerte Werte gefunden (Rahman *et al.*, 1995) und im gleichen System erhöhte Werte, nachdem das Expositionsmedium gegen Kulturmedium ohne CSC getauscht wurde (Rahman *et al.*, 1998; Rahman *et al.*, 1996). Speziell dieses Ergebnis reiht sich zwanglos in die Ergebnisse dieser Arbeit zum intrazellulären Glutathion-Gehalt nach Exposition gegen CSC ein, da es am ehesten einer subtoxischen/sublethalen Exposition entspricht, und

beide hier gemachten Beobachtungen, initiale Verringerung mit anschließender Erhöhung bestätigt.

Aktivität der Glutathion-Biosynthese und des γ -Glutamyl-Zyklus

Spezies	Organ	Exposition	Befund
<u>γ-Glutamylcystein-Synthetase</u>			
<i>in vitro</i>	A549	CSC	+ (Rahman <i>et al.</i> , 1998)
	A549	CSC	+ (Rahman <i>et al.</i> , 1996)
	A549	CSC	- (Rahman <i>et al.</i> , 1995)
	Ratte	Lunge (Explantat)	CS (Joshi <i>et al.</i> , 1988)
<i>in vivo</i>	Ratte	CSC (intratr. Instill.)	- (Rahman <i>et al.</i> , 1995)
<u>γ-Glutamyl-Transferase</u>			
<i>in vitro</i>	A549	CSC	0 (Rahman <i>et al.</i> , 1998)
<i>in vivo</i>	Ratte	Niere	CS (Anand <i>et al.</i> , 1996)

Befund: + Erhöhung, - Verringerung, 0 keine Veränderung gegenüber Kontrollen. Kann mRNA, Proteinmenge oder Enzymaktivität sein

Die Ergebnisse der Untersuchungen zur Glutathion-Biosynthese lassen eine klare Korrelation der Aktivität der γ -Glutamylcystein-Synthetase (GGCS) mit der Veränderung des intrazellulären Glutathion-Gehaltes erkennen. Wie auch bei Studien zur Wirkung von tBuOOH konnte eine erhöhte GGCS-Aktivität im Falle eines steigenden Glutathion-Gehaltes nachgewiesen werden, nicht aber im Falle eines verringerten Gehaltes.

Aktivität der Superoxid-Dismutasen

Spezies	Organ	Exposition	Befund
<u>CuZnSOD</u>			
<i>in vivo</i>	human	Serum	Raucher + (Dubick <i>et al.</i> , 1991)
	Ratte	Lunge	CS (Gilks <i>et al.</i> , 1998)
<u>MnSOD</u>			
<i>in vivo</i>	Ratte	Lunge	CS + (Gilks <i>et al.</i> , 1998)
<u>SOD, allg.</u>			
<i>in vivo</i>	human	Erythrozyten	Raucher +/- (Hulea <i>et al.</i> , 1995)
	human	Alveolar-Makrophagen	Raucher + (McCusker <i>et al.</i> , 1990)
	Meerschwein	Erythrozyten	CS + (Mukherjee <i>et al.</i> , 1993)
	Ratte		CS 0 (Chow <i>et al.</i> , 1998)
	Ratte	Nikotin (Eth.)	- (Ashakumary <i>et al.</i> , 1996)
	Ratten		CS - (Helen <i>et al.</i> , 1997)
	Ratte	Lunge	CS 0 (Gupta <i>et al.</i> , 1988)
	Hamster	Alveolar Makrophagen	CS + (McCusker <i>et al.</i> , 1990)

Befund: + Erhöhung, - Verringerung, 0 keine Veränderung gegenüber Kontrollen. Kann mRNA, Proteinmenge oder Enzymaktivität sein

Für die Veränderung der Aktivität der SOD stellen sich die Ergebnisse nicht derartig eindeutig dar wie für das Glutathion. In der Mehrzahl der Studien wurden, wie in dieser Arbeit, Veränderungen im Sinne einer Aktivitätserhöhung gefunden, dabei korrelierte das Ergebnis aber nicht unbedingt mit dem Ergebnis des Glutathion-Gehaltes. So wurde auch mit einer Erhöhung des Glutathion-Gehaltes eine Verringerung der SOD-Aktivität gefunden (Helen *et al.*, 1997).

Aktivität der Glutathion-Peroxidase

	Spezies	Organ	Exposition	Befund	
<i>in vitro</i>	A549		CSC	-	(Rahman <i>et al.</i> , 1995)
<i>in vivo</i>	human	Alveolar Makrophagen	Raucher	0	(McCusker <i>et al.</i> , 1990)
	human	Erythrozyten	Raucher	+/-	(Hulea <i>et al.</i> , 1995)
	Hamster	Alveolar Makrophagen	CS	0	(McCusker <i>et al.</i> , 1990)
	Meerschwein	Erythrozyten	CS	-	(Mukherjee <i>et al.</i> , 1993)
	Kaninchen		CS	0	(Joshi <i>et al.</i> , 1988)
	Ratte	Lunge	CS	+	(Gilks <i>et al.</i> , 1998)
	Ratte		CS	0	(Wurzel <i>et al.</i> , 1995)
	Ratte		CS	-	(Joshi <i>et al.</i> , 1988)
	Ratte		CS	0	(Gairola <i>et al.</i> , 1986)
	Ratte		Nikotin (mit Eth.)	+	(Ashakumary <i>et al.</i> , 1996)
	Ratte	Niere	CS	+	(Anand <i>et al.</i> , 1996)
	Ratte		CSC (intratr. Instill.)	-	(Rahman <i>et al.</i> , 1995)
	Ratten	Lunge	CS	+	(Helen <i>et al.</i> , 1997)
	Ratte	Lunge	CS	0	(Gupta <i>et al.</i> , 1988)

Befund: + Erhöhung, - Verringerung, 0 keine Veränderung gegenüber Kontrollen. Kann mRNA, Proteinmenge oder Enzymaktivität sein

Für die Aktivität der Glutathion-Peroxidase trifft die bei der SOD gemachte Beobachtung in noch stärkerem Ausmaß zu. Hier wurden in den zitierten Studien gleichermaßen Erhöhungen, Verringerungen oder auch keine Veränderungen gemessen.

Aktivität der Katalase

	Spezies	Organ	Exposition	Befund	
<i>in vivo</i>	human	Alveolar Makrophagen	Raucher	+	(McCusker <i>et al.</i> , 1990)
	Meerschwein	Erythrozyten	CS	0	(Mukherjee <i>et al.</i> , 1993)
	Hamster	Alveolar Makrophagen	CS	+	(McCusker <i>et al.</i> , 1990)
	Ratte	Lunge	CS	0	(Gilks <i>et al.</i> , 1998)
	Ratte	Niere	CS	-	(Anand <i>et al.</i> , 1996)
	Ratte		CS	0	(Wurzel <i>et al.</i> , 1995)
	Ratte		Nikotin (mit Eth.)	-	(Ashakumary <i>et al.</i> , 1996)
	Ratte	Lunge	CS	-	(Helen <i>et al.</i> , 1997)
	Ratte	Lunge	CS	0	(Gupta <i>et al.</i> , 1988)

Befund: + Erhöhung, - Verringerung, 0 keine Veränderung gegenüber Kontrollen. Kann mRNA, Proteinmenge oder Enzymaktivität sein

Erhöhungen der Katalase-Aktivität nach Exposition gegen CS oder CSC wurden in den zitierten Arbeiten ausschließlic bei Makrophagen beobachtet. In den anderen Untersuchungen wurden entweder keine Veränderungen oder Verringerungen der Katalase-Aktivität gemessen.

Aktivität der Glutathion-S-Transferasen

	Spezies	Organ	Exposition	Befund	
<i>in vitro</i>	A549		CSC	0	(Rahman <i>et al.</i> , 1995)
	Ratte	Lunge (Explantat)	CS	0	(Joshi <i>et al.</i> , 1988)
<i>in vivo</i>	Ratte		CSC (intratr. Instill.)	0	(Rahman <i>et al.</i> , 1995)
	Ratte	Lunge	CS	-	(Eke <i>et al.</i> , 1996)
	human	Lunge	Raucher	0	(Pasquini <i>et al.</i> , 1988)

Befund: + Erhöhung, - Verringerung, 0 keine Veränderung gegenüber Kontrollen. Kann mRNA, Proteinmenge oder Enzymaktivität sein

Aktivität der Glutathion-Reduktase

	Spezies	Organ	Exposition	Befund	
<i>in vitro</i>	A549		CSC	0	(Rahman <i>et al.</i> , 1995)
	Ratte	Lunge (Explantat)	CS	0	(Joshi <i>et al.</i> , 1988)
<i>in vivo</i>	Ratte	Niere	CS	-	(Anand <i>et al.</i> , 1996)
	Ratte		Nikotin (mit Eth.)	-	(Ashakumary <i>et al.</i> , 1996)
	Ratte		CSC	0	(Rahman <i>et al.</i> , 1995)
			(intratr. Instill.)		
	Ratte	Lunge	CS	-	(Helen <i>et al.</i> , 1997)
	Ratte	Lunge	CS	0	(Gupta <i>et al.</i> , 1988)

Befund: + Erhöhung, - Verringerung, 0 keine Veränderung gegenüber Kontrollen. Kann mRNA, Proteinmenge oder Enzymaktivität sein

Ähnliche Beobachtungen wie für die Katalase-Aktivität treffen auch für die Aktivitäten der Glutathion-S-Transferasen und die Glutathion-Reduktase zu. Die Ergebnisse der angeführten Studien zeigen entweder keine Veränderungen oder Verringerungen der Enzymaktivitäten, jedoch keine Erhöhungen.

Abschließend betrachtet lassen sich die Ergebnisse, die in der Literatur zur biologischen Wirkung von Zigarettenrauch- oder Kondensat angegeben sind, mit den Ergebnissen dieser Arbeit in Einklang bringen. In allen Studien ist der deutlichste Effekt bei der Wirkung auf das intrazelluläre Glutathion zu finden. Die beim Glutathion-Gehalt gemessenen Veränderungen, initiale Konzentrations-Verringerung und darauf folgende -Erhöhung, lassen sich durch die Ergebnisse der anderen Arbeiten stützen und unter anderem mit der dort nachgewiesenen erhöhten *de novo*-Biosynthese belegen. Die Ergebnisse der Glutathion-Peroxidase- und Superoxid-Dismutase-Kinetiken, die hier gemessen wurden, lassen sich aufgrund der äußerst heterogenen Datenlage anderer Arbeiten, die auf unterschiedlichen experimentellen Bedingungen beruhen, nicht eindeutig belegen. Es handelt sich zum Großteil um *in vivo* Experimente mit Zigarettenrauch, die hier mit *in vitro*-Expositionen gegen Zigarettenrauchkondensat verglichen werden. Trotz dieser großen experimentellen Unterschiede wurden in einigen Arbeiten auch bei diesen Parametern dieser Arbeit entsprechende Ergebnisse erhalten. Die Ergebnisse der Messung der Kinetiken der Glutathion-S-Transferasen, der Glutathion-Reduktase und der Katalase nach Exposition gegen CSC waren allein vor dem Hintergrund des Reaktionsmodelles um den Glutathion-Redox-Zyklus nicht sinnvoll zu interpretieren. Sie werden durch die Ergebnisse anderer Arbeiten bestätigt. Auch dort wurden - mit Ausnahme der Untersuchung von Alveolar Makrophagen - stets Verringerungen oder keine Veränderungen dieser Enzymaktivitäten gegenüber einer Kontrolle gefunden.

4.1.5 Schlußfolgerung zum biologischen Indikatorsystem

Das biologische Indikatorsystem sollte der Untersuchung von Substanzwirkungen auf grundlegende zelluläre Prozesse dienen. Zu seiner Etablierung wurde einerseits das Zellkultursystem humaner Fibroblasten der Lunge entsprechend den durch die Fragestellung gesetzten Anforderungen optimiert und es wurden andererseits

Methoden zur Analyse zellbiochemischer Parameter für diesen Zweck entwickelt. In submers durchgeführten Modellexpositionen gegen die Substanzen Wasserstoffperoxid, *tert.*-Butylhydroperoxid und Zigarettenrauchkondensat sollte das Indikatorsystem auf seine Relevanz für die Untersuchung oxidativ wirksamer Substanzen untersucht und damit seine Einsatzbarkeit für Expositionen gegen atmosphärische Gase überprüft werden.

Innerhalb der Etablierung der Zellkulturführung wie der Umstellung des Systems auf nicht-proliferative Bedingungen und der Einführung einer Vorkultur unter Selenzusatz zur Induktion der Glutathion-Peroxidase-Aktivität wurden stets die erwarteten Effekte erzielt. Meßergebnisse ließen sich vor dem Hintergrund anderer Arbeiten sinnvoll interpretieren. Das Zellsystem konnte unter Vitalitätserhalt in eine Form der air/liquid-Kultivierung überführt werden und erwies sich als reproduzierbar. Modellexpositionen zeigten, daß das System eine gute Reproduzierbarkeit zur Detektion zeit- und konzentrationsabhängiger sowie substanzspezifischer Effekte aufweist. Nach Substanzeinwirkung konnte die Aktivierung zellulärer anti-oxidativer Mechanismen zur erfolgreichen Abwehr oxidativer Schäden nachgewiesen werden.

Die Ergebnisse der Expositionen gegen Modellsubstanzen waren sowohl vor dem Hintergrund des vorgestellten Reaktionsmodelles als auch vor dem Hintergrund anderer, veröffentlichter Arbeiten sinnvoll interpretierbar.

Damit erfüllte das biologische Indikatorsystem die Zielsetzung und wurde in Expositionen gegen atmosphärische Gase eingesetzt.

4.2 Expositionen gegen atmosphärische Gase *in vitro*

Ziel dieser Arbeit war die Etablierung eines Systems zur Durchführung von Expositionen gegen atmosphärische Gas *in vitro*. Dazu war ein biologisches Indikatorsystem etabliert worden, das hinsichtlich seines Verhaltens in Expositionen gegen Modellsubstanzen charakterisiert worden war. Zur Etablierung eines Gesamtsystems wurden weiterhin Experimente zur Entwicklung eines experimentellen Aufbaues zur Exposition dieses biologischen Indikatorsystems gegen Gase durchgeführt. Diese Experimente gliederten sich in drei Abschnitte.

Die theoretischen Betrachtungen (vgl. Kapitel 1.3) verdeutlichen, daß ein Expositionssystem für die Zielrichtung Biomonitoring mit hoher Sensitivität und Reproduzierbarkeit hinsichtlich der Detektion biologischer Wirkungen und hinsichtlich der Beschreibbarkeit der Expositionsbedingungen nur durch eine air/liquid-Kultivierung des Zellsystems verwirklicht werden kann. Daher war in ersten Experimenten ein Expositionsaufbau nach dem gängigen air/liquid-Konzept genutzt worden. In diesen Experimenten war ein zur Verfügung stehendes Zellkultursystem der Ratte mit einer Analytik eingesetzt worden, die sich hauptsächlich auf die Untersuchung biochemischer Zellvitalitätsparameter bezog. Die Experimente sollten die Durchführbarkeit derartiger Expositionen untersuchen und zeigen, ob auch die Untersuchung der biologischen Wirkung komplexer Gasmischungen mit einem derartigen System zugänglich ist.

Die Forderungen an das zu entwickelnde System nach den theoretischen Überlegungen, z. B. nach Mobilität in Form einer brutschrankfernen Exposition und nach reproduzierbaren Expositionsbedingungen durch Einzelanströmung jedes Transwell-Inserts, wurden durch die Expositionsform nach der gängigen air/liquid-Methode nicht erfüllt. Zur Umsetzung des in der Einleitung vorgestellten Konzeptes wurde daher ein Expositionsgerät entwickelt, das unter anderem den Mobilitäts-Aspekt, die direkte Heranführung des Gases an das Zellsystem ohne dessen direkte Anströmung und den Betriebes mit einem Mediumfluß verwirklichte.

Die Eigenschaften dieses Expositionssystems sollten in Experimenten unter Nutzung des etablierten biologischen Indikatorsystems charakterisiert werden. Unter Variation der experimentellen Parameter Expositionszeit, Mediumstand, Feuchte und Größe des Gasflusses wurden Expositionen gegen synthetische Luft, Ozon und Stickstoffdioxid durchgeführt.

Im folgenden sollen zunächst die Ergebnisse aus der Entwicklung des Expositionsgerätes diskutiert werden. Im Anschluß daran werden die Expositionen gegen Reinfluft und gegen die Modellgase Ozon und Stickstoffdioxid erörtert.

4.2.1 Entwicklung eines Expositionsaufbaues zur Gasexposition *in vitro*

Zur Entwicklung eines Expositionsgerätes nach dem vorgestellten Zielkonzept wurde von einer bestehenden experimentellen Lösung für eine brutschrankferne Zellkultivierung ausgegangen. Das als Ausgangspunkt gewählte Kulturgefäß gestattete die Mediumversorgung und Thermostatisierung von drei Transwell-Inserts. Zur Umsetzung des neuen Konzeptes mußte (1) zusätzlich ein Expositionsaufsatz entwickelt werden, der eine Heranführung des Gases an den Zellrasen ermöglichte. Es mußte (2) eine veränderte Mediumversorgung realisiert werden, um den Betrieb mit einem Mediumfluß zu gewährleisten und das Expositionsgerät mußte (3) in einen Gesamtaufbau eingegliedert werden, der die Thermostatisierung der Einzelteilkomponenten, den Mediumfluß und die Probenahme druckloser Gasmischungen ermöglichte.

4.2.1.1 Strömungsverteilung

Bei der Realisierung eines Aufsatzes stellte sich die Gewährleistung einer gleichmäßigen Gasversorgung der drei in einem Expositionsgerät verwendeten Transwell-Inserts als der entwicklungsintensivste Aspekt heraus. Die Zielsetzung war, eine für die Routineverwendung robuste Lösung bei guter Gleichverteilung und Betrieb bei einem kleinen Fluß von 8,3 ml/min je Transwell-Insert zu erhalten. Deren Umsetzung wurde durch die lineare Anordnung der drei Transwell-Inserts und der glastechnischen Einzelanfertigung der Aufsätze jedoch erschwert.

Der zunächst verwendete Lösungsansatz („Konzept 1: Gasverteilung durch Strömungsführung“) ergab keine befriedigenden Meßergebnisse. Je nach individuellem Aufsatz und Strömungsrichtung des Gases variierte die Gasverteilung über die drei Transwell-Plätze um bis zu 50 %, d. h., es wurde über einzelne Plätze doppelt so viel Gas gefördert wie über andere. Derartige Ungleichverteilungen wurden aus zwei Gründen als kritisch für einen *in vitro*-Expositionsverlauf angesehen. Zum einen (1) bedeuten Ungleichverteilungen eine ungleichmäßige Versorgung der Einzel-Inserts mit dem Expositionsgas. Da jedoch das Expositionskonzept eher eine zeitlich konstante Konzentration des Gases über dem Zellrasen als eine Komplettausscheidung einer Stoffmenge in einem Zeitraum vorsieht (vgl. Kapitel 4.2.1.2), sind kleinere Unterschiede in der Gasströmung in jedem einzelnen Transwell-Insert unter diesem Gesichtspunkt

tolerabel. Die Expositionen der Zellen gegen Reinluft bei verschiedenen Gasströmen hatten jedoch gezeigt (2), daß deren Vitalitätserhalt stark von der Größe des Gasstromes abhängig waren (vgl. Abb. 3.95). Eine Ungleichverteilung bedeutet mithin unter diesem Aspekt, daß diejenigen Zellen, die der höchsten Menge an Expositionsgas pro Zeiteinheit ausgesetzt sind, gleichzeitig den höchsten Vitalitätsverlust durch die Exposition selber erleiden. Diese Kombination der Effekte ungleichmäßiger Expositionsbedingungen bzgl. des zu untersuchenden Gases und ungleichmäßiger Vitalitätserhalt würde demzufolge die Reproduzierbarkeit des Systemes erheblich einschränken.

Der zweite Lösungsansatz beinhaltete die Verwendung von Drosselscheiben und Kapillareinsätzen zur gleichmäßigen Gasverteilung. Die Funktionsweise dieser Bauteile beruht darauf, den Durchfluß eines Gases oder einer Flüssigkeit durch den Einbau einer Verengung im Leitungssystem zu kontrollieren. Wenn diese Verengung im Verhältnis zur nächst größeren Verengung im kompletten Rohrsystem klein genug ist, sollte der Durchfluß nur noch abhängig von ihrem Durchmesser sein und unabhängig von sonstigen Faktoren wie Reibungswiderständen in den Rohren werden.

Das Funktionsprinzip verlangt einen Druckabfall des Strömungsfadens über die Verengung. Dieser ist abhängig von der Strömungsgeschwindigkeit und dem Durchmesser der Verengung. Mit abnehmender Strömungsgeschwindigkeit muß der Durchmesser der Verengung verkleinert werden, um einen ausreichenden Druckabfall erzeugen zu können. Messungen zum Einfluß von Lochdurchmesser und Strömungsgeschwindigkeit auf die Gasverteilung hatten diesen Zusammenhang auch experimentell bestätigt (vgl. Abb. 3.78). Sie hatten aber auch gezeigt, daß bei einer weiteren Verkleinerung der Verengung von 0,5 auf 0,3 mm bereits gegenteilige Effekte, vermutlich durch Probleme mit der Dichtigkeit des Rohrsystems um die Verengung herum und damit der Zuverlässigkeit entstanden. Das Material Teflon, in welches diese Verengungen in Form von Löchern in einer Platte eingelassen waren, erwies sich für die Anwendung als zu weich. Das bedeutet, angemessene Lochdurchmesser für eine Strömung von 8,3 ml/min pro Transwell-Insert ließen sich nicht realisieren. Experimente mit Edelmetallkapillaren, die vor der Inbetriebnahme innerhalb des Aufbaus auf gleiche strömungstechnische Eigenschaften normiert worden waren, zeigten, daß dies ebenfalls keine adäquate Lösung war. Es ist zu vermuten, daß dieses Prinzip nicht funktionierte, da jeweils drei Kapillaren nicht unabhängig voneinander in einem Gerät betrieben werden konnten. Die drei miteinander kommunizierenden Ströme führten zu einer hohen, unsystematischen Schwankung in der Gasverteilung.

Das vierte, erfolgreich umgesetzte Konzept, sah eine individuelle Lösung vor. Durch den Einsatz von Teflonhülsen mit Bohrungen in der Größenordnung von 1,5 mm Durchmesser, die individuell nach experimentell überprüfter Verteilung des Gasflusses für jeden Expositionsplatz in ihrer exakten Weite angepaßt wurden, konnten die unterschiedlichen, zur Ungleichverteilung führenden Strömungswiderstände ausgeglichen werden. Da die Löcher im Verhältnis zu denen, die im Konzept 2 bei

Experimenten mit Drosselscheiben Verwendung fanden, relativ groß waren, erwiesen sie sich auch für den Dauereinsatz als stabil. Zusätzlich beugt ihre Größe in Kombination mit der Heizung des Aufsatzes Kondensationseffekten wirksam vor. Nachteilig an dieser Lösung ist, daß der Fluß durch jedes Expositionsgerät bei diesem Konzept der Strömungsverteilung einzeln und exakt kontrolliert werden muß. Bei der Realisation der Strömungskontrolle durch Drosselscheiben wäre ein gemeinsamer Betrieb mehrerer Expositionsgeräte an einem Unterdruckanschluß möglich gewesen.

Zusammenfassend ist zu dem Aspekt der Strömungsverteilung in den Expositionsgeräten zu sagen, daß eine lineare Anordnung von drei Transwells in einem einzeln, nicht maschinell hergestellten gläsernen Aufbau zusammen mit einem sehr kleinen Fluß von 8,3 ml/min je Transwell eine ungünstige Ausgangssituation zur Realisation einer zuverlässigen und qualitativ hochwertigen experimentellen Lösung darstellten. Die gefundene Lösung sichert dennoch verläßlich einen zufriedenstellenden Betrieb. Bei der Weiterentwicklung derartiger Aufbauten (vgl. Kapitel 5) ist dies jedoch ein Gesichtspunkt, der aufgrund seiner Wichtigkeit für die reproduzierbare Durchführung von Expositionen gegen Gase *in vitro* berücksichtigt werden muß.

4.2.1.2 Quantifizierung der Gaswiederfindung auf der Kulturmembran

Zur Wiederfindung des Expositionsgases auf der Kulturmembran wurden Messungen mit dem Saltzman-Reagenz zur Gaskonzentrationsbestimmung an der Membran durchgeführt und die Ergebnisse über Eichmessungen mit Natrium-Nitrit mit dem theoretischen Wert für vollständigen Umsatz des in der Meßzeit über die Membran geleiteten Stickstoffdioxids verglichen. Daraus wurde die prozentuale Wiederfindung errechnet. Das Ergebnis zeigte, daß die Wiederfindung mit zunehmender Gaskonzentration fiel und bei der kleinsten untersuchten Konzentration bei etwa 20 % lag (vgl. Abb. 3.83). Dabei konnten bei gleichzeitiger Messung in 6 Transwell-Inserts in 2 Expositionsgeräten reproduzierbare Meßdaten ermittelt werden.

Während der Meßzeit von einer halben Stunde wurde das Gas über die stehende Meßlösung im Transwell geführt. Nach einer initialen Reaktion an der Flüssigkeitsoberfläche mußte das weitere Stickstoffdioxidgas zum Umsatz im Reagenz demzufolge erst eine Wegstrecke innerhalb der Flüssigkeit diffundieren, bzw. innerhalb des Flüssigkeitsfilmes mußte ein Austausch des umgesetzten Farbstoffes an ihrer Oberfläche stattfinden. Da ein solcher Prozeß mit zunehmender Stickstoffkonzentration und zunehmender Meßzeit verlangsamt wird, mußte die prozentuale Wiederfindung mit zunehmender Stickstoffkonzentration abnehmen. Die Ergebnisse der Messungen entsprechen demzufolge der theoretischen Betrachtung.

Eine prozentuale Wiederfindung von 20 % bedeutet, daß im Laufe der Exposition von Zellen in diesem Aufbau jedes 5. Molekül des zu untersuchenden Gases in Kontakt mit der Zelloberfläche bzw. der Oberfläche des auf der Kulturmembran aufgetragenen Zellayers kommt.

Schon aus der Randbedingung der Vermeidung einer direkten Anströmung der Zellen heraus kann die Zielrichtung des Aufbaues nicht sein, alle Gasmoleküle in Kontakt mit der Kulturoberfläche bringen zu können. Die Zielrichtung muß vielmehr dahingehend definiert sein, eine definierte Atmosphäre über dem Zelllayer zu realisieren, in der das zu untersuchende Gas über den Expositionszeitraum keinem Konzentrationsgradienten unterliegt. Dies soll durch den Gasfluß gewährleistet sein. Der Kontakt des Zellayers mit dem Gas soll jedoch nicht durch den Gasfluß, sondern durch Diffusionsprozesse zustande kommen, um die physikalische Belastung der Zellen durch den Expositionsvorgang möglichst gering zu halten.

Die erfolgreiche Umsetzung dieses Konzeptes kann nur nach den Ergebnissen der Experimente zum Vitalitätserhalt der Zellen beim Expositionsvorgang und der Sensitivität des biologischen Indikatorsystems für toxikologisch relevante Gase in diesem Aufbau beurteilt werden.

4.2.1.3 Gewährleistung eines Mediumflusses

Nach den Erfahrungen mit der Strömungsverteilung im Expositions-Aufsatz wurde das Unterteil mit einem Leitungssystem entsprechend dem Konzept 1: Verteilung durch Strömungsführung ausgestattet. Die dort gemachten Beobachtungen bzgl. der Strömungsverteilung, in diesem Fall des Kulturmediums, treffen auch hier zu. Das bedeutet, es ist auch hier mit einer ungleichmäßigen Strömungsaufteilung zu rechnen. Qualitativ wurde der Mediaustausch an jedem Transwell-Insert experimentell überprüft.

Die Verwendung eines kontinuierlichen Mediumflusses sollte einer Aufkonzentration von Stoffwechselprodukten unter der Kulturmembran und pH-Veränderungen des Kulturmediums, bedingt durch einen minimal möglichen Kontakt desselben mit der Expositionsatmosphäre vorbeugen. Dieses Ziel wird jedoch unabhängig von der Größe des Mediumflusses erreicht. Minimale Unterschiede in Volumenfluß unter jedem der drei Transwell-Inserts, die nach der Messung der Gas-Gleichverteilung für das auch hier verwendete Konzept zu erwarten sind, sollten demnach tolerabel sein. Da auch in den durchgeführten Zellexpositionen keine nachteiligen Beobachtungen gemacht werden konnten, wurde die experimentelle Lösung in dieser Form für die Anwendung als geeignet betrachtet.

4.2.1.4 Die Höhe des Mediumstandes außerhalb des Transwells

Unabhängig von der Betriebsart des Expositionsgerätes, mit Mediumfluß oder ohne Mediumfluß, konnte die Höhe des Mediumstandes außerhalb des Transwells variiert werden. Da die Transwell-Inserts in den Expositionsgeräten fixiert sind, sich also nicht aus dem Medium heben können, entspricht die Kraft F , die von unten durch das Kulturmedium auf die Membran ausgeübt wird, dem Auftrieb des Inserts im Medium. Für den Druck p ergibt sich damit

$$F = p \cdot A = g \cdot \rho \cdot h \cdot A \quad \Leftrightarrow \quad p = g \cdot \rho \cdot h$$

mit der Grundfläche des Transwell-Inserts A , der Gewichtskraft g , der Dichte des Kulturmediums ρ und der Eintauchtiefe h . Der von unten durch das Kulturmedium auf die mikroporöse Membran ausgeübte Druck ist demnach proportional der Eintauchtiefe des Inserts bzw. der Höhe des Mediumstandes außerhalb desselben.

Ein größerer Druck von der Unterseite der Kulturmembran muß zu einer erhöhten Tendenz zum Durchtritt des Mediums durch die Membran führen. Bei welchem Druck dieser Durchtritt einsetzt, ist unter anderem abhängig von der Porengröße und -anzahl, der Hydrophilie des Membranmaterials und der Oberflächenspannung des Kulturmediums und daher schwer quantitativ zu erfassen oder zu berechnen.

Ein Mediumdurchtritt wurde bei Transwell-Inserts ohne Zellen unabhängig von Mediumstand, Zeitraum und sonstigen Bedingungen nicht beobachtet. Bei Vorhandensein eines Zellayers im Transwell hingegen war bei hohem Mediumstand und längerer Expositionsdauer als 60 Minuten das Entstehen eines erhöhten Feuchtigkeitsfilmes auf der Membran visuell zu erkennen. Es ist zu vermuten, daß die Zellen die Hydrophilie der Oberfläche erhöhten und durch zusätzliche Kapillarkräfte den Durchtritt begünstigten.

Ein stärkerer Durchtritt von Kulturmedium durch die Membran sollte sich positiv auf die Zellvitalität auswirken, da er humifizierend auf die Zellen wirkt. Gleichzeitig werden durch diesen Prozeß aber auch Bestandteile des Kulturmediums wie Aminosäuren an und über den Zellayer transportiert, die in Reaktion mit dem zu untersuchenden Gas treten können, und damit seine Wirkung auf das Zellsystem modifizieren. Expositionen gegen synthetische Luft und gegen Stickstoffdioxid und Ozon sollten auch zeigen, ob derartige Effekte experimentell nachweisbar waren.

4.2.2 Expositionen gegen synthetische Luft *in vitro*

4.2.2.1 Vergleich zwischen gängigem air/liquid-Expositionssystem und neu entwickeltem Aufbau

Expositionen gegen synthetische Luft wurden im System nach dem gängigen air/liquid-Konzept (im folgenden System 1 genannt) und im neu entwickelten Expositionsaufbau (im folgenden System 2 genannt) durchgeführt. Im System 1 wurden Lungenzellen der Ratte verwendet, im System 2 das etablierte Indikatorsystem. Zelleexpositionen, die als Kontrolle verwendet werden konnten, waren in System 1 die in der Expositionskammer unter air/liquid-Bedingungen abgedeckt exponierten R3/1-Zellen, genannt REFERENZ und R3/1-Zellen im Brutschrank unter air/liquid-Bedingungen, genannt INKUBATOR. Die REFERENZ Zellen aus System 1 entsprechen den Expositionsbedingungen nach den „air/liquid“ bei mittlerem Mediumstand exponierten Zellen in System 2, die INKUBATOR-Zellen aus System 1 entsprechen den Brutschrank, „BS“-Zellen aus System 2 (vgl. Kapitel 3.7.1).

Beim Vergleich der Ergebnisse, die nach Analyse der Zellzahl bzw. des DNA-Gehaltes und des Tetrazoliumsalzumsatzes in den Systemen nach Exposition gegen Reinluft bzw. synthetische Luft erhalten wurden, sind Unterschiede zu erkennen. Im System 2 wurden

beim Übergang vom submersen zum air/liquid-System keine signifikanten Vitalitätsverluste gemessen. Air/liquid-Expositionen im Brutschrank hingegen führten zu einem deutlichen Vitalitätsverlust gegenüber der submers Kontrolle. Im Verhältnis zu den air/liquid-Zellen zeigen die gegenüber synthetischer Luft exponierten Lk004-Zellen einen leichten Vitalitätsverlust. Dieser Vitalitätsverlust durch die Exposition gegen den Reinluft-Gasstrom ist in System 1 in den Messungen der Endpunkte DNA-Gehalt und Tetrazoliumsalzumsatz nicht zu erkennen. Für Zellen der Behandlungsgruppen GAS und REFERENZ wurden hier keine unterschiedlichen Meßwerte erhalten. Hingegen liegen die Meßergebnisse für beide Endpunkte nur in der Größenordnung von 70 -80 % derjenigen, die für die air/liquid im Inkubator exponierten Zellen erhalten wurden.

Dieser Vergleich mag darauf hinweisen, daß die Effekte, die zu einem gewissen Vitalitätsverlust der Zellen in beiden Systemen führten, verschieden waren.

In System 1 scheint aufgrund des fehlenden Unterschiedes zwischen GAS- und REFERENZ- Zellen der Expositionseffekt vernachlässigbar zu sein. Vielmehr scheinen sich grundsätzliche Kulturbedingungen negativ bei der Exposition bemerkbar zu machen, die zum Vitalitätsverlust beider Behandlungsgruppen gegenüber den INKUBATOR-Zellen führten. Möglicherweise handelte es sich hierbei unter anderem um die Auslassung des Natriumhydrogencarbonat-Zusatzes zum Kulturmedium, die bei INKUBATOR-Zellen nicht stattfand.

Im System 2 scheint der Expositionseffekt wesentlich für den meßbaren Vitalitätsverlust verantwortlich zu sein, da dieser dort nur bei im air/liquid-System mit Gasstrom exponierten Zellen erkennbar wird. Es ist denkbar, daß sich hier die grundsätzlich verschiedene Strömungsführung in beiden Systemen dokumentiert. In System 1 fließt entsprechend dem üblichen Konzept (vgl. Abb. 1.7) ein vertikaler Strom über die exponierten Tranwells. Dies hat zur Folge, daß ein Gasaustausch direkt über den Zellen nur durch Verwirbelungen oder durch Diffusion innerhalb des Transwell-Totvolumens stattfindet. Die Grenzschicht, die in diesem System durch Diffusion zu überwinden ist, ist wesentlich dicker als diejenige im System 2, in dem der Gasaustausch direkt an den Zellen durch dichte Heranführung gefördert wird. Dieser Effekt wurde nicht nur bei Expositionen gegen Reinluft sichtbar, sondern ist vermutlich auch der Grund für die Sensitivitätssteigerung des Testsystems beim Wechsel von System 1 zu System 2, der bei Expositionen gegen Ozon und Stickstoffdioxid gefunden wurde (vgl. Kapitel 4.2.3.4).

4.2.2.2 Einfluß der Strömungsgeschwindigkeit

Lk004-Zellen wurden gegen einen bei 25 °C befeuchteten Gasstrom exponiert. Dabei wurden die Strömungsgeschwindigkeit und die Expositionszeit variiert. Als Vitalitätsparameter wurde die Zellzahl analysiert. Das Ergebnis zeigte eine extreme Abhängigkeit des Vitalitätserhaltes von der Gasströmung. Eine Erklärung hierfür kann entweder die durch die Gasströmung erzeugte physikalische Belastung der Zellen oder eine teilweise Austrocknung durch den Gasstrom, der nicht bei 37 °C, sondern bei 25 °C mehr als 90 % Feuchte aufwies. Da jedoch beim höchsten untersuchten Gasfluß bereits innerhalb von 5 Minuten Expositionszeit ein hoher Vitalitätsverlust einsetzte, und sich

der Einfluß der Befeuchtung des Gasstromes in weiteren Experimenten als vernachlässigbar darstellte (vgl. Kapitel 4.2.2.3), scheint ein Einfluß der physikalischen Belastung der Zellen wahrscheinlicher zu sein.

4.2.2.3 Einfluß des Mediumstandes und der Befeuchtung des Gasstromes

Im Vergleich der Expositionen gegen synthetische Luft unter Variation des Gasflusses (vgl. Abb. 3.95) und der Expositionen unter Variation von Mediumstand und Befeuchtung (vgl. Abb. 3.96) ist zu erkennen, daß beim Herabsetzen der Befeuchtung von $> 90\%$ rH/25 °C auf ca. 15% rH/25 °C, beurteilt nach dem Parameter Zellzahl, keine unterschiedlichen Zellvitalitäten vorlagen. Obwohl bei Variation des Mediumstandes zum niedrigem Mediumstand gleichzeitig die Befeuchtung auf das Niveau der Umgebungsatmosphäre von 70% rH/25 °C gehoben wurde, sank dennoch die Vitalität der Zellen, gemessen an den Parametern Tetrazoliumsalzumsatz und Zellzahl (vgl. Abb. 3.96). Ein entsprechendes Ergebnis wurde auch bei den Experimenten mit dem Zellsystem HFBE erhalten.

Diese Veränderungen belegen den im vorhergehenden Abschnitt (vgl. Kapitel 4.2.1.4) diskutierten Zusammenhang zwischen Vitalitätserhalt, Befeuchtung der Zellen von der Unterseite der Membran und dem Druck des Mediums auf die Unterseite der Kulturfläche. Weiterhin zeigen sie, daß diese Zusammenhänge für den Vitalitätserhalt der Zellen unter diesen Expositionsbedingungen wichtiger als die Befeuchtung des Expositionsgasstromes sind.

Die weiteren untersuchten Parameter zum Glutathion- und ATP-Gehalt in diesen Experimenten lassen Verringerungen im Gehalt an ATP und reduziertem Glutathion erkennen, die zumeist in der Größenordnung der Zellzahlveränderung lagen. Bei Expositionen von Lk004-Zellen wurde zusätzlich das Verhältnis von oxidiertem zu reduziertem Glutathion untersucht. Sowohl bei mittlerem Mediumstand und geringer Befeuchtung als auch bei Exposition bei niedrigem Mediumstand und höherer Befeuchtung des Gasstromes (vgl. Abb. 3.96) wurde eine deutliche Erhöhung dieses Verhältnisses im Sinne einer Konzentrationsveringerung des reduzierten Glutathions gegenüber dem oxidierten Glutathion gefunden. Eine Erklärung hierfür kann der Zellkontakt mit der sauerstoffhaltigen Atmosphäre sein, der zu einer erhöhten intrazellulären Konzentration oxidativ wirksamer Substanzen und damit zu einer Oxidation von reduziertem Glutathion führt.

4.2.3 Expositionen gegen Ozon und Stickstoffdioxid

Wie für Reinluft bzw. synthetische Luft wurden auch für diese Gase Expositionen in beiden Aufbauten bei umweltrelevanter Befeuchtung und umweltrelevantem Kohlendioxid-Gehalt durchgeführt. Im neuen Aufbau wurden dabei die Expositionszeit, die Gaskonzentration, die Höhe des Mediumstandes außerhalb des Transwells und das Zellsystem variiert.

4.2.3.1 Der Einfluß der Höhe des äußeren Mediumspiegels

Expositionen im System 2 gegen Ozon und Stickstoffdioxid zeigten durchgehend eine starke Abhängigkeit von der Höhe des äußeren Mediumspiegels. Sehr deutlich wird dies beim Vergleich des Ergebnisse der Ozonexpositionen. Bei hohem Mediumstand und 120 Minuten Expositionsdauer gegen eine Konzentration von 2,25 ppm Ozon wurde nach 2stündiger Nachinkubation mehr als 80 % der Zellzahl der Reinluftkontrolle gefunden. Bei niedrigem Mediumspiegel hingegen fiel die nach der Exposition ermittelte Zellzahl bei halber Expositionszeit und einem Zehntel des Gaskonzentration auf weniger als 60 % der Kontrolle.

Nach Verrechnung von Expositionszeit und -konzentration zur Expositionsdosis stellen sich die Dosis/Wirkungskurven für das Zellsystem Lk004 bei verschiedenen Mediumständen folgendermaßen dar.

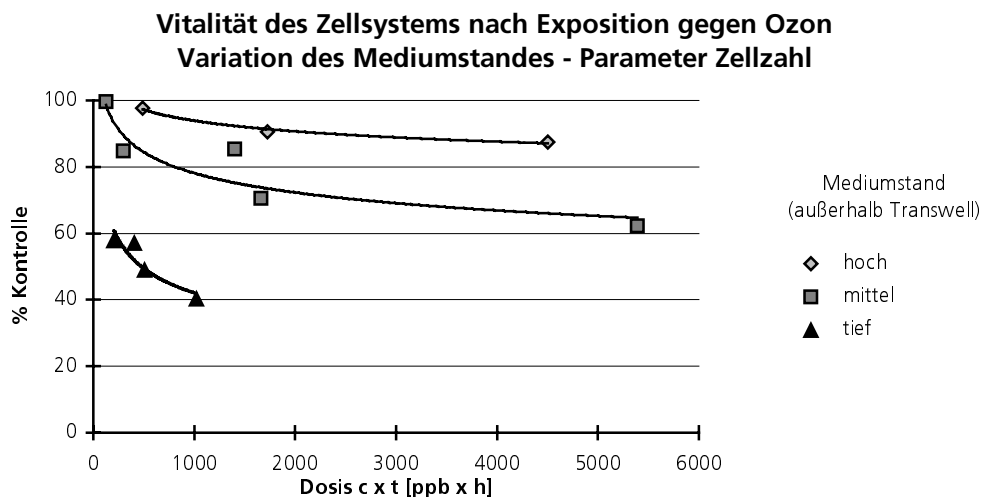


Abb. 4.1 Dosis/Wirkungskurven bei Exposition von Lk004-Zellen gegen Ozon im neu entwickelten Expositionssystem (System 2) bei verschiedenen Medienständen außerhalb der Transwell-Inserts. Parameter Zellzahl, Berechnung aus den im Ergebnisteil grafisch dargestellten Meßwerten.

Die durchgeführten ein- und zweistündigen Expositionen bei dem jeweiligen Mediumstand gliedern sich in gemeinsame Dosis/Wirkungskurven ein und bestätigen den oben an zwei Einzelwerten durchgeführten Vergleich. Entsprechende Berechnungen wurden auch für die Expositionen gegen Stickstoffdioxid durchgeführt und in Abb. 4.2 dargestellt.

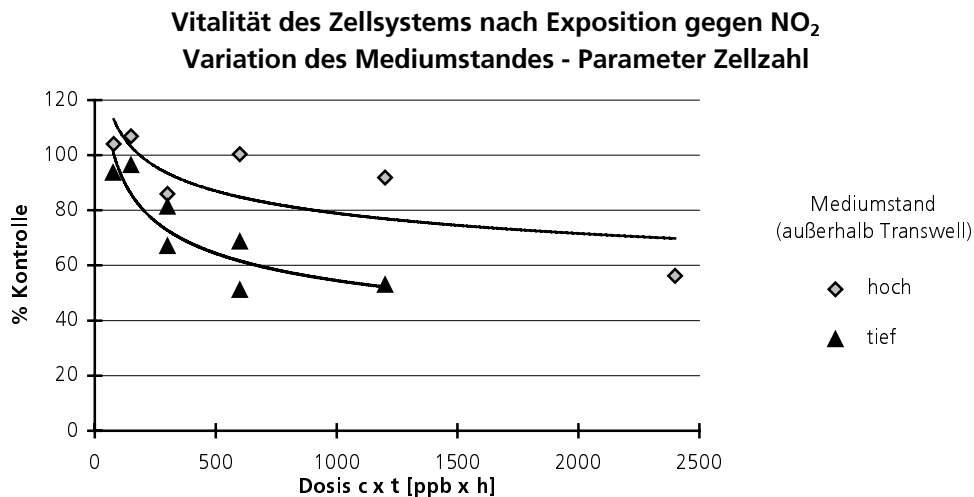


Abb. 4.2 Dosis/Wirkungskurven bei Exposition von Lk004-Zellen gegen Stickstoffdioxid im neu entwickelten Expositionssystem bei verschiedenen Medienständen außerhalb der Transwell-Inserts. Parameter Zellzahl, Berechnung aus den im Ergebnisteil grafisch dargestellten Meßwerten.

Auch hier findet sich ein entsprechender Zusammenhang zwischen der Stärke der Wirkung des Gases auf das Zellsystem und dem äußeren Mediumstand. Der Unterschied zwischen beiden System erscheint jedoch kleiner als derjenige, der bei Experimenten mit Ozon gemessen wurde.

Die Ergebnisse stützen die diskutierten Zusammenhänge zwischen der Höhe des Mediumstandes und dem Vitalitätserhalt bzw. der Wirkung des Gases auf die Zellen. Durch einen erhöhten äußeren Mediumstand wird der Druck des Kulturmediums von unten auf die mikroporöse Membran vergrößert. Medium kann leichter durch die Membran durchtreten. Dies hat einerseits den Effekt, daß die Vitalität der Zellen durch eine effizientere Befeuchtung verbessert wird (vgl. Kapitel 4.2.2). Andererseits schirmt dieses Kulturmedium die Zellen gegen die Wirkung des Expositionsgases ab.

Der erhebliche Einfluß dieses Parameters für den Verlauf und die Ergebnisse von Expositionen gegen Gase *in vitro* in einem solchen System wird hier deutlich.

Bei einer fehlenden Kontrolle des Parameters Mediumstand im Expositionsverlauf wird dieser Schwankungen in Einzelexperimenten unterliegen (1). Es können dann von einem solchen System keine reproduzierbaren Daten erwartet werden.

Weiterhin (2) bedeutet ein hoher Mediumstand einen Sensitivitätsverlust. Bei der hier vorliegenden Fragestellung ist die Sensitivität des Systems von großer Bedeutung, um eine Untersuchung umweltrelevanter Konzentrationen zu ermöglichen.

Neben der Veränderung der Sensitivität des Testsystems ist ein weiterer Effekt der Überschichtung der exponierten Zellen mit Kulturmedium auf die Expositionssituation denkbar (3). Reagiert ein Gas mit Bestandteilen des Kulturmediums, so wird im Falle einer Mediumüberschichtung die Wirkung auf die Zellen durch die Wirkung der Reaktionsprodukte auf die Zellen bestimmt sein und nicht durch die Wirkung des Gases selber. Für Ozon ist bekannt, daß es im reaktionskinetischen Sinne schnell in dieser Art reagiert (Behnke *et al.*, 1998; Pryor, 1992). Damit ändert sich nicht nur die Sensitivität des Systems, sondern unter Umständen auch die Toxikologie. Eine Veränderung, die

zum Beispiel zu einer anderen Einstufung der toxischen Eigenschaften eines Gases im Verhältnis zu einem Referenz-Gas führen kann. Vergleicht man die Toxizität von Ozon und Stickstoffdioxid in den durchgeführten Expositionen bei niedrigem Mediumstand miteinander, so erhält man in der grafischen Darstellung folgendes Ergebnis.

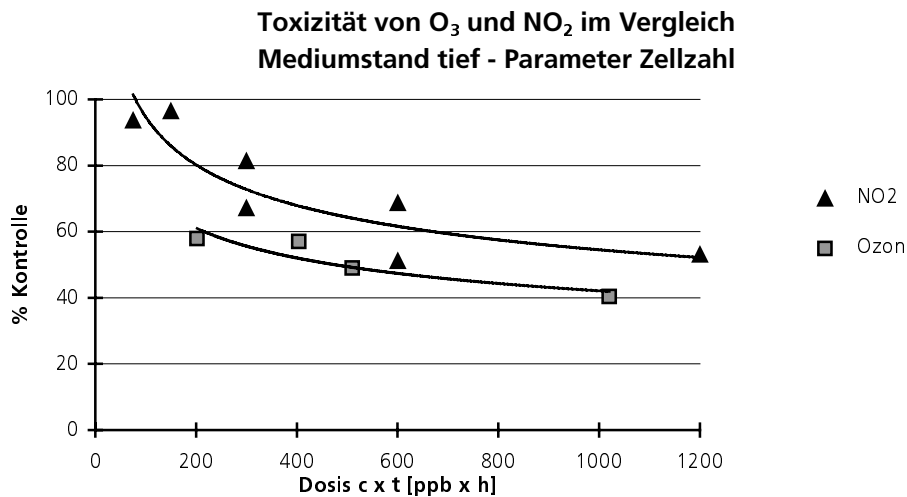


Abb. 4.3 Toxizität von Ozon und Stickstoffdioxid für das Zellsystem Lk004 im neu entwickelten Expositionssystem bei niedrigem Medienstand außerhalb der Transwell-Inserts. Parameter Zellzahl, Berechnung aus den im Ergebnisteil grafisch dargestellten Meßwerten.

Die Grafik läßt eine höhere Toxizität von Ozon gegenüber Stickstoffdioxid erkennen. Dieses Ergebnis entspricht der üblichen Einstufung des toxischen Potentials der beiden Gase zueinander, nach der Ozon z. B. auch ein deutlich niedrigerer MAK-Wert zugeordnet wird (DFG, 1995; Greim, 1995).

Führt man den entsprechenden Vergleich für die Experimente bei hohem Mediumstand durch, kommt man zu dem folgenden Ergebnis.

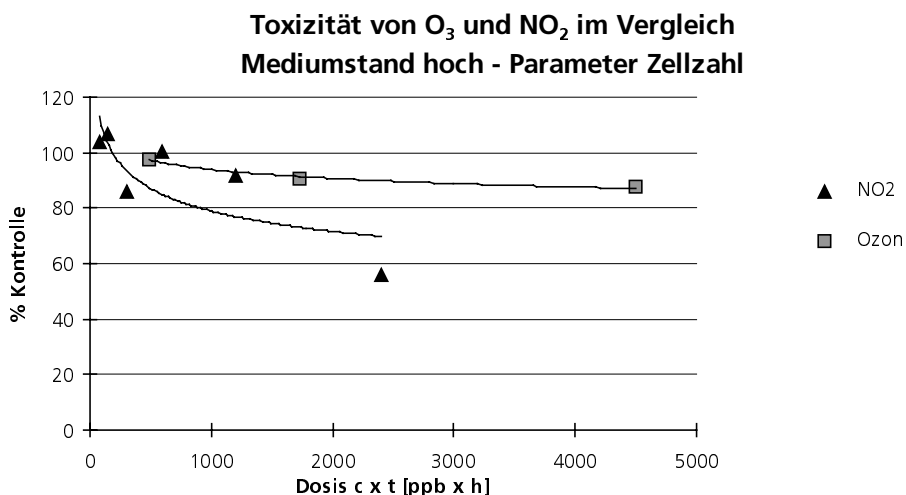


Abb. 4.4 Toxizität von Ozon und Stickstoffdioxid für das Zellsystem Lk004 im neu entwickelten Expositionssystem bei hohem Medienstand außerhalb der Transwell-Inserts. Parameter Zellzahl, Berechnung aus den im Ergebnisteil grafisch dargestellten Meßwerten.

Die Toxizität der beiden Gase stellt sich unter diesen Bedingungen in kleineren Dosen als vergleichbar dar. In höheren Dosen findet man eine höhere Toxizität für Stickstoffdioxid, was einer Umkehr der Verhältnisse entspricht, die im System mit niedrigem Mediumstand ermittelt wurden.

Die essentielle, allgemein gültige Bedeutung der Kontrolle der Mediumüberschichtung von Zellen in air/liquid-Systemen kann aus den bereits mehrfach angeführten Modellrechnungen (Behnke *et al.*, 1998; Pryor, 1992) entnommen werden. Experimentell wird sie auch durch eine Arbeit bestätigt, in der in einer biphasischen Kultur humane Zellen apikal mit Medium überschichtet wurden, und der Vitalitätsverlust der Zellen bei Exposition gegen Ozon gemessen wurde (Tarkington *et al.*, 1994). Die Ergebnisse zeigten dort bei konstanter Ozonkonzentration einen zur Überschichtungshöhe proportional abnehmenden Vitalitätsverlust.

Der sich in dieser Arbeit deutlich darstellende Einfluß der äußeren Mediumhöhe um das Transwell-Insert reiht sich zwanglos in diese Ergebnisse ein. Er ist das Resultat der Zusammenstellung der hier verwendeten Membran mit der entsprechenden Porengröße und -dichte mit dem restlichen Aufbau, inklusive des Zellayers mit der spezifischen Zelldichte. Die ebenfalls durchgeführten Experimente mit dem zweiten Zellsystem HFBE lassen erkennen, daß auch bei dessen Verwendung die Sensitivität des Gesamtsystems bei Betrieb mit niedrigem Mediumstand sehr hoch ist. Es ist daher zu vermuten, daß das verwendete Zellsystem auf diesen Effekt keinen wesentlichen Einfluß hat. Die eingesetzte Membran ist im Rahmen der kommerziell zur Verfügung stehenden Porengrößen (ca. 0,2 - 8 µm) mit einer Porengröße von 0,4 µm eher unter den kleinporigen Membranen anzusiedeln. Gleiches gilt für die Porenanzahl. Bei Verwendung großporigerer Membranen wird der Effekt aber eher zunehmen, da der Durchtritt von Kulturmedium durch die Membran mit zunehmender Porengröße- und Anzahl erleichtert werden wird. Aus diesen Zusammenhängen ist zu folgern, daß die hier beobachteten Effekte keine sind, die nur in dieser experimentellen Lösung zu finden sind, sondern auch für andere Aufbauten Bedeutung haben.

4.2.3.2 Sensitivität

Eine hohe Sensitivität im Sinne der Detektion biologischer Wirkungen von Gasen in kleinen Konzentrationen muß aufgrund der Zielrichtung Biomonitoring ein wesentliches Qualitätsmerkmal für den experimentellen Aufbau sein. Es sollte möglich sein, die biologische Wirkung von Gasen in umweltrelevanten Konzentrationen zu untersuchen. Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über Grenzwerte, Einstufungen, und Meßwerte aus der Umwelt für die Stoffe Ozon und Stickstoffdioxid.

Aus der Tabelle ist ablesbar, daß die in dieser Arbeit schwerpunktmäßig untersuchten Ozonkonzentrationen (200 ppb und 500 ppb) oberhalb der angegebenen Richtwerte liegen. Es sind jedoch keine unrealistischen Werte für Photosmog-Situationen in innerstädtischen Bereichen. Die bei Stickstoffdioxid vorwiegend untersuchten Konzentrationen von 150 und 300 ppb liegen weit unterhalb des MAK-Wertes und die

niedrigere Konzentration sogar unterhalb des WHO-Standards für eine einstündige Exposition.

Gas	Einstufung/Untersuchung	Konzentration [ppb]	Quelle
O ₃	Jahresmittelwert Deutschland 1997	35	(Umweltbundesamt, 1998)
	1h Maximum Deutschland 1997 (an allen deutschen Stationen)	126,5	(Umweltbundesamt, 1998)
	MAK-Wert	100	(Greim, 1995)
	Qualitätsstandard EPA (USA)	120 (1h)	(Umweltbundesamt, 1998)
	innerstädtischer Bereich, Photosmog	100 - 600	(Becker <i>et al.</i> , 1985)
	WHO-Standard	75 - 100 (1h) 50 - 60 (24h)	(Brimblecombe, 1996)
NO ₂	MAK-Wert	5000	(DFG, 1995)
	WHO-Standard	222 (1h) 83 (24h)	(Brimblecombe, 1996)
	Qualitätsstandard USA	50	(Finlayson-Pitts <i>et al.</i> , 1986)
	innerstädtischer Bereich, Photosmog	70 - 100	(Brimblecombe, 1996)
	Los Angeles, 1980	22 - 120	(Finlayson-Pitts <i>et al.</i> , 1986)
	außerstädtisch, unverschmutzt	1 - 20	(Finlayson-Pitts <i>et al.</i> , 1986)

In der folgenden Aufstellung wird am Beispiel von Ozon eine Übersicht über Konzentrationsbereiche gegeben, in denen mit anderen Testsystemen biologische Wirkungen und Toxizität detektiert wurde.

Gas	Testsystem	Wirkung bei [ppb] (Endpunkt)	Quelle
O ₃	human	> 80 (Lungenfunktion)	(Greim, 1995)
	Tier	> 100 (akut, chronisch) (Lungenfunktion)	(Greim, 1995)
	humane bronchiale Epithelzellen	500 (LDH, 2h) 200 (colony-forming efficiency, 2h)	(Gabrielson <i>et al.</i> , 1994)
	BEAS 2B	100 (LDH, 1h)	(Devlin <i>et al.</i> , 1994)
	human nasal mucosa	100 (PGF ₂ , 24h)	(Schierhorn <i>et al.</i> , 1997)
	2H3 (Ratte)	300 (LDH, 1h)	(Peden <i>et al.</i> , 1994)
	GPTe (Meerschwein)	100 (LDH, 1h)	(Wright <i>et al.</i> , 1994)
	bronchiale Epithelzellen (Primaten)	500 (Zellzahl, 6h)	(Jabbour <i>et al.</i> , 1998)
	A549	500 (LDH, 3h)	(Dumler <i>et al.</i> , 1994)
	humane Lungenzellen	800 (Wachstumshemmung, 48h)	(Hagar <i>et al.</i> , 1981)
	BEAS 2B (in Kokultur)	150 (IL-6, IL-8, 1,5h)	(Mogel <i>et al.</i> , 1998)

Der Vergleich dieser Literaturwerte mit den in dieser Arbeit erhaltenen Daten ist quantitativ nicht möglich. Die Systeme sind zu unterschiedlich hinsichtlich des Expositionsaufbaus, des verwendeten Testsystems, der Expositionszeiten und der analysierten Endpunkte. Die analysierten Endpunkte repräsentieren jeweils verschiedenartige und unterschiedlich schwere Wirkungen auf das biologische System. Die Konzentration, die in der Tabelle für das Einsetzen einer Wirkung angegeben wurde, ist diejenige, bei der in der genannten Studie eine erste, von der Kontrolle unterscheidbare Wirkung einsetzte. Die Stärke dieser Wirkung kann hier also ebensowenig abgelesen werden.

Die Zusammenstellung zeigt jedoch, daß Wirkungen von Ozon auf *in vitro*-Systeme in etwa von einer Konzentration oberhalb 100 ppb gemessen wurden. Zum Teil sind dies Endpunkte, die eher eine Stoffwechselveränderung in einem subtoxischen Bereich (Interleukine IL-6, IL-8) oder eine geringe Toxizität (LDH) repräsentieren.

Ein *in vitro*-System, in dem nach einstündiger Exposition gegen 200 ppb Ozon eine der Zellzahlveränderung auf weniger als 60 % der Kontrolle entsprechende Wirkung detektiert wurde, konnte in der Literatur nicht gefunden werden. Die Sensitivität dieses Systems ist daher als vergleichsweise hoch einzustufen.

4.2.3.3 Effekte der Gasexposition auf ATP- und Glutathion-Gehalte

Nach Exposition von Lk004-Zellen und HFBE-Zellen in System 2 gegen Ozon und Stickstoffdioxid waren Messungen zum intrazellulären Glutathion- und ATP-Gehalt durchgeführt worden. Die Auswertung der Ergebnisse hatte zu reproduzierbaren Resultaten geführt. Eine eingehende inhaltliche Bewertung dieser Ergebnisse hingegen erscheint nicht sinnvoll. Hierfür sind zwei Gründe ausschlaggebend.

Zum einen hatten Experimente mit Modellsubstanzen gezeigt, daß die Beobachtung und Bewertung der ausgewählten Parameter nur in subtoxischen Expositionsbereichen sinnvoll ist. Bei den eingesetzten Gaskonzentrationen von 202 ppb und 510 ppb Ozon sowie 150 ppb und 300 ppb Stickstoffdioxid wurden jedoch erhebliche Verringerungen der Zellzahlen als Ausdruck starker Toxizität gemessen. Die Voraussetzung einer subtoxischen Substanzdosierung war demnach nicht gegeben. Zum anderen hatten die gleichen Experimente mit Wasserstoffperoxid, *tert.*-Butylhydroperoxid und Zigarettenrauchkondensat gezeigt, daß Endpunkte wie die intrazelluläre Konzentration von Glutathion erheblichen kinetischen Veränderungen unterliegen können. Die Bewertung eines Ergebnisses kann also nur dann sinnvoll sein, wenn Kenntnisse über den möglichen Verlauf von Kinetiken vorhanden sind. Es ist jedoch fraglich, ob derartige Kinetiken für ein Zellsystem in air/liquid-Kultur und submerser Kultur vergleichbar sind. Eine Bewertung der erhaltenen Ergebnisse würde demzufolge zunächst eine kinetische Studie der Endpunkte nach Gasexpositionen im air/liquid-System voraussetzen.

Dennoch werden zwei Effekte in den Ergebnissen deutlich, die unter den genannten Vorbehalten besprochen werden sollen.

Nach Expositionen gegen Ozon wurde bei der Untersuchung von Lk004-Zellen eine Verringerung des Gehaltes an reduziertem Glutathion, an ATP und eine Verringerung

des ATP/ADP-Verhältnisses gefunden. Das Verhältnis von oxidiertem zu reduziertem Glutathion fiel jedoch nicht dementsprechend, sondern stieg bis auf ca. 120 % der Kontrolle nach 2stündiger Exposition gegen 510 ppb Ozon an. Dieser Effekt wurde nicht nach Expositionen gegen Stickstoffdioxid beobachtet. Er steht in Übereinstimmung der höheren oxidativen Wirkung auf die Zellen durch Ozon gegenüber Stickstoffdioxid. Nach Expositionen gegen Stickstoffdioxid hingegen war in allen Experimenten, beim Zellsystem Lk004 und beim Zellsystem HFBE, der ATP-Gehalt und/oder das ATP/ADP-Verhältnis gegenüber der Kontrolle erhöht. Im Zellsystem HFBE stieg das ATP/ADP-Verhältnis im durchgeführten Einzelexperiment nach Exposition gegen 75 ppb Stickstoffdioxid auf ca. 170 % der Kontrolle. Dieser Effekt wiederum wurde nicht nach Ozonexpositionen gefunden. In einer anderen Arbeit wurde die Wirkung von Stickstoffdioxid auf Alveolar-Makrophagen untersucht (Wallaert *et al.*, 1996). Dort wurde nach Exposition gegen das Gas im Konzentrationsbereich von 100 - 500 ppb für 24 Stunden ebenfalls eine deutliche Erhöhung des zellulären ATP-Gehalts auf bis zu 190 % der Kontrolle gefunden.

4.2.3.4 Vergleich zwischen gängigem air/liquid-Expositionssystem und neu entwickeltem Aufbau

Aufgrund der Verschiedenheit der eingesetzten Zellsysteme und der analysierten Parameter können die Expositionssysteme 1 und 2 nur unter dem Gesichtspunkt der Detektierbarkeit einer biologischen Wirkung in Abhängigkeit von der Gaskonzentration bei Expositionen gegen Ozon und Stickstoffdioxid verglichen werden.

Die Ergebnisse der Expositionen gegen Stickstoffdioxid in System 1 (vgl. Abb. 3.3) zeigten, daß dort bei einer Expositionszeit von 3 Stunden gegen 89 ppb Stickstoffdioxid keine und gegen 359 ppb Stickstoffdioxid eindeutig von der Reinluftexposition unterscheidbare Ergebnisse erhalten wurden. Die Exposition gegen 186 ppb Stickstoffdioxid hingegen lieferte ein nicht eindeutig interpretierbares Resultat. Beurteilt nach dem DNA-Gehalt, dem Tetrazoliumsalzumsatz (WST-1), und der Aktivität unspezifischer Esterasen, lagen die Ergebnisse im Schwankungsbereich der Reinluftexpositionen. Die LDH-Freisetzung und der BrdU-Einbau hingegen deuteten einen höheren Vitalitätsverlust als nach Expositionen gegen Reinluft an. Es ist zu vermuten, daß dies genau der Bereich ist, in welchem die Detektierbarkeit der toxischen Wirkung in diesem experimentellen Aufbau beginnt. Eindeutig in dieser Hinsicht sind die Ergebnisse der Expositionen gegen Ozon (vgl. Abb. 3.4). Sie lassen eine stark toxische Wirkung bereits der kleinsten eingesetzten Konzentration von 235 ppb Ozon erkennen.

Diese Daten zugrunde legend, ergeben sich damit die Sensitivitätsgrenzen für Stickstoffdioxid bei 186 ppb und für Ozon bei < 235 ppb jeweils nach 3stündiger Exposition.

Im System 2 ergaben Expositionen gegen Ozon in einer Konzentration von 202 ppb bereits nach 1stündiger Exposition von der Reinluft-Exposition unterscheidbare Werte bezüglich des Parameters Tetrazoliumsalzumsatz (vgl. Abb. 3.100). Nach 2stündiger Exposition gegen 202 ppb Ozon wurden 40 % des Tetrazoliumsalzumsatzes der Reinluftkontrolle gefunden (vgl. Abb. 3.102). Dies entspricht in etwa der Wirkung, die in

System 1 nach der Exposition der Zellen gegen 235 ppb Ozon für 3 Stunden gefunden wurde (vgl. Abb. 3.4).

Ein ähnliches Bild ergibt der Vergleich der Expositionen gegen Stickstoffdioxid. In System 2 konnte die Wirkung von 150 ppb NO₂ nach 2stündiger Exposition eindeutig von derjenigen der Reinluft-Exposition unterschieden werden. Hingegen war dies in System 1 erst nach 3stündiger Exposition gegen 186 ppb Stickstoffdioxid möglich.

Damit wurde beim Übergang von System 1 zu System 2 eine deutliche Steigerung der Sensitivität des Testsystems erhalten. Diese wird ebenfalls durch die bereits diskutierte deutlichere Wirkung der Reinluftexposition im System 2 bestätigt (vgl. Kapitel 4.2.2.1).

Das gewählte Strömungsmodell, das einen Kontakt der Zellen mit dem Gas nur durch Verwirbelungs- und Diffusionsprozesse und nicht durch direkte Anströmung vorsieht (vgl. Kapitel 4.2.1.2), wird daher als geeignetes Konzept bewertet.

4.2.4 Zugänglichkeit der Untersuchung komplexer atmosphärischer Gasmischungen

In den einführenden Experimenten unter Verwendung des gängigen Konzeptes zur air/liquid-Exposition eukaryontischer Zellen waren Expositionen gegen komplexe Gasmischungen mit Peroxyacetyl-Nitrat und Kohlenwasserstoffen durchgeführt worden.

Peroxyacetyl-Nitrat ist ein Stoff, der in die Prozesse der photochemischen Alterung von Kohlenwasserstoffmischungen wie sie auch bei Autoabgasen vorkommen, involviert ist (Atkinson *et al.*, 1984; Stephens *et al.*, 1973). Die toxischen Eigenschaften dieses Stoffes wurden für Pflanzen (Taylor, 1969), Sulfhydryl-haltige Zellbestandteile (Mudd, 1966; Mudd *et al.*, 1966; Mudd *et al.*, 1969) und *in vivo* mit Ratten und Mäusen (Campbell *et al.*, 1967; Campbell *et al.*, 1970; Krussse *et al.*, 1977; Peak *et al.*, 1969) und humanen Probanden (Drechsler-Parks, 1987; Drechsler-Parks *et al.*, 1987; Drechsler-Parks *et al.*, 1989) untersucht. Die Studien belegen, daß Peroxyacetyl-Nitrat eine toxische Wirkung auf eukaryontische Zellen ausübt, deren Stärke abhängig vom biologischen Testsystem (Ratte/Maus oder human) und Nebenbestandteilen der Expositionsatmosphäre (Stickstoffdioxid, Ozon) ist.

Die durchgeführten Einzelexperimente zur Exposition gegen Gasmischungen mit PAN in Konzentrationen von 20 und 88 ppb (vgl. Kapitel 3.1.5) zeigen, daß die Toxizität des Stoffes konzentrationsabhängig mit dem Testsystem nachweisbar ist.

Kohlenwasserstoffe wurden in Zusammensetzungen eingesetzt, die bei der photolytischen Reaktion durch Einsatz des Sonnen-Simulators und Zusatz von NO₂ als Radikal-Starter, zu einer dem Photo-Smog ähnlichen Expositionsatmosphäre führten. Die dabei in der Smogkammer analysierten Konzentrationen der Komponenten lagen an der oberen Grenze umweltrelevanter Konzentrationen:

Komponente [ppb]	KWs dunkel	KWs hell	KWs, NO ₂ hell	KWs, NO ₂ hell	Umgebungsatmosphäre*)
Acetaldehyd	11,3	12,5	28	52	1.5 - 10
n-Butan	200	208	119	261	0.01 - 182
n-Pentan	130	134	63	137	0.023 - 64
Isopren	7,6	5	0	0	0.2 - 2.9
n-Hexan	115	117	46	109	4-27
Benzol	59	61	44	92	0.025 - 57
Toluol	97	99	38	95	0.005 - 129
NO ₂	<< 1	< 1	12,5	31,5	< 5 - 120
PAN	<< 1	< 1	102	219	< 2 - 70
Ozon	<< 1	3	618	986	< 50 - 600

*) (Becker *et al.*, 1985; Finlayson-Pitts *et al.*, 1986; Graedel, 1978)

Die Ergebnisse der im System 1 durchgeführten Expositionen gegen Kohlenwasserstoffgemische nach den durch Bestrahlung und NO₂-Zusatz eingeleiteten photochemischen Umsetzungen belegen eine deutliche Zunahme der Toxizität der Gasmischungen (vgl. Kapitel 3.1.6). Dies entspricht den darin in höherer Konzentration als in der unbestrahlten Mischung vorliegenden Substanzen wie Ozon und PAN. Die Messungen dokumentieren damit, daß der biologische Effekt auch solcher Prozesse mit dem biologischen Testsystem erfaßbar ist.

Für System 2 konnte jedoch im Vergleich zu System 1 eine höhere Sensitivität nachgewiesen werden (vgl. Kapitel 4.3.2.4). Im Zusammenhang mit diesen Ergebnissen läßt sich daher folgern, daß auch die Untersuchung der biologischen Wirkung komplexer Gasmischungen in umweltrelevanten Konzentrationen mit dem in dieser Arbeit neu etablierten System (System 2) erfolgreich möglich ist.

4.2.5 Expositionen gegen atmosphärische Gase *in vitro*: Schlußfolgerung

Die Ergebnisse stellen das Verhältnis der Größe des Expositionsgasflusses zu der Befeuchtung der Zellen von der Unterseite durch die Membran als das entscheidende Gleichgewicht für den Expositionsverlauf heraus. Die Vitalität der Zellen und die Sensitivität des gesamten Testsystems werden wesentlich dadurch geprägt. Durch die Möglichkeit, in der neu entwickelten Apparatur Einfluß auf beide Faktoren nehmen zu können, können die experimentellen Bedingungen diesbezüglich entsprechend der Fragestellung abgestimmt werden.

In summa lassen die Ergebnisse der Expositionsexperimente gegen atmosphärische Gase *in vitro* die erfolgreiche Umsetzung des theoretischen Konzeptes erkennen. Es wurde grundsätzlich mit Gasen gearbeitet, die hinsichtlich ihrer relativen Feuchte und ihres Kohlendioxid-Gehaltes der Umgebungsatmosphäre entsprachen. Trotz dieser Bedingungen konnten Zellen für zwei Stunden bei gutem Vitalitätserhalt exponiert werden. Die Ergebnisse der Expositionen gegen Ozon und Stickstoffdioxid lassen erkennen, daß die Sensitivität des Systems zur Detektion biologischer Wirkungen von Gasen sehr hoch und ausreichend für die Untersuchung umweltrelevanter Konzentrationen ist. Der Vergleich mit den durchgeführten Experimenten nach

konventionellem Expositions-konzept läßt darauf schließen, daß auch die Untersuchung komplexer Gasmischungen mit dem System erfolgreich möglich ist. Die Reproduzierbarkeit des Systems war nicht schlechter als diejenige, die in Experimenten mit Modellsubstanzen erhalten worden war. Die Untersuchung anderer Endpunkte als des Zellzahl-Gehaltes und des Tetrazoliumsalzumsatzes lieferte Hinweise darauf, daß substanzspezifische Wirkungen detektierbar sind. Damit wurde die Zielsetzung vollständig erfüllt.

5 Schlußfolgerungen und Ausblick

Zur Etablierung eines Systems für die Untersuchung atmosphärischer Gase *in vitro* wurden die drei Aspekte (1) Zellkultursystem (2) Expositionssystem und (3) biochemische Analytik schwerpunktmäßig bearbeitet. Die Aufteilung gestattete die Etablierung und Charakterisierung der Einzelkomponenten, die letztlich zur erfolgreichen Umsetzung des Konzeptes zusammengeführt werden konnten.

Der Einsatz eines Indikatorzellsystems führte zu den erwünschten Resultaten. Bei vorhandener Organ- und Speziesrelevanz des Zellsystems konnten Experimente mit hoher Reproduzierbarkeit durchgeführt werden. Effekte auf grundlegende zelluläre Funktionen bezüglich der Vitalität, des Energiestoffwechsels und Reaktionen in Zusammenhang mit dem Glutathion-Redox-Zyklus konnten sicher detektiert werden und waren sinnvoll zu interpretieren. In den Expositionen gegen Modellsubstanzen konnten substanzspezifische, sowie zeit- und konzentrationsabhängige Effekte ermittelt werden. Nach Induktion oxidativer Schäden im subtoxischen Bereich durch Modellsubstanzen konnte die Aktivierung antioxidativer zellulärer Mechanismen beobachtet werden. Im Zusammenhang der dadurch belegten Sensitivität der Zellen gegen oxidativ wirksame Substanzen und der Möglichkeit, das Zellsystem unter air/liquid-Bedingungen auf mikroporösen Membranen zu kultivieren, erwies es sich für den Einsatz zur Untersuchung atmosphärischer Gase als äußerst geeignet.

Die Ergebnisse der Expositionen gegen Modellsubstanzen zeigten, daß die Untersuchung von Endpunkten aus einem zusammenhängenden Reaktionsmodell auch in solchen wie den durchgeführten screeningartigen Experimenten ein sinnvoller experimenteller Ansatz ist. Trotz unaufwendiger, zeit- und materialsparender Analysemethoden waren Untersuchungen möglich, die für alle drei eingesetzten Substanzen eindeutig unterschiedliche zelluläre Reaktionen erkennen ließen. Damit wurde ebenfalls die hohe Relevanz des ausgewählten Reaktionszusammenhangs mit Schwerpunkt auf den Reaktionen des Glutathion-Redox-Zyklus für die Toxikologie derartiger Expositionen nachgewiesen. Die Dosierung im subtoxischen Bereich erwies sich dabei als wesentliches Kriterium für die erfolgreiche Durchführung solcher

Untersuchungen. Dieser Umstand läßt das Modell als besonders geeignet für die Untersuchung von umweltrelevanten Atmosphären erscheinen, da dort mit sehr kleinen Konzentrationen biologisch aktiver Gase, und somit eher mit subtoxischen zellulären Ereignissen zu rechnen ist. In den durchgeführten Modellexpositionen treten besonders die Endpunkte Glutathion-Gehalt, ADP/ATP-Gehalt, und die Aktivitäten der Enzyme Glutathion-Peroxidase, Glutathion-Reduktase, und Superoxid-Dismutase durch aussagekräftige Ergebnisse nach kurzer Expositionszeit bei niedrigen Substanzkonzentrationen hervor. Dies läßt sie zur Charakterisierung einer Substanzwirkung unter Verwendung des etablierten Testsystems besonders geeignet erscheinen. Zum Zwecke eines Substanzscreenings und der Untersuchung der Vitalität der Zellen sowohl unter air/liquid- als auch unter submers-Bedingungen erwies sich die Untersuchung der Kombination aus Tetrazoliumsalzumsatz und DNA-Gehalt oder der elektronischen Zellzahlquantifizierung als sehr zuverlässige und sensitive Methode.

Expositionen gegen Reinluft, Ozon und Stickstoffdioxid im neu etablierten Expositionssystem belegten den großen Einfluß der Parameter Gasstrom und Flüssigkeitsschicht über den Zellen für den Expositionsverlauf. Der Mediumstand außerhalb des Transwells als regulatorische Größe für die Dicke des Mediumlayers über den Zellen stellte sich als wesentliches Kriterium für die Sensitivität des Systems heraus. Während grundsätzlich der Einfluß der Schichtdicke über den Zellen ein bekannter und durch experimentelle wie theoretische Daten gut gestützter Effekt ist, war eine derart deutliche Beeinflussung desselben durch den äußeren Mediumstand ein bisher nicht erkanntes Phänomen. Gerade die Möglichkeit, diesen einflußgebenden Parameter in dem etablierten Aufbau in einem großen Bereich einstellen zu können, eröffnet die praktische Möglichkeit, eine Anpassung der Sensitivität des Systems an die toxische Wirkung des zu untersuchenden Gases vorzunehmen. Je nach Fragestellung der Untersuchung kann eher die Vitalität der Zellen oder die Sensitivität des Systems gefördert werden. Im Zusammenhang der Ergebnisse aus den mit dem System durchgeführten Expositionen besonders gegen Ozon (1) mit Literaturdaten, (2) mit Ergebnissen aus Expositionen nach dem konventionellen Konzept und (3) mit der Bedingung einer subtoxischen Exposition für mechanistische Untersuchungen stellt sich die hier erreichte Sensitivität als mehr als ausreichend dar. So ließen die Ergebnisse erkennen, daß bereits eine 60minütige Exposition gegen 202 ppb Ozon eine stark toxische Wirkung auf das biologische Indikatorsystem hatte. Die Sensitivität des Systems könnte daher für eine solche Untersuchung durch Erhöhung des Mediumspiegels eingeschränkt werden, um durch eine subtoxische Dosierung die Bedingungen für mechanistische Untersuchungen zu schaffen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen weiterhin erkennen, durch welche Variationen die universelle Einsetzbarkeit des Systems erweitert werden könnte.

Die mit dem Zellsystem HFBE erfolgreich durchgeführten Experimente lassen darauf schließen, daß die für Lk004-Zellen etablierten Bedingungen keine sind, die nur eine Arbeit mit diesem Zellsystem zulassen. Der Einsatz eines im Rahmen toxikologischer

Untersuchungen weiter verbreiteten Zellsystems ließe den direkten Vergleich der Expositionen mit Ergebnissen aus anderen Studien zu und könnte daher aus dem Zusammenhang dieser Daten das Verständnis und die Interpretierbarkeit der Ergebnisse fördern. Ein Übergang zur Verwendung eines weiteren Zellsystems sollte daher ebenso möglich sein. Die Ergebnisse aus Modellexpositionen zeigen in diesem Zusammenhang, daß die Reproduzierbarkeit dabei ein wesentliches Auswahlkriterium für das Zellsystem sein muß, eine Voraussetzung, die durch Zelllinien ausreichend gewährleistet wird. Der große Einfluß der Flüssigkeitsüberschichtung der Zellen auf Vitalität und die biologische Wirkung des Gases sollte hier insbesondere berücksichtigt werden. Es ist denkbar, ein Zellsystem einzusetzen, daß zur Surfactant-Synthese befähigt ist. Als alternative Strategie hierzu könnte die Aufbringung einer definierten Schicht ELF, Mucus oder Surfactant verfolgt werden.

Die Untersuchung speziell des Glutathion-Gehaltes und des ATP-Gehaltes in Expositionen gegen Zigarettenrauchkondensat ließ erkennen, daß deutliche Veränderungen im zellulären Stoffwechsel bereits nach Expositionszeiten von weniger als 120 Minuten eintreten. Es ist daher mit Effekten schon während der Exposition gegen atmosphärische Gase innerhalb eines Zeitraumes von 2 Stunden zu rechnen, so daß deren Detektion die Sensitivität des Systems weiterhin erhöhen würde. Die Analytik müßte dazu *in situ*, während der Expositionsphase stattfinden. Als Endpunkte bieten sich dazu intrazelluläre Parameter an, deren Relevanz in Zusammenhang mit oxidativen Veränderungen eindeutig belegt ist, und die durch optische Meßverfahren analysiert werden können. Denkbar sind hier Untersuchungen zum intrazellulären Ca^{2+} -Haushalt, dem intrazellulären pH-Wert, dem Mitochondrienpotential und der Nachweis intrazellulärer Radikale. Diese Endpunkte sind mit verschiedenen Fluorophoren analysierbar. Eine miniaturisierte Analyseeinrichtung, z. B. unter Nutzung der Lichtleitertechnik müßte dazu in den Experimentalaufbau integriert werden.

Der experimentelle Aufbau in der hier realisierten Form erwies sich als zuverlässig und zweckmäßig. Eine Veränderung des Gerätes hinsichtlich (1) des verwendeten Materials, (2) der eingesetzten Fertigungstechnik (3) der Thermostatisierungstechnik und (4) der Anordnung der gleichzeitig exponierten Transwell-Inserts möglicherweise ebenfalls unter Veränderung ihrer Anzahl erwies sich als förderlich für die Routine-Handhabung. So ist das im wesentlichen verwendete Material Glas in Kombination mit der Wasserbad-Thermostatisierung anfällig gegen Defekte in der täglichen Anwendung. Der Umstieg auf einen Kunststoff, der ebenfalls chemisch reaktionsträge oder mit einem reaktionsträgen Material beschichtbar ist, würde auch die Möglichkeit einer maschinellen Fertigung des Gerätes eröffnen. Zusammen mit einer Veränderung der Anordnung der Transwell-Inserts könnte dadurch eine vereinfachte und ebenso reproduzierbare Gasversorgung der Expositionsgefäße gewährleistet werden.

Die Untersuchungen zum Zellkultursystem und Expositionen gegen Modellexpositionen in Mikrotiterplatten hatten gezeigt, daß die dort eingesetzte Zellmenge von 5000 - 20000 Zellen je Well ausreichend zur reproduzierbaren und sensitiven Analyse

der untersuchten Parameter war. Ein Übergang zu weiterhin verkleinerten Wachstumsflächen auch für die Expositionen gegen Gase würde die Anzahl möglicher Parallelen erhöhen, dadurch die Reproduzierbarkeit weiterhin verbessern, das Gerät verkleinern und den Kosten- und Zeitaufwand senken.

In einem veränderten Aufbau muß in jedem Fall die Beeinflußbarkeit des Mediumdruckes auf die Unterseite der Membran berücksichtigt werden. Es wäre vorteilhaft, wenn die physikalischen Bedingungen, unter denen die Zellen exponiert werden, während der Exposition erfaßt werden könnten. Miniaturisierte Fühler vorwiegend für den Gasfluß, die Temperatur und die Feuchte in möglichst großer Nähe zu den Zellen wären hier denkbar.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, daß die Untersuchungen von atmosphärischen Gasen *in vitro* unaufwendig und reproduzierbar möglich sind. Damit sind die Grundlagen gegeben, umweltrelevante Fragestellungen dieser Art mit biologischen Testsystemen zu untersuchen.

6 Zusammenfassung

Es wurde ein System zur Untersuchung atmosphärischer Gase *in vitro* etabliert. Das System besteht aus einem humanen Zellkultursystem der Lunge, einem Expositionsgerät und Methoden für die biochemische Analytik zur Erfassung des Expositionseffektes. Die Zellen können in diesem Expositionsgerät brutschrankfern gegen atmosphärische Gase exponiert werden. Eine physikalische Konditionierung des Probegases hinsichtlich Kohlendioxidgehalt und Feuchte ist nicht notwendig. Das Probegas kann nativ eingesetzt werden.

Für eine Zelllinie aus humanen, adulten Lungenfibroblasten Lk004 wurde eine Kulturführung im Sinne der experimentellen Anforderungen etabliert. Dazu gehörte die Umstellung auf nicht-proliferierende Bedingungen durch serumfreie Kulturführung, eine verlängerte Vorkultur im proliferierenden Zustand, die Vorkultivierung unter Zusatz von Selen zur Induktion der zellulären Glutathion-Peroxidase-Aktivität und die Umstellung auf ein Kulturmedium mit Zusatz von HEPES-Puffer. Die Zellen wurden submers in Mikrotiterplatten und unter air/liquid-Bedingungen auf mikroporösen Membranen in Transwell-Inserts kultiviert. Das Kultursystem erwies sich in jeder Kulturführung als reproduzierbar. Beim Wechsel vom proliferativen zum nicht-proliferativen System wurden Veränderungen im zellulären Stoffwechsel festgestellt, die sinnvoll interpretierbar waren.

Es wurden Methoden zur biochemischen Analytik der kultivierten Zellen etabliert. Die Methoden stützten sich auf etablierte Standard-Verfahren, die zur Durchführung einer Routine-Analytik an adhärennten Zellaussaaten kleiner Zellzahlen optimiert wurden. Die Analytik diente der Bestimmung von Parametern aus drei funktionellen zellbiochemischen Zusammenhängen. Zur Bestimmung (1) der Zellmenge, (2) der Charakterisierung des zellulären Energiestoffwechsels und allgemeiner Vitalität sowie (3) zur Untersuchung von Endpunkten in enger mechanistischer Beziehung zum Reaktionsmodell des oxidativen Stresses und dem Glutathion-Redox-Zyklus wurden Fluoreszenz-, Lumineszenz- und HPLC-Techniken genutzt. Assays für zahlreiche Enzymaktivitäten aus den Bereichen (2) und (3) wurden als photometrische

Meßverfahren etabliert. Es wurden zum Teil unterschiedliche Methoden erprobt, um die reproduzierbare Bestimmung der Endpunkte in kleinen Zellmengen zu gewährleisten.

Das biologische Indikatorsystem, bestehend aus dem Zellkultursystem humaner Lungenfibroblasten Lk004 und der dafür etablierten Analytik, wurde in submersen Modellexpositionen eingesetzt. Wasserstoffperoxid und *tert.*-Butylhydroperoxid wurden als einfache Modellsubstanzen für oxidativen Streß und Zigarettenrauchkondensat der Studienzigarette K1R4F als Modellsubstanz für ein komplexes Stoffgemisch eingesetzt. Es wurden Expositionen in subtoxischen Dosisbereichen durchgeführt. Die Analyse besonders der Parameter aus den Reaktionszusammenhängen des oxidativen Stresses ließ bereits in diesen Konzentrationsbereichen deutliche substanz-, konzentrations- und zeitabhängige Effekte erkennen. Auch diese Ergebnisse waren in ihrem Zusammenhang und vor dem Hintergrund anderer Arbeiten sinnvoll interpretierbar. Das biologische Indikatorsystem lieferte in den durchgeführten Modellexpositionen reproduzierbare Ergebnisse.

Unter besonderer Berücksichtigung der Aspekte (1) einer möglichen Mobilität des Aufbaus durch brutschrankferne Kultivierung, (2) des nativen Einsatzes des Probegases ohne Anreicherung mit Kohlendioxid oder Befeuchtung und (3) der Voraussetzungen zur Gewährleistung einer möglichst hohen Sensitivität bei gutem Vitalitätserhalt des Zellkultursystems wurde eine Expositionsapparatur entwickelt. Es handelt sich um einen kleinen Aufbau aus den Werkstoffen Glas, Teflon und Silikon. Darin können gleichzeitig drei Transwell-Inserts mit einer Wachstumsfläche von 1,09 cm² exponiert werden. Der Betrieb ist für Transwell-Inserts mit mikroporösen Membranen der Porengröße 0,4 µM vorgesehen. Die Apparatur kann mit einem Mediumfluß betrieben werden und gestattet die Exposition der Zellen bei verschiedenen hohen Mediumständen um das Insert. Durch Unterdruckbetrieb ist eine Probenahme aus drucklosen Gasmischungen möglich. Der Aufbau gestattet die zuverlässige und gleichmäßige Versorgung aller drei Transwell-Inserts mit Kulturmedium und Expositionsgas.

Expositionen gegen atmosphärische Gase *in vitro* wurden in zwei verschiedenen experimentellen Aufbauten durchgeführt. (1) Ratten-Lungenzellen wurden in einem stationären Aufbau nach dem gängigen Konzept für air/liquid-Expositionen verwendet und (2) Expositionen des etablierten Indikatorsystems mit humanen Lungenzellen im neu entwickelten Expositionsgerät durchgeführt. Alle Expositionen wurden gegen Gasmischungen mit realitätsnaher Befeuchtung (maximal 50 - 90 % rH/25 °C) und realitätsnahe Kohlendioxid-Gehalt (CO₂ ≤ 0,03 %) durchgeführt.

Im Aufbau nach konventioneller Methode wurden Experimente mit Gasmischungen von Ozon, Stickstoffdioxid, Peroxyacetyl-Nitrat und Kohlenwasserstoffgemischen durchgeführt. Kohlenwasserstoffgemische wurden auch zur Simulation einer Photosmog-ähnlichen Atmosphäre photochemisch behandelt eingesetzt. Die Experimente zeigten, daß biologische Effekte derartiger Gasmischungen durch das Prüfsystem erfaßbar waren. Unterschiede zwischen photochemisch umgesetzten und photochemisch nicht umgesetzten Kohlenwasserstoffmischungen waren detektierbar.

Im neu entwickelten Aufbau wurden Expositionen des biologischen Indikatorsystems gegen Reinluft, Ozon und Stickstoffdioxid durchgeführt. Bei gutem Vitalitätserhalt konnten die Zellen darin gegen Reinluft unter Bedingungen der Umgebungsatmosphäre für bis zu 2 Stunden exponiert werden. Diese Expositionszeit reichte aus, um biologische Wirkungen der Gase Ozon und Stickstoffdioxid nahe umweltrelevanter Konzentrationen sicher und reproduzierbar zu detektieren. Die Stärke der gemessenen Wirkungen der Gase ließ vermuten, daß die Untersuchung von atmosphärischen Gasen innerhalb umweltrelevanter Konzentrationen mit dem etablierten System ebenfalls erfolgreich möglich ist. Die Parameter (1) Größe des Expositionsgasstromes und (2) Höhe des Mediumstandes außerhalb des Transwells als Maß für die Dicke des Flüssigkeitsfilmes über dem Zellayer erwiesen sich als wesentliche Einflußgrößen auf den Expositionsverlauf hinsichtlich Vitalitätserhalt der Zellen und Sensitivität der Detektion einer biologischen Wirkung der Gase. Zur Validierung dieser Ergebnisse wurden entsprechende Expositionen mit einem weiteren Zellsystem, bestehend aus humanen Lungenepithelzellen durchgeführt. Sie bestätigten die Ergebnisse, die mit dem biologischen Indikatorsystem unter Nutzung der Lk004-Zellen erhalten worden waren. Im Vergleich der Ergebnisse von Expositionen gegen Ozon und Stickstoffdioxid im konventionellen Expositionssystem gegenüber dem neu entwickelten Expositionssystem stellte sich das neu etablierte System bei ähnlichem Vitalitätserhalt der Zellen als sensitiver dar.

Insgesamt wurde ein Expositionssystem erhalten, das hinsichtlich der Eigenschaften des darin verwendeten biologischen Indikatorsystems, bestehend aus Zellsystem und biochemischer Analytik, dessen Verwendung in Expositionen gegen Gase und hinsichtlich der strömungstechnischen Eigenschaften des Expositionsgerätes umfassend charakterisiert wurde.

Gegenüber konventionellen Aufbauten läßt seine mögliche Mobilität und die Einsetzbarkeit nativer atmosphärischer Gase in Zusammenhang mit der nachgewiesenen Sensitivität und Reproduzierbarkeit es als ein geeignetes System zur Untersuchung atmosphärischer Gase *in vitro* erscheinen.

6.1.1 Stichworte

in vitro-Exposition, atmosphärische Gase, oxidativer Streß

7 Abstract

A system was established for investigating atmospheric gaseous compounds *in vitro*. The system consists of a human-lung cell culture system, an exposure device and methods for the biochemical analysis of the exposed cells. The exposure device features the exposure of cultured cells outside an incubator. No conditioning of the sample gas is necessary regarding carbon dioxide content or humidity.

For a human adult lung fibroblast cell line (Lk004 cells), methods were established to obtain a non-proliferating cell system by means of a serum-free cultivation with hepes culture media. Furthermore, selenium was used to induce cellular glutathione peroxidase enzyme activity. Cells were cultured in microtiter plates under submerged conditions and on microporous membranes in transwell inserts at the air/liquid-interface.

Methods for the biochemical analysis of the cells were established by the use of standard methods which were optimized for small numbers of adherent cells. They focused on the determination of (1) the cell number, (2) the cellular energy state and vitality, and (3) endpoints which had a close mechanistic relationship to the reaction model of the oxidative stress and the glutathione redox cycle.

The biological indicator system, consisting of the human cell system and methods for biochemical analysis, was tested in submerged exposures to model substances. Hydrogen peroxide and *tert.*-butylhydroperoxide were used as model substances for the induction of oxidative stress, and cigarette smoke condensate as a model substance for a complex mixture of different compounds. Results showed strong biological effects on the cells in a substance-, concentration-, time-dependent and reproducible manner.

An exposure device was designed taking special account of (1) a potential mobility due to cultivation outside an incubator, (2) the testing of the gas without additional carbon dioxide and without humidifying it, and (3) maximum of sensitivity of the test system with minimal loss of vitality of the cell system. It is made of glass, PTFE and silicone and

enables the exposure of three transwell inserts with a growth area of 1.09 cm² each and microporous membranes (pore size 0.4 μm).

Exposures to gaseous atmospheric compounds *in vitro* were carried out with two different experimental setups. (1) Rat lung cells were used in a conventional air/liquid setup and (2) the established biological indicator system was used with the newly designed exposure device. All exposures were carried out at environmentally relevant carbon dioxide contents ($\leq 0.3\%$) and humidities (max. 50 - 90% rH/25°C) of the exposure gas.

The conventional setup was used for exposures to gas mixtures of ozone, nitrogen dioxide, peroxyacetyl nitrate and mixtures of hydrocarbons. Hydrocarbons were also light-irradiated to obtain a photosmog-like atmosphere. Results showed that the biological effects of such gas mixtures could be determined in the system used.

The newly designed setup was used for exposures to clean air, ozone and nitrogen dioxide. In the case of good vitality, cells could be exposed to gas mixtures within the apparatus for up to 2 hours under realistic conditions. The biological effects of environmentally relevant gas mixtures could be determined within this exposure time. Furthermore, experiments were carried out to describe the effect of the exposure gas flow and the culture media layer on the vitality of the cells and the sensitivity of the indicator system.

Results showed the newly established experimental setup to be more sensitive than the conventional one.

All in all, an exposure system was established which was characterized with regard to (1) the biological indicator system used, consisting of the cell system and methods for biochemical analysis, (2) the use of the biological indicator system in exposures to gases, and (3) the properties of the newly designed exposure device.

In comparison with conventional exposure systems, taking into account the potential mobility and the possibility of testing gaseous compounds without any conditioning, this experimental setup seems to be very useful for the study of the biological effects of environmentally relevant gaseous compounds *in vitro*.

7.1.1 Keywords

in vitro exposure, atmospheric gaseous compounds, oxidative stress

8 Anhang

8.1 Literatur

- Aebi, H. (1974). Catalase. in: *Methods of Enzymatic Analysis*. (Ed. H. U. Bergmeyer). Verlag Chemie, Weinheim: 673-684.
- Ahmed-Choudhury, J., D. J. Orsler and R. Coleman (1998). "Hepatobiliary effects of tertiary-butylhydroperoxide (tBOOH) in isolated rat hepatocyte couplets." *Toxicol Appl Pharmacol* **152**(1): 270-5.
- Alin, P., H. Jensson, C. Guthenberg, *et al.* (1985). "Purification of major basic glutathione transferase isoenzymes from rat liver by use of affinity chromatography and fast protein liquid chromatofocusing." *Anal Biochem* **146**(2): 313-20.
- Alink, G. M., R. M. de Boer, J. Mol, *et al.* (1980). "Toxic effects of ozone on human cells in vitro, exposed by gas diffusion through teflon film." *Toxicology* **17**(2): 209-18.
- Ames, B. N., W. E. Durston, E. Yamasaki, *et al.* (1973). "Carcinogens are mutagens: a simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection." *Proc Natl Acad Sci U S A* **70**(8): 2281-5.
- Ames, B. N., J. McCann and E. Yamasaki (1975). "Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test." *Mutat Res* **31**(6): 347-64.
- Anand, C. V., U. Anand and R. Agarwal (1996). "Anti-oxidant enzymes, gamma-glutamyl transpeptidase and lipid peroxidation in kidney of rats exposed to cigarette smoke." *Indian J Exp Biol* **34**(5): 486-8.
- Andres, M. I., G. Repetto, P. Sanz, *et al.* (1996). "Comparative effects of the metabolic inhibitors 2,4-dinitrophenol and iodoacetate on mouse neuroblastoma cells in vitro." *Toxicology* **110**(1-3): 123-32.
- Ashakumary, L. and P. L. Vijayammal (1996). "Additive effect of alcohol and nicotine on lipid peroxidation and antioxidant defence mechanism in rats." *J Appl Toxicol* **16**(4): 305-8.
- Atkinson, R. and L. AL (1984). "Evaluation of kinetic and mechanistic data for modeling of photochemical smog." *J. Phys. Chem. Ref. Data* **13**: 315-444.
- Aufderheide, M., A. Horlebein and M. Tauscher (1999). "Comparison of cytoskeletal structures in glass-adherent and polyethylene terephthalate (PET) membrane-adherent human pulmonary fibroblasts." *Exp Toxicol Pathol* **51**(1): 3-7.
- Bach, P. H., A. E. M. Vickers, R. Fisher, *et al.* (1996). "The use of tissue slices for pharmacotoxicology studies." *ATLA* **24**: 893-923.
- Baker, M. A., G. J. Cerniglia and A. Zaman (1990). "Microtiter plate assay for the measurement of glutathione and glutathione disulfide in large numbers of biological samples." *Anal Biochem* **190**(2): 360-5.
- Baker, R. D., S. S. Baker, K. LaRosa, *et al.* (1993). "Selenium regulation of glutathione peroxidase in human hepatoma cell line Hep3B." *Arch Biochem Biophys* **304**(1): 53-7.
- Balls, M. and R. H. Clothier (1992). Cytotoxicity assays for intrinsic toxicity and irritancy. in: *In vitro methods of toxicology*. (Ed. R. R. Watson). CRC Press, Boca Raton, **1**: 37-52.
- Baynes, J. W. and S. R. Thorpe (1999). "Role of oxidative stress in diabetic complications: a new perspective on an old paradigm." *Diabetes* **48**(1): 1-9.
- Becker, K. H. and J. Löbel (1985). *Atmosphärische Spurenstoffe und ihr physikalisch-chemisches Verhalten*. , Berlin, Springer-Verlag.
- Behnke, W., W. Holländer, W. Koch, *et al.* (1988). "A smog chamber for studies of the photochemical degradation of chemicals in the presence of aerosols." *Atmos. Environ.* **22**: 1113.
- Behnke, W., K. Levsen, V. Scheer, *et al.* (1998). Interaction of gaseous pollutants with cultured cells and the liquid interface of the lung: an exploratory study on the uptake of ozone. in: *Relationships between respiratory disease and exposure to air pollution*. (Ed. U. Mohr). ILSI Press, Washington, D.C.: 314-319.
- Benedetti, A., M. Comporti and E. H. (1980). "Identification of 4-hydroxynonenal as a cytotoxic product originating from the peroxidation of liver microsomal lipids." *Biochim. Biophys. Acta* **620**: 281-296.

- Bolton, D. C., B. K. Tarkington, Y. C. Zee, *et al.* (1982). "An in vitro system for studying the effects of ozone on mammalian cell cultures and viruses." *Environ Res* **27**(2): 466-75.
- Bombick, B. R., H. Murl, J. T. Avalos, *et al.* (1998). "Chemical and biological studies of a new cigarette that primarily heats tobacco. Part 2. In vitro toxicology of mainstream smoke condensate." *Food Chem Toxicol* **36**(3): 183-90.
- Bombick, D. W., B. R. Bombick, P. H. Ayres, *et al.* (1997). "Evaluation of the genotoxic and cytotoxic potential of mainstream whole smoke and smoke condensate from a cigarette containing a novel carbon filter." *Fundam Appl Toxicol* **39**(1): 11-7.
- Bompart, G. J., D. S. Prevot and J. L. Bascands (1990). "Rapid automated analysis of glutathione reductase, peroxidase, and S-transferase activity: application to cisplatin-induced toxicity." *Clin Biochem* **23**(6): 501-4.
- Brimblecombe, P. (1996). *Air composition and chemistry*. , Cambridge, Cambridge University Press.
- Brogaard, B. and J. Clausen (1997). "An In Vitro System for Evaluation of Oxidative Stress and the Effects of Antioxidants." *ATLA* **25**: 279-287.
- Campbell, K. I., G. L. Clarke, L. O. Emik, *et al.* (1967). "The atmospheric contaminant peroxyacetyl nitrate. Acute inhalation toxicity in mice." *Arch Environ Health* **15**(6): 739-44.
- Campbell, K. I., O. Emik, G. L. Clarke, *et al.* (1970). "Inhalation toxicity of peroxyacetyl nitrate. Depression of voluntary activity in mice." *Arch Environ Health* **20**(1): 22-7.
- Cantin, A. M., S. L. North, R. C. Hubbard, *et al.* (1987). "Normal alveolar epithelial lining fluid contains high levels of glutathione." *J Appl Physiol* **63**(1): 152-7.
- Cardile, V., X. Jiang, A. Russo, *et al.* (1995). "Effects of ozone on some biological activities of cells in vitro." *Cell Biol Toxicol* **11**(1): 11-21.
- Carmagnol, F., P. M. Sinet and H. Jerome (1983). "Selenium-dependent and non-selenium-dependent glutathione peroxidases in human tissue extracts." *Biochim Biophys Acta* **759**(1-2): 49-57.
- Chakraborti, T., S. K. Ghosh, J. R. Michael, *et al.* (1998). "Targets of oxidative stress in cardiovascular system." *Mol Cell Biochem* **187**(1-2): 1-10.
- Chance, B., H. Sies and A. Boveris (1979). "Hydroperoxide metabolism in mammalian organs." *Physiol Rev* **59**(3): 527-605.
- Cheek, J. M., A. R. Buckpitt, C. Li, *et al.* (1994). "Ozone injury to alveolar epithelium in vitro does not reflect loss of antioxidant defenses." *Toxicol Appl Pharmacol* **125**(1): 59-69.
- Chen, L. C. and Q. Qu (1997). "Formation of intracellular free radicals in guinea pig airway epithelium during in vitro exposure to ozone." *Toxicol Appl Pharmacol* **143**(1): 96-101.
- Chen, T. R. (1977). "In situ detection of mycoplasma contamination in cell cultures by fluorescent Hoechst 33258 stain." *Exp Cell Res* **104**(2): 255-62.
- Chow, J. Y., L. Ma and C. H. Cho (1998). "Involvement of free radicals and histamine in the potentiating action of cigarette smoke exposure on ethanol-induced gastric mucosal damage in rats." *Free Radic Biol Med* **24**(7-8): 1285-93.
- Chu, F. F., J. H. Doroshov and R. S. Esworthy (1993). "Expression, characterization, and tissue distribution of a new cellular selenium-dependent glutathione peroxidase, GSHPx-Gl." *J Biol Chem* **268**(4): 2571-6.
- Clemedson, C., E. McFarlane-Abdulla, M. Andersson, *et al.* (1996). "MEIC Evaluation of acute systemic toxicity. Part II. In vitro results from 68 toxicity assays used to test the first 30 reference chemicals and a comparative cytotoxicity analysis." *ATLA* **24**: 273-311.
- Coffin, D. L., D. E. Gardner, R. S. Holzman, *et al.* (1968). "Influence of ozone on pulmonary cells." *Arch Environ Health* **16**(5): 633-6.
- Cohn, V. H. and J. Lyle (1966). "A fluorometric assay for glutathione." *Anal Biochem* **14**(3): 434-40.
- Comporti, M. (1989). "Three models of free radical-induced cell injury." *Chem Biol Interact* **72**: 1-2.
- Corbisier, P., A. Houbion and J. Remade (1987). "A new technique for highly sensitive detection of superoxide dismutase activity by chemiluminescence." *Anal Biochem* **164**(1): 240-7.
- Cotgreave, I. A., U. Johansson, P. Moldeus, *et al.* (1987). "The effect of acute cigarette smoke inhalation on pulmonary and systemic cysteine and glutathione redox states in the rat." *Toxicology* **45**(2): 203-12.
- Crespi, C. L., R. Langenbach and B. W. Penman (1993). "Human cell lines, derived from AHH-1 TK+/- human lymphoblasts, genetically engineered for expression of cytochromes P450." *Toxicology* **82**(1-3): 89-104.
- De Angelis, I., L. A. Hoogenboom, M. B. Huveneers-Oorsprong, *et al.* (1994). "Established cell lines for safety assessment of food contaminants: differing furazolidone toxicity to V 79, HEp-2 and Caco-2 cells." *Food Chem Toxicol* **32**(5): 481-8.
- Detmar, M., F. M. Schaart, U. Blume, *et al.* (1993). "Culture of hair matrix and follicular keratinocytes." *J Invest Dermatol* **101**(1 Suppl): 130S-134S.
- Deutsch, J. (1985). Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase. in: *Methods of enzymatic analysis*. (Ed. H.-U. Bergmeyer). VCH, Weinheim, **III**: 191-197.
- Devlin, R. B., K. P. McKinnon, T. Noah, *et al.* (1994). "Ozone-induced release of cytokines and fibronectin by alveolar macrophages and airway epithelial cells." *Am-J-Physiol* **266**(6 Pt 1): L612-9.
- DFG (1995). *MAK- und BAT-Werte-Liste 1995*. , Weinheim, VCH.

- Di Pierro, D., B. Tavazzi, C. F. Perno, *et al.* (1995). "An ion-pairing high-performance liquid chromatographic method for the direct simultaneous determination of nucleotides, deoxynucleotides, nicotinic coenzymes, oxypurines, nucleosides, and bases in perchloric acid cell extracts." *Anal Biochem* **231**(2): 407-12.
- Doehmer, J. (1993). "V79 Chinese hamster cells genetically engineered for cytochrome P450 and their use in mutagenicity and metabolism studies." *Toxicology* **82**(1-3): 105-18.
- Doolittle, D. J., C. K. Lee, J. L. Ivett, *et al.* (1990). "Genetic toxicology studies comparing the activity of sidestream smoke from cigarettes which burn or only heat tobacco." *Mutat Res* **240**(2): 59-72.
- Dotsika, E. N. and C. J. Sanderson (1987). "A fluorometric assay for determining cell growth in lymphocyte proliferation and lymphokine assays." *J Immunol Methods* **105**(1): 55-62.
- Downs, T. R. and W. W. Wilfinger (1983). "Fluorometric quantification of DNA in cells and tissue." *Anal Biochem* **131**(2): 538-47.
- Drechsler-Parks, D. M. (1987). "Effect of nitrogen dioxide, ozone, and peroxyacetyl nitrate on metabolic and pulmonary function." *Res Rep Health Eff Inst*(6): 1-37.
- Drechsler-Parks, D. M., J. F. Bedi and S. M. Horvath (1987). "Pulmonary function desensitization on repeated exposures to the combination of peroxyacetyl nitrate and ozone." *Japca* **37**(10): 1199-201.
- Drechsler-Parks, D. M., J. F. Bedi and S. M. Horvath (1989). "Pulmonary function responses of young and older adults to mixtures of O₃, NO₂ and PAN." *Toxicol Ind Health* **5**(3): 505-17.
- Dubick, M. A. and C. L. Keen (1991). "Influence of nicotine on tissue trace element concentrations and tissue antioxidant defense." *Biol Trace Elem Res* **31**(2): 97-109.
- Dumler, K., Q. S. Hanley, C. Baker, *et al.* (1994). "The effects of ozone exposure on lactate dehydrogenase release from human and primate respiratory epithelial cells." *Toxicol Lett* **70**(2): 203-9.
- Eke, B. C., N. Vural and M. Iscan (1996). "Combined effects of ethanol and cigarette smoke on hepatic and pulmonary xenobiotic metabolizing enzymes in rats." *Chem Biol Interact* **102**(3): 155-67.
- Ekwall, B. (1980). "Toxicity to HeLa cell of 205 drugs as determined by the metabolic inhibition test supplemented by microscopy." *Toxicology* **17**(3): 273-95.
- Ekwall, B. (1983). "Screening of toxic compounds in mammalian cell cultures." *Ann N Y Acad Sci* **407**: 64-77.
- Elliott, S. J. and S. K. Koliwad (1995). "Oxidant stress and endothelial membrane transport." *Free Radic Biol Med* **19**(5): 649-58.
- Emura, M., J. Jacob, J. W. Knebel, *et al.* (1995). "Establishment of in vitro systems from the respiratory tract of different species for the investigation of PAH metabolism." *Exp Toxicol Pathol* **47**(6): 434-9.
- Emura, M., M. Riebe, A. Ochiai, *et al.* (1990). "New functional cell-culture approach to pulmonary carcinogenesis and toxicology." *J Cancer Res Clin Oncol* **116**(6): 557-62.
- Erexson, G. L., D. E. Watson and K. R. Tindall (1999). "Characterization of new transgenic Big Blue(R) mouse and rat primary fibroblast cell strains for use in molecular toxicology studies." *Environ Mol Mutagen* **34**(2-3): 90-96.
- Esterbauer, H., R. J. Schaur and H. Zollner (1991). "Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes." *Free Radic Biol Med* **11**(1): 81-128.
- Ewing, J. F. and D. R. Janero (1995). "Microplate superoxide dismutase assay employing a nonenzymatic superoxide generator." *Anal-Biochem* **232**(2): 243-8.
- Fanburg, B. L. and S. M. Deneke (1989). Hyperoxia: toxicity and application. in: *Lund Cell Biology*. (Ed. C. Lenfant). Marcel Dekker, Inc., New York, **41**: 1199-1226.
- Faraji, B., H. K. Kang and J. L. Valentine (1987). "Methods compared for determining glutathione peroxidase activity in blood." *Clin Chem* **33**(4): 539-43.
- Finlayson-Pitts, B. J. and J. N. Pitts (1986). *Atmospheric chemistry: Fundamentals and experimental techniques*. , New York, John Wiley & Sons.
- Freshney, R. I. (1990). *Tierische Zellkulturen*. , Berlin, de Gruyter.
- Frey, J. and A. Chamson (1980). "Cytopharmacology in fibroblast culture." *Ann Anesthesiol Fr* **21**(6): 603-8.
- Fry, J. R., M. Garle and A. H. Hammond (1990). "Competing pathways in metabolism-mediated cytotoxicity in vitro." *Toxicol. in Vitro* **4**: 467.
- Furuno, K. and N. Sugihara (1994). "Effect of cumene hydroperoxide on lipid peroxidation in cultured rat hepatocytes supplemented with eicosapentaenoic acid." *Biol Pharm Bull* **17**(3): 419-22.
- Gabridge, M. G. and M. F. Gladd (1984). "Gaseous oxide toxicity evaluated with cell monolayers on collagen-coated, gas-permeable teflon membranes." *Environ Health Perspect* **54**: 347-52.
- Gabrielson, E. W., X. Y. Yu and E. W. Spannake (1994). "Comparison of the toxic effects of hydrogen peroxide and ozone on cultured human bronchial epithelial cells." *Environ Health Perspect* **102**(11): 972-4.
- Gairola, C. G. and H. H. Tai (1986). "Cigarette smoke-induced alterations in the release of arachidonate metabolites by pulmonary alveolar macrophage from selenium-fed and selenium-deficient rats." *Biochem Pharmacol* **35**(14): 2423-8.
- Galli, C. L., B. Viviani and M. Marinovich (1993). "Cell cultures: a tool for the study of mechanisms of toxicity." *Toxic. in Vitro* **7**(5): 559-568.

- Gilks, C. B., K. Price, J. L. Wright, *et al.* (1998). "Antioxidant gene expression in rat lung after exposure to cigarette smoke." *Am J Pathol* **152**(1): 269-78.
- Gille, J. J. and H. Joenje (1992). "Cell culture models for oxidative stress: superoxide and hydrogen peroxide versus normobaric hyperoxia." *Mutat Res* **275**(3-6): 405-14.
- Gille, J. J., C. G. van Berkel, E. Mullaart, *et al.* (1989). "Effects of lethal exposure to hyperoxia and to hydrogen peroxide on NAD(H) and ATP pools in Chinese hamster ovary cells." *Mutat Res* **214**(1): 89-96.
- Goldstein, S., D. Meyerstein and G. Czapski (1993). "The Fenton reagents." *Free Radic Biol Med* **15**(4): 435-45.
- Good, N. E., G. D. Winget, W. Winter, *et al.* (1966). "Hydrogen ion buffers for biological research." *Biochemistry* **5**(2): 467-77.
- Graedel, T. E. (1978). *Chemical compounds in the atmosphere*. , New York, Academic Press.
- Greim, H. (1995). *Gesundheitsschädliche Arbeitsstoffe*. , Weinheim, VCH.
- Griffith, O. W. (1985). Glutathione and Glutathione Disulfide. in: *Methods of enzymatic analysis*. (Ed. H.-U. Bergmeyer). VCH, Weinheim, **VIII**: 521-529.
- Gupta, M. P., K. L. Khanduja and R. R. Sharma (1988). "Effect of cigarette smoke inhalation on antioxidant enzymes and lipid peroxidation in the rat." *Toxicol Lett* **41**(2): 107-14.
- Habig, W. H., M. J. Pabst and W. B. Jakoby (1974). "Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation." *J Biol Chem* **249**(22): 7130-9.
- Hagar, W. L., W. E. Sweet and F. Sweet (1981). "An in vitro system for assessing lung cell response to ozone." *J Air Pollut Control Assoc* **31**(9): 933-5.
- Halle, W. (1998). *Toxizitätsprüfungen in Zellkulturen für eine Vorhersage der akuten Toxizität (LD50) zur Einsparung von Tierversuchen*. , Jülich, Forschungszentrum Jülich GmbH.
- Harrison, R. G. (1907). "Observations on the living developing nerve fiber." *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **4**: 140-143.
- Hasspieler, B. M., G. D. Haffner and K. Adeli (1996). "In vitro toxicological methods for environmental health testing." *Rev Environ Health* **11**(4): 213-27.
- Helen, A. and P. L. Vijayammal (1997). "Effect of vitamin A supplementation on cigarette smoke-induced lipid peroxidation." *Vet Hum Toxicol* **39**(1): 18-21.
- Hissin, P. J. and R. Hilf (1976). "A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues." *Anal Biochem* **74**(1): 214-26.
- Hockele, V., E. Kruger, H. F. Krug, *et al.* (1998). "In vitro effects of nitrogen dioxide on the release of nitric oxide by bovine alveolar macrophages." *Toxicol Lett* **96-97**: 53-7.
- Hoffmann, D. and E. L. Wynder (1986). "Chemical constituents and bioactivity of tobacco smoke." *IARC Sci Publ*(74): 145-65.
- Hornhardt, S. and F. J. Wiebel (1996). "Catalogue of cell lines in toxicology and pharmacology." *GSF-Bericht* **3/96**: 1-249.
- Hoyt, K. R., A. J. Gallagher, T. G. Hastings, *et al.* (1997). "Characterization of hydrogen peroxide toxicity in cultured rat forebrain neurons." *Neurochem Res* **22**(3): 333-40.
- Hulea, S. A., R. Olinescu, S. Nita, *et al.* (1995). "Cigarette smoking causes biochemical changes in blood that are suggestive of oxidative stress: a case-control study." *J Environ Pathol Toxicol Oncol* **14**(3-4): 173-80.
- Itagaki, A. and G. Kimura (1974). "Tos and HEPES buffers in mammalian cell cultures and viral studies: problem of carbon dioxide requirement." *Exp Cell Res* **83**(2): 351-61.
- Jabbour, A. J., L. C. Altman, T. N. Wight, *et al.* (1998). "Ozone alters the distribution of beta1 integrins in cultured primate bronchial epithelial cells." *Am J Respir Cell Mol Biol* **19**(3): 357-65.
- Jacob, J., G. Grimmer, M. Emura, *et al.* (1995). "Metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons in fetal human, rat and hamster epithelial lung cells." *Exp Toxicol Pathol* **47**(6): 428-31.
- Janssen, Y. M. W., B. Van Houten, P. J. A. Borm, *et al.* (1993). "Biology of disease: Cell and tissue responses to oxidative damage." *Lab Invest* **69**(3): 261-274.
- Jenner, P. and C. W. Olanow (1998). "Understanding cell death in Parkinson's disease." *Ann Neurol* **44**(3 Suppl 1): S72-84.
- Joaquin, M., J. L. Rosa, C. Salvado, *et al.* (1996). "Hepatocyte growth factor and transforming growth factor beta regulate 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase gene expression in rat hepatocyte primary cultures." *Biochem J* **314**(Pt 1): 235-40.
- Joaquin, M., C. Salvado, B. Bellosillo, *et al.* (1997). "Effect of growth factors on the expression of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase in Rat-1 fibroblasts." *J Biol Chem* **272**(5): 2846-51.
- Johansson, L. H. and L. A. Borg (1988). "A spectrophotometric method for determination of catalase activity in small tissue samples." *Anal Biochem* **174**(1): 331-6.
- Joshi, U. M., P. R. Kodavanti and H. M. Mehendale (1988). "Glutathione metabolism and utilization of external thiols by cigarette smoke-challenged, isolated rat and rabbit lungs." *Toxicol Appl Pharmacol* **96**(2): 324-35.
- Kaiser, R. E. and J. A. Mühlbauer (1983). *Elementare Tests zur Beurteilung von Meßdaten: Soforthilfe für statistische Tests mit wenigen Meßdaten*. , Mannheim, Bibliographisches Institut.
- Karls, P. (1988). *Kurzes Lehrbuch der Biochemie*. , Stuttgart, Georg Thieme Verlag.

- Kienast, K., M. Knorst, H. Riechelmann, *et al.* (1993). "In vitro studies of the beat frequency of ciliary cell cultures after short-term exposure to SO₂ and NO₂." *Med Klin* **88**(9): 520-4.
- Kim, S. J., D. Han, K. D. Moon, *et al.* (1995). "Measurement of superoxide dismutase-like activity of natural antioxidants." *Biosci-Biotechnol-Biochem* **59**(5): 822-6.
- Klaunig, J. E., Y. Xu, J. S. Isenberg, *et al.* (1998). "The role of oxidative stress in chemical carcinogenesis." *Environ Health Perspect* **106**(Suppl 1): 289-95.
- Knebel, J. W., M. Aufderheide and M. Emura (1994). "Comparison of biological effects of different polycyclic aromatic hydrocarbons in lung cells of hamster and rat in vitro." *Toxicol Lett* **72**(1-3): 65-72.
- Knorst, M. M., K. Kienast, J. Muller-Quernheim, *et al.* (1996). "Effect of sulfur dioxide on cytokine production of human alveolar macrophages in vitro." *Arch Environ Health* **51**(2): 150-6.
- Kruysse, A., V. J. Feron, H. R. Immel, *et al.* (1977). "Short-term inhalation toxicity studies with peroxyacetyl nitrate in rats." *Toxicology* **8**(2): 231-49.
- Kugelman, A., H. A. Choy, R. Liu, *et al.* (1994). "gamma-Glutamyl transpeptidase is increased by oxidative stress in rat alveolar L2 epithelial cells." *Am J Respir Cell Mol Biol* **11**(5): 586-92.
- Lang, D. S., R. A. Jorres, M. Mucke, *et al.* (1998). "Interactions between human bronchoepithelial cells and lung fibroblasts after ozone exposure in vitro." *Toxicol Lett* **96-97**: 13-24.
- Latour, I., J. B. Demoulin and P. Buc Calderon (1995). "Oxidative DNA damage by t-butyl hydroperoxide causes DNA single strand breaks which is not linked to cell lysis. A mechanistic study in freshly isolated rat hepatocytes." *FEBS-Lett* **373**(3): 299-302.
- Lawrence, R. A. and R. F. Burk (1976). "Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver." *Biochem Biophys Res Commun* **71**(4): 952-8.
- Leibowitz, A. (1963). "The growth and maintenance of tissue cell cultures in free gas exchange with the atmosphere." *Am. J. Hyg.* **78**: 173-183.
- Lenaz, G. (1998). "Role of mitochondria in oxidative stress and ageing." *Biochim Biophys Acta* **1366**(1-2): 53-67.
- Li, X. Y., K. Donaldson, I. Rahman, *et al.* (1994). "An investigation of the role of glutathione in increased epithelial permeability induced by cigarette smoke in vivo and in vitro." *Am J Respir Crit Care Med* **149**(6): 1518-25.
- Li, X. Y., I. Rahman, K. Donaldson, *et al.* (1996). "Mechanisms of cigarette smoke induced increased airspace permeability." *Thorax* **51**(5): 465-71.
- Liu, R. M., M. M. Shi, C. Giulivi, *et al.* (1998). "Quinones increase gamma-glutamyl transpeptidase expression by multiple mechanisms in rat lung epithelial cells." *Am J Physiol* **274**(3 Pt 1): L330-6.
- MacDonald, C., M. Vass, B. Willett, *et al.* (1994). "Expression of liver functions in immortalised rat hepatocyte cell lines." *Hum Exp Toxicol* **13**(6): 439-44.
- Maddipati, K. R., C. Gasparski and L. J. Marnett (1987). "Characterization of the hydroperoxide-reducing activity of human plasma." *Arch Biochem Biophys* **254**(1): 9-17.
- Maiorino, M., C. Gregolin and F. Ursini (1990). "Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase." *Methods Enzymol* **186**: 448-57.
- Maranzana, A. and R. J. Mehlhorn (1998). "Loss of glutathione, ascorbate recycling, and free radical scavenging in human erythrocytes exposed to filtered cigarette smoke." *Arch Biochem Biophys* **350**(2): 169-82.
- McCusker, K. and J. Hoidal (1990). "Selective increase of antioxidant enzyme activity in the alveolar macrophages from cigarette smokers and smoke-exposed hamsters." *Am Rev Respir Dis* **141**(3): 678-82.
- Menzel, D. B. (1993). "Antioxidants in lung disease." *Toxicol Ind Health* **9**(1-2): 323-36.
- Mertens, K., V. Rogiers, W. Sonck, *et al.* (1991). "Measurement of reduced and oxidized glutathione in cultures of adult rat hepatocytes." *J Chromatogr* **565**(1-2): 149-57.
- Miller, F. J., J. H. Overton, Jr., R. H. Jaskot, *et al.* (1985). "A model of the regional uptake of gaseous pollutants in the lung. I. The sensitivity of the uptake of ozone in the human lung to lower respiratory tract secretions and exercise." *Toxicol Appl Pharmacol* **79**(1): 11-27.
- Minkenberg, I. and E. Ferber (1984). "Lucigenin-dependent chemiluminescence as a new assay for NAD(P)H- oxidase activity in particulate fractions of human polymorphonuclear leukocytes." *J Immunol Methods* **71**(1): 61-7.
- Mogel, M., E. Kruger, H. F. Krug, *et al.* (1998). "A new coculture-system of bronchial epithelial and endothelial cells as a model for studying ozone effects on airway tissue." *Toxicol Lett* **96-97**: 25-32.
- Morgenstern, R. and J. W. DePierre (1983). "Microsomal glutathione transferase. Purification in unactivated form and further characterization of the activation process, substrate specificity and amino acid composition." *Eur J Biochem* **134**(3): 591-7.
- Morliere, P., A. Moysan, R. Santus, *et al.* (1991). "UVA-induced lipid peroxidation in cultured human fibroblasts." *Biochim Biophys Acta* **1084**(3): 261-8.
- Morrison, D., I. Rahman, S. Lannan, *et al.* (1999). "Epithelial permeability, inflammation, and oxidant stress in the air spaces of smokers." *Am J Respir Crit Care Med* **159**(2): 473-9.

- Morrow, P. E. (1994). Mechanisms and Significance of "Particle Overload". in: *Toxic and Carcinogenic Effects of Solid Particles in the Respiratory Tract*. (Ed. U. Mohr). ILSI Press, Washington: 17-25.
- Mortensen, B., P. O. Osvoll, T. Woldbaek, et al. (1998). "In vitro screening for metabolic interactions among frequently occurring binary mixtures of volatile organic chemicals in Norwegian occupational atmosphere." *Pharmacol Toxicol* **83**(2): 49-56.
- Mosmann, T. (1983). "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays." *J Immunol Methods* **65**(1-2): 55-63.
- Muckter, H., M. Zwing, S. Bader, et al. (1998). "A novel apparatus for the exposure of cultured cells to volatile agents." *J Pharmacol Toxicol Methods* **40**(2): 63-9.
- Mudd, J. B. (1966). "Reaction of peroxyacetyl nitrate with glutathione." *J Biol Chem* **241**(17): 4077-80.
- Mudd, J. B., R. Leavitt and W. H. Kersey (1966). "Reaction of peroxyacetyl nitrate with sulfhydryl groups of proteins." *J Biol Chem* **241**(17): 4081-5.
- Mudd, J. B. and T. T. McManus (1969). "Products of the reaction of peroxyacetyl nitrate with sulfhydryl compounds." *Arch Biochem Biophys* **132**(1): 237-41.
- Mukherjee, S., L. Woods, Z. Weston, et al. (1993). "The effect of mainstream and sidestream cigarette smoke exposure on oxygen defense mechanisms of guinea pig erythrocytes." *J Biochem Toxicol* **8**(3): 119-25.
- Muller, T. and S. Gebel (1998). "The cellular stress response induced by aqueous extracts of cigarette smoke is critically dependent on the intracellular glutathione concentration." *Carcinogenesis* **19**(5): 797-801.
- Muller, T., H. J. Haussmann and G. Schepers (1997). "Evidence for peroxyacetyl nitrate as an oxidative stress-inducing compound of aqueous cigarette smoke fractions." *Carcinogenesis* **18**(2): 295-301.
- Muller-Peddinghaus, R. (1984). "In vitro determination of phagocyte activity by luminol- and lucigenin- amplified chemiluminescence." *Int J Immunopharmacol* **6**(5): 455-66.
- Nelson, K. C., J. L. Carlson, M. L. Newman, et al. (1999). "Effect of dietary inducer dimethylfumarate on glutathione in cultured human retinal pigment epithelial cells." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **40**(9): 1927-35.
- Ochi, T. (1990). "Effects of an organic hydroperoxide on the activity of antioxidant enzymes in cultured mammalian cells." *Toxicology* **61**(3): 229-39.
- Ochi, T. and S. Miyaura (1989). "Cytotoxicity of an organic hydroperoxide and cellular antioxidant defense system against hydroperoxides in cultured mammalian cells." *Toxicology* **55**(1-2): 69-82.
- Ochiai, A., M. Emura, M. Riebe-Imre, et al. (1991). "Secretory differentiation and cell type identification of a human fetal bronchial epithelial cell line (HFBE)." *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* **61**(3): 217-26.
- O'Donovan, D. J., J. P. Katkin, T. Tamura, et al. (1999). "Gene transfer of mitochondrially targeted glutathione reductase protects H441 cells from t-butyl hydroperoxide-induced oxidant stresses." *Am J Respir Cell Mol Biol* **20**(2): 256-63.
- Pace, D. M., P. A. Landolt and B. T. Aftonomos (1969). "Effects of ozone on cells in vitro." *Arch Environ Health* **18**(2): 165-70.
- Pacifici, R. E. and K. J. Davies (1991). "Protein, lipid and DNA repair systems in oxidative stress: the free-radical theory of aging revisited." *Gerontology* **37**(1-3): 166-80.
- Paine, A. J. (1990). "The maintenance of cytochrome P-450 in rat hepatocyte culture: some applications of liver cell cultures to the study of drug metabolism, toxicity and the induction of the P-450 system." *Chem Biol Interact* **74**(1-2): 1-31.
- Palm, W. U., M. Elend, J. W. Knebel, et al. (1998). Toxic potential of native and photochemically transformed gaseous compounds: first results of the phototox project. in: *Relationships between respiratory disease and exposure to air pollution*. (Ed. U. Mohr). ILSI Press: 394-398.
- Park, E. M., Y. M. Park and Y. S. Gwak (1998). "Oxidative damage in tissues of rats exposed to cigarette smoke." *Free Radic Biol Med* **25**(1): 79-86.
- Parrish, A. R., A. J. Gandolfi and K. Brendel (1995). "Precision-cut tissue slices: applications in pharmacology and toxicology." *Life Sci* **57**(21): 1887-901.
- Pasquini, R., G. S. Sforzolini, A. Cavaliere, et al. (1988). "Enzymatic activities of human lung tissue: relationship with smoking habits." *Carcinogenesis* **9**(8): 1411-6.
- Peak, M. J. and W. L. Belser (1969). "Some effects of the air pollutant, peroxyacetyl nitrate, upon deoxyribonucleic acid and upon nucleic acid bases." *Atmos Environ* **3**(4): 385-97.
- Peden, D. B., L. Dailey, W. DeGraff, et al. (1994). "Hydrogen peroxide effects on rat mast cell function." *Am J Physiol* **267**(1 Pt 1): L85-93.
- Pryor, W. A. (1992). "How far does ozone penetrate into the pulmonary air/tissue boundary before it reacts?" *Free Radic Biol Med* **12**(1): 83-8.
- Rago, R., J. Mitchen and G. Wilding (1990). "DNA fluorometric assay in 96-well tissue culture plates using Hoechst 33258 after cell lysis by freezing in distilled water." *Anal Biochem* **191**(1): 31-4.
- Rahman, I., A. Bel, B. Mulier, et al. (1998). "Differential regulation of glutathione by oxidants and dexamethasone in alveolar epithelial cells." *Am J Physiol* **275**(1 Pt 1): L80-6.

- Rahman, I., X. Y. Li, K. Donaldson, *et al.* (1995). "Glutathione homeostasis in alveolar epithelial cells in vitro and lung in vivo under oxidative stress." *Am J Physiol* **269**(3 Pt 1): L285-92.
- Rahman, I., C. A. Smith, M. F. Lawson, *et al.* (1996). "Induction of gamma-glutamylcysteine synthetase by cigarette smoke is associated with AP-1 in human alveolar epithelial cells [published erratum appears in FEBS Lett 1997 Jul 14;411(2-3):393]." *FEBS Lett* **396**(1): 21-5.
- Rasmussen, R. E. (1984). "In vitro systems for exposure of lung cells to NO₂ and O₃." *J Toxicol Environ Health* **13**(2-3): 397-411.
- Reed, D. J. (1990). "Glutathione: toxicological implications." *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **30**: 603-31.
- Reed, D. J., J. R. Babson, P. W. Beatty, *et al.* (1980). "High-performance liquid chromatography analysis of nanomole levels of glutathione, glutathione disulfide, and related thiols and disulfides." *Anal Biochem* **106**(1): 55-62.
- Resau, J. H., K. Sakamoto, J. R. Cottrell, *et al.* (1991). "Explant organ culture: a review." *Cytotechnology* **7**(3): 137-49.
- Retz, W., W. Gsell, G. Munch, *et al.* (1998). "Free radicals in Alzheimer's disease." *J Neural Transm Suppl* **54**: 221-36.
- Rietjens, I. M., G. M. Alink and R. M. Vos (1985). "The role of glutathione and changes in thiol homeostasis in cultured lung cells exposed to ozone." *Toxicology* **35**(3): 207-17.
- Ritter, D., J. W. Knebel, M. Aufderheide, *et al.* (1999). "Development of a cell culture model system for routine testing of substances inducing oxidative stress." *In Vitro Toxicology* **13**(4/5): 745-751.
- Rotruck, J. T., A. L. Pope, H. E. Ganther, *et al.* (1973). "Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase." *Science* **179**(73): 588-90.
- Rusznak, C., J. L. Devalia, R. J. Sapsford, *et al.* (1996). "Ozone-induced mediator release from human bronchial epithelial cells in vitro and the influence of nedocromil sodium." *Eur Respir J* **9**(11): 2298-305.
- Ryrfeldt, A., F. Kroll, M. Berggren, *et al.* (1988). "Hydroperoxide and cigarette smoke induced effects on lung mechanics and glutathione status in rat isolated perfused and ventilated lungs." *Life Sci* **42**(15): 1439-45.
- Salomaa, S., J. Tuominen and E. Skytta (1988). "Genotoxicity and PAC analysis of particulate and vapour phases of environmental tobacco smoke." *Mutat Res* **204**(2): 173-183.
- Sawada, M. and T. Kamataki (1998). "Genetically engineered cells stably expressing cytochrome P450 and their application to mutagen assays." *Mutat Res* **411**(1): 19-43.
- Schierhorn, K., M. Zhang, M. Kacy, *et al.* (1997). "Ozone-induced augmentation of eicosanoid metabolism in human nasal mucosa in vitro." *Int Arch Allergy Immunol* **113**(1-3): 312-5.
- Segura Aguilar, J. (1993). "A new direct method for determining superoxide dismutase activity by measuring hydrogen peroxide formation." *Chem-Biol-Interact* **86**(1): 69-78.
- Shi, M. M., A. Kugelman, T. Iwamoto, *et al.* (1994). "Quinone-induced oxidative stress elevates glutathione and induces gamma-glutamylcysteine synthetase activity in rat lung epithelial L2 cells." *J Biol Chem* **269**(42): 26512-7.
- Shiraishi, F., S. Hashimoto and H. Bandow (1986). "Induction of sister-chromatid exchanges in Chinese hamster V79 cells by exposure to the photochemical reaction products of toluene plus NO₂ in the gas phase." *Mutat Res* **173**(2): 135-9.
- Sies, H. and B. Chance (1970). "The steady state level of catalase compound I in isolated hemoglobin-free perfused rat liver." *FEBS Lett* **11**: 172-176.
- Singer, V. L., L. J. Jones, S. T. Yue, *et al.* (1997). "Characterization of PicoGreen reagent and development of a fluorescence-based solution assay for double-stranded DNA quantitation." *Anal Biochem* **249**(2): 228-38.
- Sitar, S. M., P. Hanifi-Moghaddam, A. Gelb, *et al.* (1999). "Propofol prevents peroxide-induced inhibition of glutamate transport in cultured astrocytes." *Anesthesiology* **90**(5): 1446-53.
- Slater, T. F., B. Sawyer and U. Str uli (1963). "Studies on succinate-tetrazolium reductase systems: III. Points of coupling four different tetrazolium salts." *Biochim. Biophys Acta* **77**: 383-393.
- Smith, I. K., T. L. Vierheller and C. A. Thorne (1988). "Assay of glutathione reductase in crude tissue homogenates using 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid)." *Anal Biochem* **175**(2): 408-13.
- Steele, R. H., V. M. Payne, C. W. Fulp, *et al.* (1995). "A comparison of the mutagenicity of mainstream cigarette smoke condensates from a representative sample of the U.S. cigarette market with a Kentucky reference cigarette (K1R4F)." *Mutat Res* **342**(3-4): 179-90.
- Stephens, E. R. and M. A. Price (1973). "Analysis of an important air pollutant: peroxyacetyl nitrate." *J Chem Educ* **50**(5): 351-4.
- Sterzel, W., P. Bedford and G. Eisenbrand (1985). "Automated determination of DNA using the fluorochrome Hoechst 33258." *Anal Biochem* **147**(2): 462-7.
- Stohs, S. J. and D. Bagchi (1995). "Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions." *Free Radic Biol Med* **18**(2): 321-36.
- Takahashi, K., N. Avissar, J. Whitin, *et al.* (1987). "Purification and characterization of human plasma glutathione peroxidase: a selenoglycoprotein distinct from the known cellular enzyme." *Arch Biochem Biophys* **256**(2): 677-86.
- Tarkington, B. K., R. Wu, W. M. Sun, *et al.* (1994). "In vitro exposure of tracheobronchial epithelial cells and of tracheal explants to ozone." *Toxicology* **88**(1-3): 51-68.
- Taylor, O. C. (1969). "Importance of peroxyacetyl nitrate (PAN) as a phytotoxic air pollutant." *J Air Pollut Control Assoc* **19**(5): 347-51.

- Terse, P. S., M. S. Madhyastha, O. Zurovac, *et al.* (1993). "Comparison of in vitro and in vivo biological activity of mycotoxins." *Toxicol* **31**(7): 913-9.
- Tietze, F. (1969). "Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues." *Anal Biochem* **27**(3): 502-22.
- Tipping, E. and B. Ketterer (1981). "The influence of soluble binding proteins on lipophile transport and metabolism in hepatocytes." *Biochem J* **195**(2): 441-52.
- Tirmenstein, M. A., P. I. Mathias, J. E. Snawder, *et al.* (1997). "Antimony-induced alterations in thiol homeostasis and adenine nucleotide status in cultured cardiac myocytes." *Toxicology* **119**(3): 203-11.
- Trautschold, I., W. Lamprecht and G. Schweitzer (1985). ATP: UV-method with Hexokinase and Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase. in: *Methods of enzymatic analysis*. (Ed. H.-U. Bergmeyer). VCH, Weinheim, **VII**: 347-357.
- Tu, B., A. Wallin, P. Moldeus, *et al.* (1995). "Cytotoxicity of NO₂ gas to cultured human and murine cells in an inverted monolayer exposure system." *Toxicology* **96**(1): 7-18.
- Uejima, Y., Y. Fukuchi, T. Nagase, *et al.* (1990). "Influences of inhaled tobacco smoke on the senescence accelerated mouse (SAM)." *Eur Respir J* **3**(9): 1029-36.
- Umweltbundesamt, P. (1998). "Hintergrundinformation: Sommersmog." .
- Van der Zee, J., K. Tijssen Christianse, T. M. Dubbelman, *et al.* (1987). "The influence of ozone on human red blood cells. Comparison with other mechanisms of oxidative stress." *Biochim-Biophys-Acta* **924**(1): 111-8.
- Van Schaftingen, E. and H. G. Hers (1981a). "Inhibition of fructose-1,6-bisphosphatase by fructose 2,6-bisphosphate." *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**(5): 2861-3.
- Van Schaftingen, E., M. F. Jett, L. Hue, *et al.* (1981b). "Control of liver 6-phosphofructokinase by fructose 2,6-bisphosphate and other effectors." *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**(6): 3483-6.
- Vandenbergh, Y., D. Ratanasavanh, D. Glaise, *et al.* (1988). "Influence of medium composition and culture conditions on glutathione S-transferase activity in adult rat hepatocytes during culture." *In Vitro Cell Dev Biol* **24**(4): 281-8.
- Vandeputte, C., I. Guizon, I. Genestie-Denis, *et al.* (1994). "A microtiter plate assay for total glutathione and glutathione disulfide contents in cultured/isolated cells: performance study of a new miniaturized protocol." *Cell Biol Toxicol* **10**(5-6): 415-21.
- Varani, J. (1998). "Preservation of human skin structure and function in organ culture." *Histol Histopathol* **13**(3): 775-83.
- Vessey, D. A. and K. H. Lee (1993). "Inactivation of enzymes of the glutathione antioxidant system by treatment of cultured human keratinocytes with peroxides." *J Invest Dermatol* **100**(6): 829-33.
- Voisin, C., C. Aerts, J. L. Houdret, *et al.* (1974). Effect of NO₂ on alveolar macrophages. in: *Reactions bronchopulmonaires aux polluants atmospheriques*. (Ed. V. C.). INSERM, Paris: 273-88.
- Voisin, C., C. Aerts, E. Jakubczak, *et al.* (1977a). "Effects of nitrogen dioxide on alveolar macrophages surviving in the gas phase. A new experimental model for the study of in vitro cytotoxicity of toxic gases." *Bull Eur Physiopathol Respir* **13**(1): 137-44.
- Voisin, C., C. Aerts, E. Jakubczak, *et al.* (1977b). "Cell culture in the gas phase. A new experimental model for the in vitro study of alveolar macrophages." *Bull Eur Physiopathol Respir* **13**(1): 69-82.
- Wallaert, B., P. Gosset, A. Boitelle, *et al.* (1996). "In vitro assessment of environmental toxicology using alveolar cells as target." *Cell Biol Toxicol* **12**(4-6): 251-6.
- Weiss, R. H., A. G. Flickinger, W. J. Rivers, *et al.* (1993). "Evaluation of activity of putative superoxide dismutase mimics. Direct analysis by stopped-flow kinetics." *J Biol Chem* **268**(31): 23049-54.
- Weitberg, A. B. (1993). "Effect of oxygen radicals on sister chromatid exchange formation by tobacco-specific nitrosamines." *J Exp Clin Cancer Res* **12**(3): 149-152.
- Wenzel, D. G. and D. L. Morgan (1982). "Role of in vitro factors in ozone toxicity for cultured rat lung fibroblasts." *Drug Chem Toxicol* **5**(3): 201-17.
- Wenzel, D. G., W. J. Wrobel, J. J. Kotek, *et al.* (1979). "An ozone-generating system and chamber for testing injury to cultured cells." *Arch Environ Health* **34**(6): 454-60.
- Wheeler, C. R., J. A. Salzman, N. M. Elsayed, *et al.* (1990). "Automated assays for superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, and glutathione reductase activity." *Anal Biochem* **184**(2): 193-9.
- Williams, A. J. and P. J. Cole (1981). "Investigation of alveolar macrophage function using lucigenin-dependent chemiluminescence." *Thorax* **36**(11): 866-9.
- Winkles, J. A. (1998). "Serum- and polypeptide growth factor-inducible gene expression in mouse fibroblasts." *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **58**: 41-78.
- Wright, D. T., K. B. Adler, N. J. Akley, *et al.* (1994). "Ozone stimulates release of platelet activating factor and activates phospholipases in guinea pig tracheal epithelial cells in primary culture." *Toxicol Appl Pharmacol* **127**(1): 27-36.
- Wulff, K. and W. Döppen (1985). ATP: luminometric method. in: *Methods of enzymatic analysis*. (Ed. H.-U. Bergmeyer). VCH, Weinheim, **VII**: 357-579.
- Wurzel, H., C. C. Yeh, C. Gairola, *et al.* (1995). "Oxidative damage and antioxidant status in the lungs and bronchoalveolar lavage fluid of rats exposed chronically to cigarette smoke." *J Biochem Toxicol* **10**(1): 11-7.

-
- Yoshida, T. (1996). "Determination of reduced and oxidized glutathione in erythrocytes by high-performance liquid chromatography with ultraviolet absorbance detection." *J Chromatogr B Biomed Appl* **678**(2): 157-64.
- Yourtee, D. M., P. Y. Tong, L. A. Rose, *et al.* (1994). "The effect of spiroorthocarbonate volume modifier co-monomers on the in vitro toxicology of trial non-shrinking dental epoxy co-polymers." *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* **86**(3): 347-60.
- Zamora, P. O., R. E. Gregory, A. P. Li, *et al.* (1986). "An in vitro model for the exposure of lung alveolar epithelial cells to toxic gases." *J Environ Pathol Toxicol Oncol* **7**(1-2): 159-68.
- Zucco, F. and A. L. Vignoli (1998). In vitro toxicology in Europe 1986-1997. in: *Final Report to the European Commission DGXI*. (Ed. ESTIV). Lombardo, Rom: 7-88.
- Zurlo, J., D. Rudacille and A. M. Goldberg (1994). *Animals and alternatives in testing - history, science and ethics.* , New York, Mary Ann Liebert Inc.

8.2 Aus der Arbeit hervorgegangene eigene Veröffentlichungen

- Aufderheide, M., D. Ritter and J. W. Knebel (1998). "Cytotoxic activity of PAN (Peroxyacetyl nitrate), an environmental pollutant, on rat lung cells." *Toxicology Letters* **95**(Suppl. 1): 240.
Dazu: Poster VIII International Congress of Toxicology, Paris, 7/98
- Knebel, J. W., D. Ritter and M. Aufderheide (1998). "Development of an in vitro system for studying effects of native and photochemically transformed gaseous compounds using an air/liquid culture technique." *Toxicol Lett* **96-97**: 1-11.
Dazu: Vortrag (englisch) Sixth European Meeting of Environmental Hygiene, Graz, 6/97
- Palm, W. U., M. Elend, J. W. Knebel, Ritter, D., Hecht, M., Rupp, M., Görlitz, B., Emmendorffer, A., Fahrig, R., Zetzsch, C., Aufderheide, M.. (1998). „Toxic potential of native and photochemically transformed gaseous compounds: first results of the phototox project.“ in: *Relationships between respiratory disease and exposure to air pollution*. (Ed. U. Mohr). ILSI Press: 394-398.
Dazu: Poster, 6th International Inhalation Symposium, Hannover, 2/97
- Ritter, D., J. W. Knebel and M. Aufderheide (1998). "PAN (Peroxyacetyl-Nitrat) zeigt stark zytotoxische Wirkungen auf Lungenzellen in vitro." *Pulmonologie* **52**: S75.
Dazu: Poster, 39. Kongreß der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie, Leipzig, 3/98
- Ritter, D., J. W. Knebel, M. Aufderheide, *et al.* (1999). "Development of a cell culture model system for routine testing of substances inducing oxidative stress." *In Vitro Toxicology* **13**(4/5): 745-751.
Dazu: Vortrag (englisch) 10th International Workshop on In Vitro Toxicology (InViTox 98), Sparsholt, Winchester, UK, 9/98

8.3 Abkürzungen

2-VP	2-Vinylpyridin	MTP-Well	Mikrotiterplatten-Well
4-HNE	4-Hydroxynonenal	NAD	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid, oxidiert
6PGDH	6-Phosphogluconat-Dehydrogenase	NADH	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid, reduziert
abs.	absolut	NADP	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat, oxidiert
ADP	Adenosin-Diphosphat	NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat, reduziert
AMP	Adenosin-Monophosphat	NBT	Nitro-blaues Tetrazolium
ATP	Adenosin-Triphosphat	O.D.	optische Dichte
BrdU	Bromdesoxyuridin	PAN	Peroxyacetyl-Nitrat
CDNB	1-Chlor-2,4-dinitrobenzol	PBS	phosphate buffered saline
CSC	Zigarettenrauchkondensat	PET	Polyethylen-Terephthalat
DDC	N,N-Diethyldithiocarbamat	PF	Peakfläche
DMSO	Dimethylsulfoxid	PMS	Phenazin-methosulfat
DTNB	5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoesäure)	RFU	relative Fluoreszenz-Einheiten
EDTA	Ethylendiammintetraacetat	rH	relative Feuchte
ELF	epithelial lining fluid	RL	Reinluft
FKS	Foetales Kälberserum	RLU	relative Licht-Einheiten
G6PDH	Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase	ROI	reaktive oxidierende Substanzen
GDH/TIM	Glycerinphosphat-Dehydrogenase/Triosephosphat-Isomerase	ROS	reaktive Sauerstoff-Spezies
GGCS	γ -Glutamyl-Cystein-Synthetase	rpm	Umdrehungen pro Minute
GST	Glutathion-S-Transferase	RT	Raumtemperatur
HK	Hexokinase	s	Sekunde
INT	2-p-Nitrophenyl-3-p-iodophenyl-5-phenyltetrazolium Chlorid	S.D.	Standardabweichung
intratr. instill.	intratracheale Instillation	SOD	Superoxid-Dismutase
KW	Kohlenwasserstoff	TBARS	Thiobarbitursäure reaktive Substanzen
LDH	Lactat-Dehydrogenase	tBuOOH	<i>tert.</i> -Butylhydroperoxid
LM	Lösungsmittel	TEP	Tetraethoxypropan
l/min	Liter pro Minute	TNE	Tris-NaCl-EDTA Puffer
MDA	Malonsäuredialdehyd	TS	Tabakrauch
min.	Minuten	TW	Transwell-Insert
ml/min	l/min $\times 10^{-3}$	WST-1, WST	4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)2H-5-tetrazolio]-1,3-benzol Disulphonat
MMA	Methacrylsäure-Methylester	XOD	Xanthin-Oxidase
mO.D.	O.D. $\times 10^{-3}$		
mO.D./s	O.D. $\times 10^{-3}$ pro Sekunde		
MPI	Methyl-2-Phenylindol		
MTP	Mikrotiterplatte		

8.4 Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand in der Abteilung In-vitro Toxikologie des Fraunhofer-Institutes für Toxikologie und Aerosolforschung, Hannover. Mein Dank gilt daher an erster Stelle der Fraunhofer-Gesellschaft und allen Mitarbeitern des Institutes für die Ermöglichung derselben.

Der Abteilung In-vitro Toxikologie unter Leitung von Frau Prof. Dr. Aufderheide möchte ich für die Anregung zu dem interessanten Thema und die Gewährung umfangreichster Unterstützung danken.

Allen Mitarbeitern der Abteilung möchte ich herzlich danken für die gute Zusammenarbeit und das angenehme Arbeitsklima. Speziell den Herren Dr. Jan Knebel und Klaus Hoffmann gebührt mein Dank für konstruktive Diskussionen und kompetente Unterstützung.

Herrn Prof. Dr. Alves danke ich für die externe Betreuung der Arbeit und die Übernahme des Referates.

Den Mitarbeitern der Glastechnischen Werkstatt der Medizinischen Hochschule Hannover danke ich für den Einsatz ihrer handwerklichen Kompetenz, ohne die die Umsetzung wesentlicher Teile dieser Arbeit nicht denkbar gewesen wäre.

Bei der Abteilung Atmosphärische Chemie des Fraunhofer-Institutes für Toxikologie und Aerosolforschung möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit und lehrreiche Diskussionen bedanken.

Nicht zuletzt gebührt mein Dank allen Personen meines privaten Umfeldes, Freunden und Bekannten, deren Verständnis, Rücksichtnahme und Unterstützung wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

8.5 Lebenslauf

- | | |
|-------------|---|
| 1969 | Detlef Ritter, geboren am 26.09.1969 in Hannover |
| 1976 - 1982 | Besuch der Grundschule und Orientierungsstufe Altenbekener Damm, Hannover |
| 1982 - 1989 | Besuch des Bismarck Gymnasiums in Hannover mit Abschluß der Hochschulreife |
| 1990 - 1996 | Studium der Chemie an der Universität Hannover mit Abschluß als Diplom Chemiker |
| seit 1996 | Wissenschaftlicher Angestellter am Fraunhofer-Institut für Toxikologie und Aerosolforschung, Hannover |