

Aus dem Walther-Straub-Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität
München

Kommissarischer Leiter Prof. Dr. med. P. Eyer

**Untersuchungen zur Wirkung von 2,2'-Dichlordiethylsulfid (Schwefellost) in primären
und immortalisierten epithelialen Zelllinien**

Dissertation zum Erwerb des Doktorgrades der Humanbiologie
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Gudrun Krebs
aus
Mayen

2003

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. L. Szinicz

Mitberichterstatter: Prof. Dr. D. Nowak
Prof. Dr. E. Schmid

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. K. Kehe

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. K. Peter

Tag der mündlichen Prüfung: 15.12.2003

Für Maja

1	EINLEITUNG	1
1.1	Terminologie.....	1
1.2	Geschichtliche Bedeutung	1
1.2.1	Entdeckung von Schwefellost.....	1
1.2.2	Einsatz bei militärischen Konflikten	2
1.2.3	Einsatz in der Medizin	3
1.3	Physikalisch-chemische Eigenschaften	5
1.4	Wirkungen.....	6
1.4.1	Lokale Wirkungen	6
1.4.1.1	Wirkungen an der Haut.....	6
1.4.1.2	Wirkungen am Auge.....	9
1.4.1.3	Wirkungen in der Lunge.....	9
1.4.1.4	Wirkungen im Magen-Darm-Trakt.....	9
1.4.2	Systemische Wirkungen	10
1.4.3	Chronische Toxizität.....	10
1.5	Toxikokinetik.....	11
1.6	Mechanismus der Wirkung.....	11
1.6.1	I. Poly-ADP-Ribose Polymerase (PARP) - Hypothese	13
1.6.2	II. Thiol-Ca ²⁺ - Hypothese	13
1.6.3	III. Lipid-Peroxidation - Hypothese	14
1.7	Zytokine.....	17
1.7.1	Art und Ort der Wirkung untersuchter Zytokine	17
1.7.2	Interleukin 1	18
1.7.3	Interleukin 6.....	19
1.7.4	Interleukin 8.....	19
1.7.5	Tumornekrosefaktor- α	20
1.8	Fragestellung der Arbeit	20
2	MATERIAL UND METHODEN	22
2.1	Material.....	22
2.1.1	2,2'-Dichlordiethylsulfid (Schwefellost).....	22
2.1.2	Immortalisierte Zelllinien	22
2.1.2.1	A 549-Zellen.....	22
2.1.2.2	SCL II-Zellen.....	22
2.1.2.3	HaCaT-Zellen	22
2.1.3	Primäre Zelllinien	23
2.1.3.1	Humane epidermale Keratinozyten	23
2.1.4	Chemikalien und Substanzen.....	24
2.1.5	Geräte und Arbeitsmaterialien.....	25
2.2	Methoden.....	26
2.2.1	Gehaltsbestimmung von Schwefellost.....	26
2.2.2	Herstellung der Schwefellost-Verdünnung.....	26
2.2.3	Zellzahlbestimmung	27

2.2.4	Kultivierung von A 549-Zellen	27
2.2.5	Kultivierung von SCL II-Zellen	27
2.2.6	Kultivierung von HaCaT-Zellen.....	28
2.2.7	Anlegen einer Keratinozyten-Primärkultur	28
2.2.8	Kultivierung von Keratinozyten	29
2.2.9	Optimierung der Primärkultur durch Fibroblasteneliminierung.....	29
2.2.10	Immunhistochemischer Nachweis von Fibroblasten	30
2.2.11	Klonogenizitätstest, zur Untersuchung des Proliferationsverhalten	30
2.2.12	Vitalitätsprüfung mittels XTT-Test	31
2.2.13	Versuchsanordnung beim Zytokin-Versuch	33
2.2.14	Proteinbestimmung	33
2.2.15	ELISA zur Bestimmung von Zytokinen	34
2.2.16	Statistik	35
3	ERGEBNISSE	36
3.1	Optimierung der Keratinozyten-Kultivierung	36
3.2	Wirkung von Schwefellost auf die Klonogenizität verschiedener kultivierter Zellen.....	38
3.3	Wirkung von Schwefellost auf die Vitalität verschiedener kultivierter Zellen (XTT-Test)	41
3.4	Wirkung von Schwefellost auf den Zytokingehalt im Überstand verschiedener kultivierter Zellen	45
3.4.1	Wirkung von Schwefellost auf die Konzentration von TNF- α im Überstand verschiedener kultivierter Zellen	47
3.4.2	Wirkung von Schwefellost auf die Konzentration von IL-1 α im Überstand verschiedener kultivierter Zellen	50
3.4.3	Wirkung von Schwefellost auf die Konzentration von IL-6 im Überstand verschiedener kultivierter Zellen	54
3.4.4	Wirkung von Schwefellost auf die Konzentration von IL-8 im Überstand verschiedener kultivierter Zellen	57
3.4.5	Wirkung von Schwefellost auf die Konzentration von IL-6 im Überstand von kultivierten HaCaT-Zellen.....	60
4	DISKUSSION	62
5	ZUSAMMENFASSUNG	71
6	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	74
7	TABELLEN- UND ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	75
7.1	Tabellen	75
7.2	Abbildungen.....	75
8	LITERATURVERZEICHNIS.....	76

1 EINLEITUNG

1.1 TERMINOLOGIE

In der Literatur finden sich für Schwefellost zahlreiche chemische Bezeichnungen wie Dichlordiethylsulfid, Thiodiglykolchlorid, 2,2'-Dichlor-diethylthioether, Bis-(2-chlor-ethyl)-thioether und andere.

Aufgrund seines an Senf erinnernden Geruchs wurde für Schwefellost der Begriff Senfgas benutzt, der heute im englischen Sprachgebrauch (mustard gas bzw. sulfur mustard) noch üblich ist. Die deutsche Bezeichnung Lost geht auf **Lommel** und **Steinkopf** zurück, Chemiker, die maßgeblich an der großtechnischen Herstellung beteiligt waren (Steinkopf et al., 1920).

Die französische Bezeichnung Yperit stammt daher, dass Schwefellost im Ersten Weltkrieg bei Ypern in Flandern zum ersten Mal zum Einsatz kam. Während des Ersten Weltkrieges waren mit Schwefellost gefüllte Geschosse mit einem gelben Kreuz markiert, sodass Schwefellost auch als „Gelbkreuz“ bezeichnet wurde.

In militärischen Handbüchern findet man zumeist die Abkürzung H, die von HS (Hun'stuff) abgeleitet wird, da deutsche Truppen als „Hunnen“ bezeichnet wurden. HD steht für das destillierte Produkt (Franke et al., 1994; Klimmek et al., 1983).

1.2 GESCHICHTLICHE BEDEUTUNG

1.2.1 Entdeckung von Schwefellost

Im Jahr 1860 erhielt A. Niemann durch die Reaktion von Schwefelchlorid mit Ethylen eine Flüssigkeit mit eigenartigem, an Meerrettich und Senföl erinnernden Geruch. Als charakteristische Eigenschaft dieser öligen Flüssigkeit beschrieb er ihre Wirkung auf die Haut:

„Sie besteht darin, daß selbst die geringste Spur, die zufällig auf irgendeine Stelle der Haut kommt, anfangs zwar keinen Schmerz hervorruft, nach Verlauf einiger Stunden aber eine Rötung derselben bewirkt und bis zum folgenden Tag eine Brandblase hervorbringt, die sehr lange eitert und außerordentlich schwer heilt, unter Hinterlassung starker Narben, [...]“ (Niemann, 1860).

Zeitgleich wurde das Dichlordiethylsulfid auch in England durch den Chemiker F. Guthrie gefunden. Die Reindarstellung gelang erst 1886 Victor Meyer (Guthrie, 1860; Meyer, 1886).

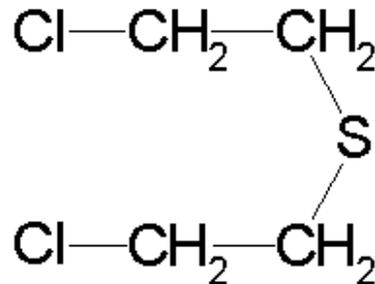


Abb. 1: Strukturformel von Schwefellost

1.2.2 Einsatz bei militärischen Konflikten

Die deutsche Heeresleitung setzte bei Ypern, Flandern, in der Nacht vom 12. zum 13. Juli 1917 erstmals Schwefellost bei einem Überraschungsangriff ein (Harris und Paxman, 1983). Dem „Genfer Protokoll“ von 1925 entsprechend, wurden von deutscher Seite keine Chemiewaffen im Zweiten Weltkrieg eingesetzt, jedoch waren Vorratshaltung und Erforschung der chemischen Kampfstoffe nicht verboten, was bedeutete, dass Schwefellost munitioniert und gefüllte Geschosse für den Einsatz bereitgehalten wurden. Allein in den USA wurden 83.300 Tonnen technisches Yperit und in Deutschland 25.500 Tonnen produziert (Schumacher et al., 1984), wobei es immer wieder zu Unfällen und Kontamination der Munitionsfabrikarbeiter kam (Weiß und Weiß, 1975).

Obwohl chemische Kampfstoffe mittlerweile von vielen Staaten geächtet worden sind, stellen sie aufgrund ihrer relativ einfachen und kostengünstigen Synthese sowie hoher Wirksamkeit weiterhin ein erhebliches militärisches und ziviles Gefahrenpotential dar. Wie der erste Golfkrieg von 1980-1988 gezeigt hat, schrecken auch heute einige Staaten vor dem Einsatz chemischer Waffen nicht zurück. Daher ist auch die Entwicklung von neuen Therapiekonzepten für Verletzungen durch chemische Kampfstoffe nach wie vor notwendig (Willems, 1989; Motakallem, 1988). Bei Schwefellost kommt erschwerend hinzu, dass bisher kein spezifisches Therapeutikum verfügbar ist.

Nicht nur militärische Kräfte sind durch chemische Kampfstoffe gefährdet worden, sondern auch die Bevölkerung durch terroristische Aktivitäten wie die Anschläge in Matsumoto (1994) und Tokio (1995) mit dem Nervenkampfstoff Sarin gezeigt haben.

Von Interesse sind weiterhin die sogenannten Rüstungsaltlasten, die auch chemische Waffen aus dem Ersten und Zweiten Weltkrieg umfassen. Bundesweit existieren zahlreiche Standorte ehemaliger Produktionsanlagen, die mit Überresten chemischer Kampfstoffe, Produktionsresten und Abbauprodukten der damaligen Rüstungsindustrie belastet sind (Liersch, 1989; Pischke, 1989).

Die chemischen Kampfstoffe wurden unter Aufsicht der Alliierten entweder verbrannt, vergraben, versickern gelassen oder im Meer versenkt.

Die von diesen chemischen Kampfstoffen ausgehende mögliche Gefährdung von Mensch und Umwelt wird heutzutage kontrovers diskutiert. Es ereignen sich immer wieder Kontaminationen und Unfälle mit Schwefellost (Theobald, 1996).

Die Alliierten hatten 1946 und 1947 rund 300 000 Tonnen deutsche C-Kampfstoffe in der Ostsee versenkt, die ihnen nach der Kapitulation Deutschlands in die Hände gefallen waren. Darunter waren hunderttausende Bomben und Geschosse- meist mit Senfgas, Lewisit und Adamsit gefüllt.....Bei einer Korrosionsgeschwindigkeit von 0,1 Millimetern pro Jahr müssten die Umhüllungen in etwa fünf Jahren in großer Zahl zu platzen anfangen (Financial Times Deutschland, 15. September 2000).

Seit 1997 ist das Abkommen zum Verbot der Entwicklung, Produktion, Lagerung und Verwendung von chemischen Waffen in Kraft. Die Einhaltung des Abkommens wird von der Organisation zum Verbot chemischer Waffen (OPCW) mit dem Sitz in Den Haag kontrolliert. Für die Inspektoren der OPCW und ihre Arbeit ist ein effektiver medizinischer Schutz von großer Bedeutung.

1.2.3 Einsatz in der Medizin

Richter (1941) hat die gewebserstörende Wirkung von Schwefellost in therapeutischen Versuchen untersucht und histopathologisch ausgewertet.

Er berichtet über die lokale Applikation von Schwefellost zur Entfernung eines Naevus pigmentosus, von Tätowierungen, Schwielen, Warzen und Melanomen. Ferner wurden

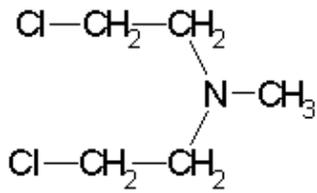
psoriatische Herde behandelt und dabei eine Befundbesserung der psoriatischen Areale festgestellt (Richter, 1941).

0,005 %ige Schwefelost-Vaseline z.B. Psoriasin® wurde lange Zeit zur Behandlung der Psoriasis vulgaris angewendet (Turanow et al., 1977), bis ein mögliches Karzinogenese-Risiko diskutiert und die unkritische Anwendung des Präparates in Frage gestellt wurde (Illig, 1977; Illig et al., 1979).

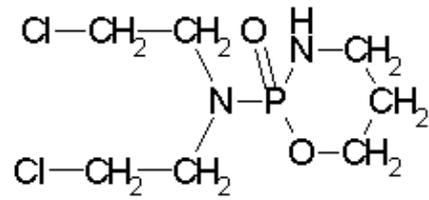
Die intensive Erforschung des Wirkungsmechanismus der Loste hat gezeigt, dass schnell wachsende Gewebe besonders empfindlich auf Loste reagieren. Die Einführung in die Tumorthherapie war die Folge.

Aufgrund ihrer alkylierenden Eigenschaft werden heute vor allem die Stickstofflost-Derivate Cyclophosphamid, Trofosfamid, Ifosfamid, Melphalan und Chlorambucil therapeutisch als Zytostatika eingesetzt.

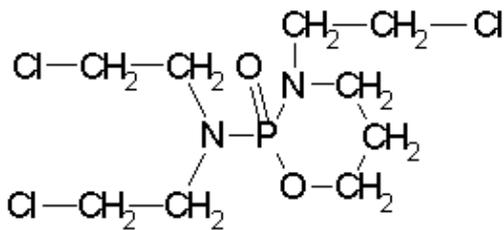
Stickstofflost selber (N-Methyl-2,2'-dichlordiethylamin) findet nach wie vor Anwendung bei der Behandlung der Mycosis fungoides und primären T-Zell-Lymphomen der Haut (Snell et al., 2000; Fritsch, 1998).



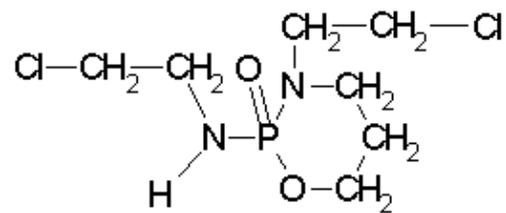
**N-Methyl-2,2'-
dichlordiethylamin**



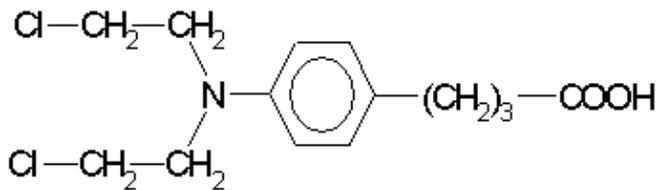
Cyclophosphamid



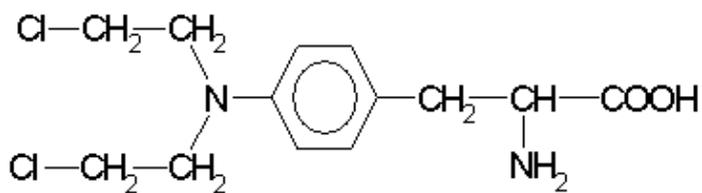
Trofosfamid



Ifosfamid



Chlorambucil



Melphalan

Abb. 2: Strukturformeln von verschiedenen Stickstofflostverbindungen

1.3 PHYSIKALISCH-CHEMISCHE EIGENSCHAFTEN

2,2'-Dichlordiethylsulfid gehört chemisch zur der Gruppe der halogenierten Alkylsulfide und ist als Reinsubstanz eine farb- und geruchlose, ölige Flüssigkeit mit hoher Beständigkeit. Der Schmelzpunkt liegt bei 14,45°C und der Siedepunkt bei 217,8°C.

Schwefellost ist spezifisch schwerer als Wasser. Während Schwefellost in Wasser nur schwer löslich ist, löst er sich in absolutem Ethanol bei Temperaturen oberhalb 16°C fast vollständig (Franke, 1977). Es ist also möglich, durch Alkoholzusatz homogene wässrige Schwefellost-Mischungen zu erhalten.

Aufgrund seines relativ geringen Dampfdruckes bei Raumtemperatur zeichnet sich Schwefellost durch eine hohe Sesshaftigkeit¹ aus, die es als chemischen Kampfstoff besonders gefährlich macht (Lohs, 1974). Schwefellost ist sehr lipophil und vermag rasch in verschiedenste Materialien einzudringen. Die Hydrolyse erfolgt in zwei Stufen unter Bildung von Thiodiglykol und nimmt mit steigender Temperatur zu.

Eine aus toxikologischer Sicht wichtige chemische Eigenschaft ist die ausgeprägte Reagibilität mit nukleophilen Reaktionspartnern wie Sauerstoff, Schwefel und Stickstoff.

1.4 WIRKUNGEN

1.4.1 Lokale Wirkungen

Aus einer amerikanischen Statistik des Ersten Weltkrieges geht hervor, dass von 7.000 Verletzten 86 % Augen- und 75 % Atemwegsschädigungen erlitten. Bei den Hautschäden zeigte sich, dass die besonders exponierten Hautareale wie z.B. das Gesicht, Hände, Arme und Beine stark betroffen waren. Feuchte drüsenreiche Körperregionen mit besonders empfindlicher Haut wie Skrotum und Achselhöhle waren bei 42 % bzw. 12 % der Schwefellost-Exponierten geschädigt (Muntsch, 1941; Gillert, 1944; Von den Vel-den, 1921).

In einer Dokumentation iranischer Ärzte, die 535 Verletzte aus dem Ersten Golfkrieg behandelt haben, findet man, dass 85 % der eingelieferten Patienten unter Konjunktivitis litten und 92 % der Patienten Hautschäden aufwiesen (Momeni et al., 1992).

1.4.1.1 Wirkungen an der Haut

Schwefellost dringt innerhalb von 30 Minuten nach Applikation eines Tropfens in die Haut schmerzlos ein. Abhängig von Dauer und Dosis kommt es nach einer Latenzzeit

¹ Sesshaftigkeit eines Kampfstoffes beschreibt seine Beständigkeit im Gelände.

von mehreren Stunden zu einem Erythem, zur Bildung oberflächlicher und tiefer Blasen, bei schwerer Exposition zu Nekrosen (Dickel et al., 1952).

Bei der erythematösen Form entwickeln sich nach ca. 6-8 Stunden Rötung und Schwellung der Haut mit starkem Juckreiz. Der Heilungsprozess erfolgt langsam über Schuppung, Desquamation und Hyperpigmentierung der Haut.

Bei höheren Schwefellost-Dosen kommt es im Korium nach dem erythematösen Stadium zur Exsudation von Serum und Erythrozyten bei zunächst intakter Epidermis, wobei es zur Bildung kleinerer Blasen kommt. Die Blasen fließen im Verlauf eines Tages zu größeren zusammen. Während das abgehobene Epithel langsam nekrotisiert, beginnt neues Epithel von den Wundrändern und Haarfollikeln aus nachzuwachsen, sodass es in der Regel nach ca. 4 Wochen zum Wundschluss kommt.

Bei der tiefen bullösen Form platzen die entstandenen Blasen bereits nach wenigen Tagen auf und geben einen geschwürigen Blasengrund frei. In den nekrotischen Geschwüren reicht der Wundgrund bis zur Subcutis. Aufgrund dieses tiefgehenden Gewebeerlustes kommt es nur sehr langsam zur Reepithelialisierung, sodass das vollständige Abheilen dieser Wunden mehrere Monate dauert.



Abb. 3: Oberflächliche bis tiefe bullöse Form eines Losthautschadens ca. 16 Stunden nach Exposition: Leichte Rötung des gesamten Rückens und viele kleine Bläschen, die bereits zu größeren Blasen konfluiert sind. Links unten: Für Randzonen eines tieferen Lostschadens typischer Bläschenkranz.



Abb. 4: Ausgedehnte oberflächliche bis mittelschwere bullöse Form eines Losthautschadens ca. 24-48 Stunden nach Exposition: Exfoliatives Abheben der Epidermis über das Stadium kleinerer Vesikel. (Abbildungen 3 und 4 mit freundlicher Genehmigung von Herrn Dr. med. U. K. Helm)

1.4.1.2 Wirkungen am Auge

Nach einer kurzen Latenzzeit (Minuten bis Stunden) bewirken Schwefellost-Dämpfe am Auge eine Reizung des Augapfels. Es kommt zu Tränenfluss, Lichtscheu und eitriger Konjunktivitis. Je nach Intensität der Exposition kommt es zur Entzündung der Hornhaut mit Geschwürbildung. Der direkte Kontakt des Auges mit der Flüssigkeit führt zur Trübung der Hornhaut, Vernarbung und gegebenenfalls Erblindung (Heinsius, 1940).

1.4.1.3 Wirkungen in der Lunge

Schwefellost löst mit einer Latenzzeit von wenigen Stunden Hustenreiz, Kratzen im Hals und Heiserkeit aus. Später folgen Schluckbeschwerden und ein Anschwellen der Schleimhäute im Nasen-Rachen-Raum. Bei höheren Dosen kann es zu nekrotischen Veränderungen der Bronchialschleimhaut kommen. Abgelöste Trachealschleimhaut (sog. „Pseudomembranen“) kann die Atemwege verlegen oder durch mechanische Reizung einen sofortigen reflektorischen Atemstillstand hervorrufen. Aufgrund der gleichzeitig bestehenden Immunsuppression können sich Pneumonien entwickeln. Bei besonders hoher inhalativer Belastung mit Schwefellost ist ein toxisches Lungenödem beschrieben worden.

1.4.1.4 Wirkungen im Magen-Darm-Trakt

Nach oraler Aufnahme des Schwefellostes kommt es neben der lokalen Wirkung an Mund- und Rachenschleimhäuten (Erythem- und Bläschenbildung) zu heftigen Magenschmerzen, die nach etwa 15 Minuten einsetzen. Weiterhin treten Übelkeit, Erbrechen und blutige Durchfälle sowie völlige Appetitlosigkeit und Durst auf (Spiegelhoff und Watrin, 1953).

1.4.2 Systemische Wirkungen

Durch Schwefellost können Symptome, wie sie aus der Chemotherapie bekannt sind hervorgerufen werden. Stunden nach der Vergiftung kommt es zu Übelkeit, Erbrechen, Müdigkeit und Fieber. Hohe Dosen können zu zentralen Erregungszuständen und Krampfanfällen führen. Muskelkrämpfe, Gleichgewichtsstörungen und Bewusstseinschwund sind Anzeichen für eine zentrale Intoxikation, die nach ein bis zwei Tagen tödlich endet (Franke et al., 1994)

Schwefellost führt in höheren Dosen zu einer Knochenmarksdepression. Typische Laborbefunde sind: Leukozytose, Leukopenie, Thrombozyto- und Eosinopenie sowie Anämie (Panzytopenie). Dies erklärt auch die beobachtete Immunsuppression.

1.4.3 Chronische Toxizität

Heute weiß man, dass Schwefellost, bedingt durch seine Fähigkeit Nukleinsäuren alkylieren zu können (vgl. Wirkmechanismus), eine Substanz mit kanzerogenen Eigenschaften ist (Fox und Scott, 1980). Schwefellost führt je nach Expositionsweg zu verschiedenen Tumorarten wie z.B. Bronchialkarzinom und Leukämien (Pechura und Rall, 1993) sowie zu verschiedenen Hauttumoren wie z.B. Morbus Bowen (Inada et al., 1978; Klehr, 1984).

Bereits während der sechziger Jahre stellten sowohl englische als auch amerikanische Wissenschaftler einen Zusammenhang zwischen Lost-Exposition, Bronchitis und der Entstehung von Lungenkrebs her, wobei sie sich auf Daten von Kriegsveteranen aus dem Ersten Weltkrieg stützten (Case und Lea, 1955; Beebe, 1960).

Wada berichtet über ehemalige Arbeiter aus einer japanischen Munitionsfabrik und Weiß und Weiß konnten eine signifikante Häufung maligner Tumore bei ehemaligen Arbeitern der Heeresmunitionsanstalt Munster feststellen, die allerdings auch einen großen Nikotinabusus aufwiesen. Statistisch war das Risiko an Lungenkrebs zu erkranken bei nichtrauchenden Schwefellost-Arbeitern nicht signifikant erhöht gegenüber einer Gruppe Raucher, die nicht mit Schwefellost arbeitete. Die Kombination von Rauchen und Arbeiten mit Schwefellost erwies sich als besonders kritisch (Wada et al., 1968; Weiß und Weiß, 1975; Yanagida et al., 1988; Easton et al., 1988).

1.5 TOXIKOKINETIK

Schwefellost ist eine lipophile hochreaktive Verbindung, die auf allen Wegen rasch in den Organismus eindringen kann. Verteilung, Reaktion mit körpereigenen Verbindungen und Elimination erfolgen ebenfalls rasch. Im Urin werden Glutathionkonjugate des Dichlorethylsulfids und des Sulfons sowie Thiodiglykol gefunden (Szinicz, 1994).

1.6 MECHANISMUS DER WIRKUNG

Schwefellost wirkt aufgrund seiner Fähigkeit, Alkylgruppen an nukleophile Reaktionspartner abzugeben, im Organismus als Alkylanz. Zu den nukleophilen Gruppen gehören Amino-, Sulfhydryl-, Hydroxyl-, Carboxyl-, Phosphat- und Imidazolgruppen, die Bestandteile zahlreicher Moleküle des Organismus sind, wie Proteine, Enzyme, Aminosäuren, DNA, RNA und andere.

Voraussetzung für die Reaktion mit den Nukleophilen ist die Bildung eines Sulfoniumions und seine anschließende Umlagerung zum Carbeniumion. Dieses Carbeniumion reagiert dann mit der nukleophilen Gruppe, wodurch es zur Alkylierung kommt.

Größte Bedeutung hat hierbei die Alkylierung der DNA, wobei 90 % aller Alkylierungen am Stickstoff in Position 7 des Guanins stattfinden.

Da Schwefellost zwei Chlorethylgruppen besitzt, die beide für sich reagieren können („bifunktionales Alkylanz“), kann es zur Quervernetzung zweier DNA-Stränge kommen. Das sogenannte „cross-linking“ findet man bevorzugt zwischen zwei Guaninmolekülen.

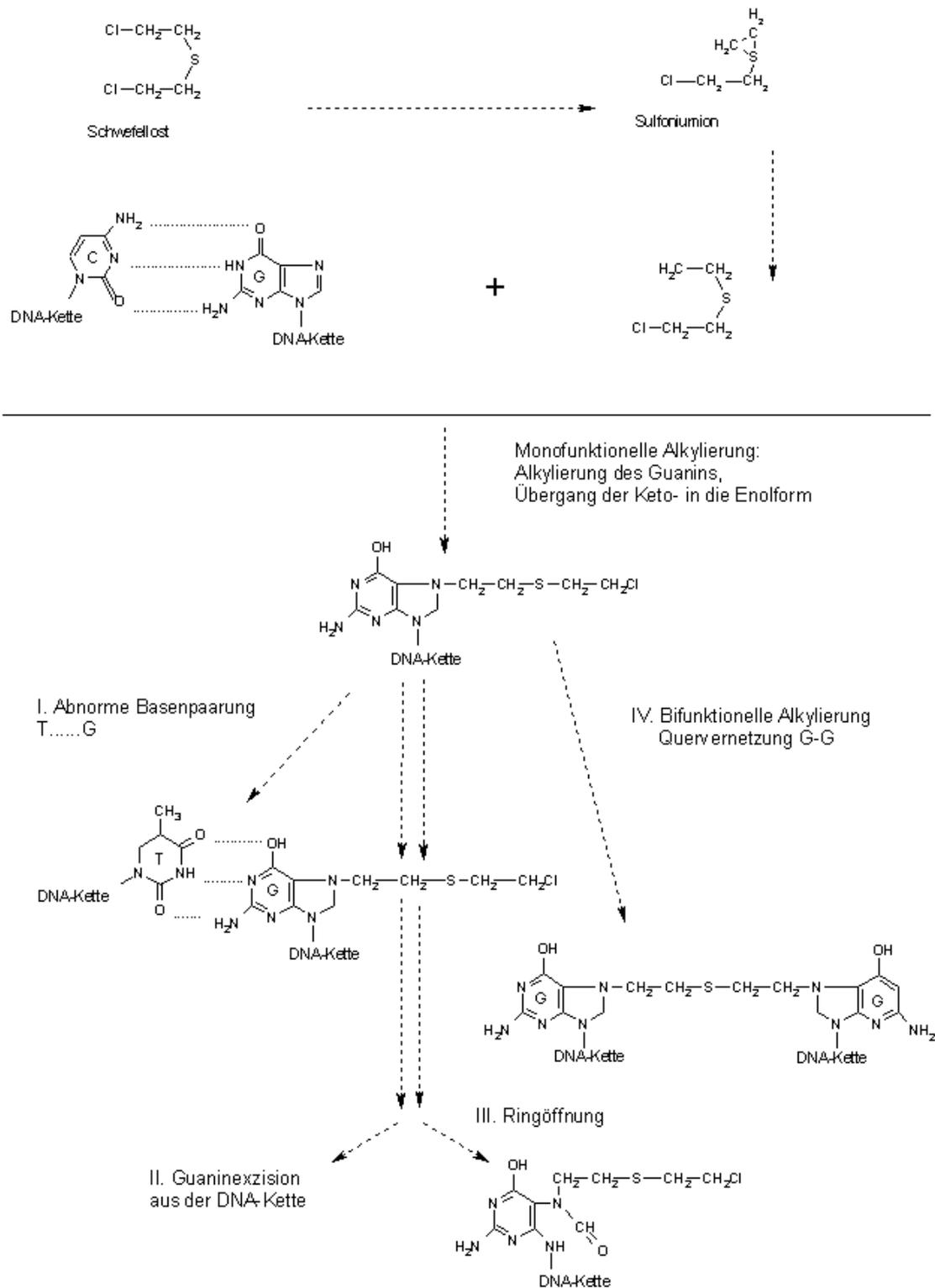


Abb. 5: Veränderung der DNA durch Schwefellost: Nach Aktivierung des Schwefellostes über das Sulfonium- zum Carbeniumion ist der erste Schritt eine monofunktionelle Alkylierung des Guanins (G) an N-7. Dabei wird das üblicherweise in Ketoform vorliegende G in die Enolform überführt, die damit zur Basenpaarung mit Thymin (T) anstelle von Cytosin (C) befähigt wird (I). Durch Alkylierung von N-7 wird der Imidazolring labilisiert. Dies kann zur Öffnung des Ringes (III) oder zur Exzision des G aus der DNA-Kette (II) führen. Schwefellost als bifunktionales Alkylanz mit zwei reaktiven Gruppen kann darüber hinaus zu einer festen Quervernetzung der DNA-Stränge führen (IV) oder die DNA fest an andere Moleküle (z.B. Proteine) binden (nach Estler, S. 690).

Mit der Aufklärung des Pathomechanismus der Schädigung durch Schwefellost befassten sich auch heute - 140 Jahre nach seiner Entdeckung - zahlreiche wissenschaftliche Gruppen. Mittlerweile existieren mehrere Hypothesen zur Pathophysiologie, auf die im Folgenden näher eingegangen werden soll.

1.6.1 I. Poly-ADP-Ribose Polymerase (PARP) - Hypothese

Papirmeister et al. formulierten 1985 die Hypothese, dass es durch Schwefellost zur Schädigung der DNA kommt (Alkylierung, „cross-linking“ und Strangbrüche), wodurch das chromosomale Enzym Poly-ADP-Ribose-Polymerase zur Reparatur der DNA-Quervernetzung aktiviert wird, welches NAD^+ verbraucht. Der NAD^+ -Verlust wiederum inhibiert die Glykolyse, sodass der Energiestoffwechsel der Zelle massiv gestört ist, was letztendlich zum Tod der Zelle führt.

Das Absinken der intrazellulären NAD^+ -Konzentration nach Einwirkung von Schwefellost wurde bei Menschenhaut-transplantierten Mäusen (Gross et al., 1985), humanen Leukozyten (Meier et al., 1987) und humanen epidermalen Keratinozyten (Smith et al., 1990; Mol et al., 1989) nachgewiesen.

1.6.2 II. Thiol- Ca^{2+} - Hypothese

Diese Hypothese geht davon aus, dass alkylierende Substanzen wie Schwefellost mit Thiolgruppen (Sulfhydryl-Gruppen), besonders mit der des Glutathions, reagieren. In der Folge wird intrazellulär eine Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration beobachtet. Durch den vorhandenen Calcium-Überschuss werden Calcium-abhängige katabolische Prozesse eingeleitet und verschiedene Enzyme aktiviert.

Die verstärkte Aktivität von Proteasen führt zum Abbau von Strukturproteinen, sodass das Zytoskelett zerstört wird und die Zelle stirbt. Aktivierte Endonukleasen verursachen DNA-Strangbrüche, die über den oben angeführten Mechanismus (PARP-Hypothese) zum Energieverlust der Zelle und damit zum Tod derselben führen. Durch die erhöhte Calcium-Konzentration werden auch Phospholipasen aktiviert, die die Phospholipide hydrolysieren, sodass die Zellmembran durchlässig wird.

Eine durch Schwefellost ausgelöste Erhöhung des intrazellulären Calciums, die Aktivierung der Phospholipase A₂ und die daraus resultierende Schädigung der Zellmembran konnten von Ray et al. nachgewiesen werden (Ray et al., 1995).

1.6.3 III. Lipid-Peroxydation - Hypothese

Von Miccadei et al. wurde 1988 postuliert, dass Schwefellost in der Zelle zur Glutathion-Depletion führt und infolgedessen Sauerstoffradikale und andere Oxidanzien nicht mehr abgefangen werden können. Diese Oxidanzien reagieren dann mit Membranphospholipiden, sodass die Zellmembran durchlässig wird und nicht mehr funktioniert. Der Verlust der Membranintegrität führt schließlich zum Zelltod.

In der folgenden Abbildung werden die Mechanismen nochmals zusammenfassend schematisch dargestellt. Das Diagramm wurde in Anlehnung an Schemata von Papirmeister et al. erstellt (Papirmeister et al., 1991).

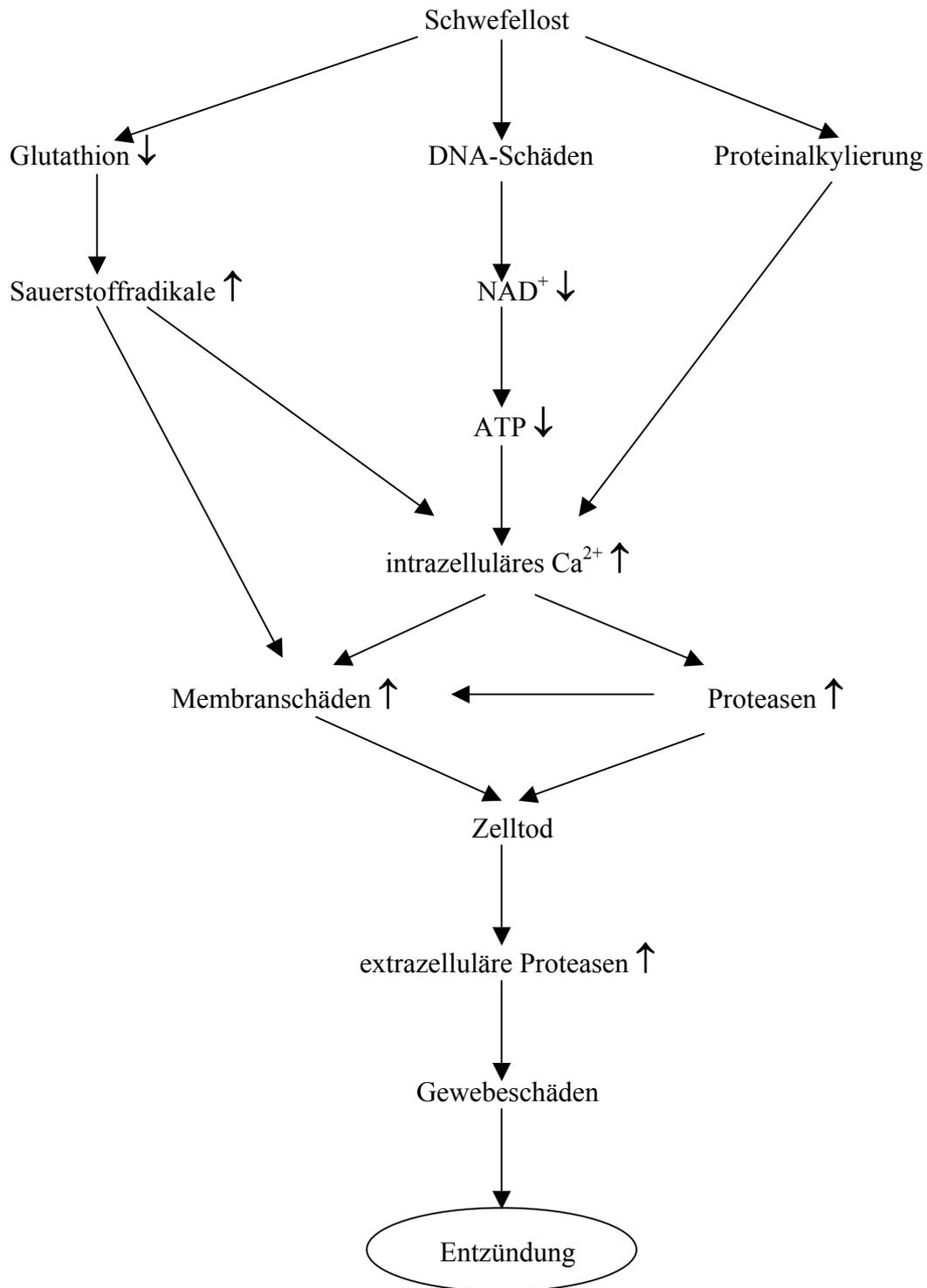


Abb. 6: Schematische Darstellung des Pathomechanismus der Schädigung durch Schwefellost

Betrachtet man die durch Schwefellost verursachten akuten Schäden an epithelialen Geweben, so erkennt man, dass Schwefellost zum einen zytotoxisch wirkt, zum anderen im angrenzenden Gewebe Entzündungen hervorruft.

Beim Tod von Hautzellen werden folgende Mechanismen unterschieden: terminale Differenzierung, Apoptose und Nekrose (Paus et al., 1995).

Sowohl bei der terminalen Differenzierung als auch bei der Apoptose spricht man von „programmiertem Zelltod“, der auch unter physiologischen Bedingungen abläuft, während die Nekrose stets pathologisch ist.

Bei der terminalen Differenzierung wachsen sich teilende, relativ undifferenzierte Zellen zu hochdifferenzierten Zellen aus und sterben schließlich nach Erreichen ihrer terminalen Funktionalität ab. Dieser Prozess läuft beispielsweise bei der Reifung der Keratinozyten in der Haut ab, die mit der Verhornung (Absterben der Keratinozyten) endet.

Die Apoptose ist ebenfalls ein physiologischer Prozess, bei dem Zellen „gewebeschonend“ abgebaut werden; dies spielt zum Beispiel bei der Embryonalentwicklung eine Rolle (Finger- und Zehenbildung: Ausbildung der Interdigitalräume durch „programmierten Zelltod“, Gewebemodulierung während der Organogenese).

Die Induktion der Apoptose ist in der Regel mit der Regulation des Zellzyklus eng verknüpft. Dabei spielen Schlüsselgene wie c-myc, c-fos und p53 eine große Rolle. Der Zellzyklusregulator p53 fungiert als potenter Apoptoseinduktor und sorgt dafür, dass Zellen mit DNA-Defekten durch Apoptose eliminiert werden. Diese selektive Deletion von Einzelzellen erfolgt gewebeschonend durch Abkapselung und Eliminierung von DNA-Fragmenten und schädlichen Zellinhaltsstoffen, unter Bildung sog. „apoptotic bodies“. Durch das Fehlen des Austrittes intrazellulärer Bestandteile kommt es bei der Apoptose typischerweise zu keiner Entzündungsreaktion.

Apoptose kann auch bei pathologischen Prozessen eine bedeutende Rolle spielen. So kommt es bei Viruspapillomen, Alopecia areata, Morbus Bowen, einer Vielzahl solider Tumoren etc. zu einer gesteigerten Apoptose.

Auch durch UV-B-Bestrahlung kann die Apoptoserate von Keratinozyten erhöht werden. Dies ist physiologisch sinnvoll, da die durch UV-Strahlung alterierten und teilwei-

se transformierten Hautzellen („sunburn cells“) durch frühzeitige Deletion vollständig eliminiert werden

Im Unterschied zu den beiden oben aufgeführten Formen des Zelltodes, ist die Nekrose stets pathologisch und kann durch chemische, physikalische und biologische Noxen ausgelöst werden. Es kommt zum Anschwellen der gesamten Zelle und der einzelnen Organelle, das zum Platzen der Zelle führt. Im umliegenden Gewebe kommt es durch das Austreten intrazellulären Materials und der Zerfallsprodukte zur Entzündung.

Der nach Schwefelst-Exposition auftretende Zelltod ist sowohl auf apoptotische, als auch nekrotische Prozesse zurückzuführen (Dabrowska et al., 1996).

Das klinische Bild der Schädigung ist auch mit einer entzündlichen Reaktion verbunden (Rötung, Schwellung, Nekrose).

Keratinozyten, die mehr als 90 % der Bestandteile der Epidermis ausmachen, sind bei der Entstehung von Entzündungen maßgeblich beteiligt und die von ihnen ausgeschütteten Entzündungsmediatoren von besonderem Interesse.

Bisher wurden u.a. die Zytokine Interleukin 1 (IL-1), IL-6, IL-8, Koloniestimulierender Faktor (CSF), der Hepatozyten stimulierende Faktor III (HSF III) und Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) als Produkte der Keratinozyten identifiziert (McKenzie und Sauder, 1990). Verschiedene Formen der Zellschädigung können zur Freisetzung dieser Zytokine führen.

1.7 ZYTOKINE

1.7.1 Art und Ort der Wirkung untersuchter Zytokine

Zytokine sind wasserlösliche Polypeptide zellulären Ursprungs, die sich hinsichtlich ihrer Funktion pleiotrop (ein Zytokin hat mehrere verschiedene Wirkungen) und redundant (verschiedene Zytokine haben gleiche Wirkungen) verhalten (Dingermann, 1999; Roeb und Rose-John, 1996; Asadullah et al., 1997; Ibelgaufts, 1992). Sie werden im Organismus immer neu synthetisiert und nie gespeichert und sind bereits in Konzentrationen im Nano- bis Pikogramm-Bereich biologisch wirksam. Ihre Wirkung entfalten

sie zumeist autokrin (auf die produzierende Zelle zurück) oder parakrin (auf benachbarte Zellen).

Als physiologische Mediatoren nehmen sie unterschiedliche regulatorische Funktionen in Prozessen wie der Immunantwort, Wundheilung, Entzündungsreaktionen, Hämatopoese, Knochen- und Knorpelstoffwechsel wahr.

Zu der Gruppe der Zytokine gehören die Interleukine, Interferone, Koloniestimulierende Faktoren, Zytotoxine (z.B. Tumornekrosefaktor- α (s.u.)) und andere.

Im Folgenden soll auf die Bedeutung und Funktion der Zytokine, die Gegenstand dieser Untersuchung waren, näher eingegangen werden.

1.7.2 Interleukin 1

Als Produzenten von Interleukin 1 wurden bisher Monozyten, Makrophagen, Endothelzellen, Fibroblasten, Granulozyten, glatte Muskelzellen, NK-Zellen („natural killer“-Zellen), lymphatische Zellen und Keratinozyten identifiziert. *In der Haut ist IL-1 in 100-1000fach höherer Konzentration vorhanden als in den meisten anderen Geweben [...] (Nashan und Luger, 1999).* Daher wird die Haut auch als IL-1-Schild des Körpers bezeichnet. Man kennt zwei verschiedene Formen dieses Interleukins, die als IL-1 α und IL-1 β bezeichnet werden. Beide Formen unterscheiden sich beträchtlich in ihrer Aminosäuresequenz, binden jedoch an denselben Rezeptor und zeigen identische biologische Eigenschaften (Kirchner et al., 1993). IL-1 kann im Zellinnern nicht nachgewiesen werden und wird wahrscheinlich an der Membran oder extrazellulär produziert. Die Vorläuferproteine der beiden Formen unterscheiden sich insofern, als der IL-1 α -Vorläufer bereits an den Rezeptor gebunden werden kann, während der IL-1 β -Vorläufer dafür erst umgewandelt werden muss (Nashan und Luger, 1999).

IL-1 ist ein pleiotroper Faktor, der sowohl lokal als auch systemisch wirkt. Eine Hauptwirkung ist die Stimulation anderer Zellen zur Sekretion von Zytokinen. Weiterhin beeinflusst IL-1 die Freisetzung von Akut-Phase-Proteinen aus Hepatozyten (vgl. IL-6) sowie von Prostaglandinen aus verschiedenen Zelltypen. Es wirkt als endogenes Pyrogen und ist zusammen mit IL-6 und TNF- α an der Entstehung chronisch entzündlicher Krankheiten maßgeblich beteiligt. IL-1 fördert außerdem die Proliferation von B-

Lymphozyten, das Wachstum von Fibroblasten und Endothelzellen sowie die Erhöhung der NK-Zell-Aktivität.

Interleukin 1 wurde vor allem als Vertreter aus der Gruppe der proinflammatorischen Zytokine für die Versuche ausgewählt.

1.7.3 Interleukin 6

Interleukin 6 wurde bisher in Monozyten, Makrophagen, T-Zellen, Endothelzellen, Fibroblasten, B-Zellen sowie Keratinozyten nachgewiesen. Seine Funktionen sind zahlreich. So spielt es eine Rolle bei der Induktion der Differenzierung von B-Zellen in antikörperproduzierende Plasmazellen. Weiterhin fördert es die Produktion der Antikörper IgM, IgG sowie IgA. Darüber hinaus trägt es zur Steigerung der Phagozytoseaktivität von Monozyten und Makrophagen bei. In Hepatozyten führt es zur Induktion von Akut-Phase-Proteinen (Andus et al., 1989). Zusammen mit IL-1 wirkt es auf die Proliferation und Zytokinproduktion der T-Helfer-Zellen. Gemeinsam mit IL-2 fördert es die Teilung und Differenzierung von zytotoxischen T-Zellen und im Zusammenwirken mit IL-3 und Granulozyten-Makrophagen-CSF (GM-CSF) regt es die Stammzellen zur Proliferation an.

Interleukin 6 ist bei allen entzündlichen Prozessen, wie Verbrennungen, Infektionen und Operationen beteiligt; erhöhte Spiegel finden sich auch bei einigen Tumor- und Autoimmunerkrankungen.

1.7.4 Interleukin 8

Interleukin 8 wird hauptsächlich von Monozyten, Makrophagen, Hepatozyten, Epithel- und Endothelzellen produziert. Als Mediator der lokalen Entzündung induziert es das Austreten von neutrophilen Granulozyten vom Blut ins Gewebe (daher früher als NAP-1, neutrophil activating peptide-1 bezeichnet).

IL-8 wird nach Stimulation durch IL-1 und TNF- α verstärkt synthetisiert und besitzt chemotaktische Aktivität auf sämtliche migratorische Immunzellen.

Außerdem wirkt es auf epidermale Zellen mitogen, d.h. proliferationsfördernd.

1.7.5 Tumornekrosefaktor- α

Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) ist an der Abwehr von Infektionen beteiligt, indem es unter anderem die Phagozytose durch Granulozyten und Makrophagen stimuliert, den Arachidonsäurestoffwechsel aktiviert, in Makrophagen für die Entstehung von Sauerstoffradikalen sorgt. Da es den Lipidstoffwechsel hemmt, führen hohe TNF- α Konzentrationen zu Kachexie (daher stammt das Synonym Cachectin). Weiterhin wurde in vitro eine zytolytische bzw. -statische Wirkung auf manche Tumorzelllinien festgestellt; bei transplantierten Tumoren wurde eine hämorrhagische Nekrose induziert. TNF- α sorgt durch die Bildung von Prostaglandinen für eine beschleunigte Wundheilung.

Überexpression von TNF- α führt zu Kachexie (z.B. bei Tumorpatienten), Schock bei gram-negativer Sepsis und begünstigt durch die Dämpfung antikoagulatorischer Mechanismen die Entstehung von Thrombosen.

1.8 FRAGESTELLUNG DER ARBEIT

Ziel der Untersuchungen war es, den Pathomechanismus der Schädigung durch Schwefelost anhand von epithelialen Zelllinien näher zu untersuchen, wobei das Geschehen unmittelbar nach Schwefelost-Exposition bis zum Auftreten der ersten Symptome im Vordergrund stand.

In der Epidermis, die zu 90 % aus Keratinozyten besteht, wirken die Keratinozyten aktiv an allen entzündlichen und immunologischen Reaktionen mit, indem sie eine Vielzahl biologisch aktiver Moleküle sezernieren. Dazu gehören neben Wachstumsfaktoren eine Reihe inflammatorischer Zytokine (Ansel et al., 1990; Fritsch, 1998, Nozaki et al., 1991).

Zunächst sollte daher ein Isolierungsprotokoll für die möglichst reine Gewinnung primärer Keratinozyten implementiert und so optimiert werden, dass keine Fremdzellen wie z.B. Fibroblasten mehr nachweisbar sind.

Es sollte auch geprüft werden, ob sich permanente Zellkulturen für die o.g. Untersuchungen eignen. Die Versuche wurden mit verschiedenen Monokulturen epithelialer Zelllinien durchgeführt und die erhobenen Daten miteinander verglichen. Ziel war es,

auf Basis der erhobenen Daten zu entscheiden, ob eine permanente Zelllinie vergleichbare Reaktionen nach Schwefellost-Exposition aufweist wie primäre Keratinozyten.

Da Schwefellost einerseits mit den Nukleinsäuren reagiert und so die Proliferationsfähigkeit der Zellen beeinträchtigen kann und andererseits zum Zelltod führen kann, wurden die Klonogenizität, die Vitalität bzw. die metabolische Aktivität mitochondrialer Dehydrogenasen und die entzündliche Reaktion nach Schwefellost-Exposition bei verschiedenen Konzentrationen untersucht.

Aus der Fülle der bei Entzündungsabläufen beteiligten Mediatoren wurden die proinflammatorischen Zytokine Interleukin 1 und 6 und TNF- α sowie das zur Gruppe der Chemotaxine gehörende Interleukin 8 für die Untersuchungen ausgewählt (Adams und Lloyd, 1997; Antilla et al., 1990; Katayama et al., 1994; Castells-Rodellas et al., 1991; Luster, 1998). Dabei wurde Schwefellost in einer Konzentration von 500 μ M eingesetzt, da diese Konzentration als sicher blasenbildend beschrieben worden ist (Hinshaw et al., 1999).

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 MATERIAL

2.1.1 2,2'-Dichlordiethylsulfid (Schwefellost)

Schwefellost wurde vom Bundesministerium der Verteidigung zur Verfügung gestellt und wies eine Reinheit von 97,7 % auf.

2.1.2 Immortalisierte Zelllinien

2.1.2.1 A 549-Zellen

A 549-Zellen entstammen einem humanen Adenokarzinom der Lunge, welches 1972 bei einem 58-jährigen Mann entfernt wurde. Es sind epitheliale Zellen, die adhärenente Monolayer bilden. Aufgrund ihrer enzymatischen Ausstattung sind sie Alveolar-Pneumozyten Typ II sehr ähnlich (Lieber et al., 1976; Giard et al., 1973).

2.1.2.2 SCL II-Zellen

Bei dieser Zellart handelt es sich um eine humane Keratinozyten-Zelllinie, welche aus einem differenzierten Plattenepithelkarzinom (SCC = squamous cell carcinoma) eines 91-jährigen Mannes stammt. Die SCL II-Zellen wurden über einen Zeitraum von vier Jahren bezüglich Morphologie, Proteingehalt und Chromosomensatz charakterisiert und zeigten dabei phänotypisch keine Veränderung (Tilgen et al., 1983). Sie sind eine adhärenent wachsende, permanente Zelllinie.

2.1.2.3 HaCaT-Zellen

HaCaT-Zellen sind spontan immortalisierte humane Keratinozyten.

Die Linie entwickelte sich aus Keratinozyten eines 62-jährigen Mannes durch Kultivierung bei niedriger Calciumkonzentration und erhöhter Temperatur (38,5°C).

Trotz ihres unlimitierten Wachstums zeichnen sie sich durch ein normales Differenzierungsverhalten aus, wenn sie an der Luft-Flüssigkeitsgrenze kultiviert werden (Bou-

kamp et al., 1988). Sie weisen eine Punktmutation im p53-Gen auf (Lehmann et al., 1993).

Die Zelllinie wurde der Arbeitsgruppe von Herrn Dr. Kehe durch Herrn Prof. Fusenig (DKFZ, Heidelberg) freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

2.1.3 Primäre Zelllinien

2.1.3.1 Humane epidermale Keratinozyten

Die Keratinozyten (NHEK) wurden sowohl von der Firma CellSystems, St. Katharinen, käuflich erworben als auch aus Vorhaut isoliert und kultiviert. Die kommerziell erworbenen Zellen stammten aus Brusthaut von weiblichen adulten Einzelspendern. Die selbst angelegten Primärkulturen wurden aus Vorhaut von zumeist Kleinkindern und vereinzelt auch adulten Spendern gewonnen. Für die Versuche wurden Keratinozyten der zweiten und dritten Passage verwendet.

2.1.4 Chemikalien und Substanzen

Cell Proliferation Kit II (XTT), Boehringer Mannheim
Dispase-II-Lösung 2,4 U/ml, Boehringer Mannheim
Dulbecco's MEM/Nutrient Mix F12 (1:1) GibcoBRL, Life Technologies, Karlsruhe
Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM) GibcoBRL, Life Technologies, Karlsruhe
Dulbecco's phosphate buffered saline (PBS), Sigma, Taufkirchen
Fetales Kälberserum (FKS), Boehringer Mannheim
FGM-2 BulletKit, CellSystems, St. Katharinen
Hämatoxilin, Sigma, Taufkirchen
Histostain-Plus Kit, Fa. Zymed, San Francisco
Interleukin Assays, Coulter Immunotech, Hamburg
Jodlösung 0,1 N, Merck
KGM-2 BulletKit, CellSystems, St. Katharinen
Kristallviolett, Fluka, CH-Buchs
L-Glutamin, Sigma, Taufkirchen
Methylcellosolve®, Merck
Minimum Essential Medium Eagle (MEM), Sigma, Taufkirchen
Monoklonaler Fibroblasten-Antikörper (AS02), Dianova, Hamburg
Natriumhydrogencarbonat, Fluka, CH-Buchs
Natriumhydroxid, Fluka, CH-Buchs
Natriumthiosulfat 0,1 N, Merck
Penicillin/Streptomycin GibcoBRL, Life Technologies, Karlsruhe
Poly-D-Lysin, Schubert & Weiß, München
Pyrogallol Rot Total Protein Test Kit, BioRad, München
Stärkelösung, Merck
Triton X-100, t-Octylphenoxypolyethoxyethanol, Sigma, Taufkirchen
Trypanblau-Lösung (0,4%), Sigma, Deisenhofen
Trypsin-EDTA Lösung, Boehringer Mannheim

2.1.5 Geräte und Arbeitsmaterialien

Brutschrank, Heraeus, München

Einmalskalpelle, Braun, Melsungen

Eppendorf-Cups; 0,5-2 ml

Hämocytometer, Neubauer-Zählkammer

Inkubator Inco 2, Memmert, Schwabach

Laminarflow-Box, Ceag Schirp, Selm-Bork

Megafuge 1,0R, Heraeus Instruments, München

Mikrotiterplatten, Falcon®, BectonDickinson, Heidelberg

Mikrotiterplatten-Washer, EAW II SLT-Labinstruments, Austria

MRX ELISA Reader, Dynex Technologies, Denkendorf

Petrischalen, Falcon®, BectonDickinson, Heidelberg

Photometer DU 70, Beckmann,

Schüttler KS 250 basic, IKA Labortechnik,

Varioklav, H+P Labortechnik, Oberschleißheim

Vortex Genie 2, Scientific Industries

Wasserbad, GFL

Zeiss Mikroskop

Zellkulturflaschen, 25 und 75 cm², Falcon®, Primaria®, BectonDickinson, Heidelberg

Zentrifugentubes, 15 und 50 ml , Falcon®, BectonDickinson, Heidelberg

2.2 METHODEN

2.2.1 Gehaltsbestimmung von Schwefellost

100 µl Schwefellost wurden in einen Erlmeyerkolben eingewogen und in 12,5 ml Methylcellosolve[®] gelöst. Dazu wurden pro mg Schwefellost-Einwaage 0,15 ml 0,1 N Natriumthiosulfatlösung gegeben und ca. 15 min aufgekocht. Nach dem Abkühlen wurde mit 0,1 N Jodlösung gegen Stärke als Indikator bis zur Blaufärbung titriert.



Iodometrie:



Das überschüssige Natriumthiosulfat wurde mit Jodlösung zurück titriert. Dabei nicht umgesetztes elementares Jod bildete mit der Stärke (Indikator) durch Einlagerung eine tiefblau gefärbte Iod-Stärke-Einschlussverbindung, die das Ende der Titration anzeigte.

Berechnung:

$$\text{Schwefellostgehalt [\%]} = \frac{(a - b) \times 8,04^* \times 100}{\text{Schwefellost- Einwaage in mg}}$$

a = vorgelegte 0,1 N Natriumthiosulfatlösung in ml

b = Verbrauch an 0,1 N Jodlösung in ml

* = empirisch ermittelter Korrekturfaktor

Der Mittelwert aus vier Titrationen ergab einen Gehalt von $97,7 \pm 0,36$ % Schwefellost.

2.2.2 Herstellung der Schwefellost-Verdünnung

50 µl Schwefellost (8 M) wurden zunächst in 450 µl absolutem Ethanol gelöst. Aus dieser 0,8 molaren Lösung wurden dann durch Verdünnen unter gutem Schütteln die

entsprechenden Konzentrationen hergestellt. Zum Verdünnen wurde sterilfiltriertes Minimum Essential Medium (MEM), das laut Gebrauchsanweisung angesetzt wurde, verwendet.

2.2.3 Zellzahlbestimmung

Die Zellzahl wurde mit Hilfe eines Hämocytometers (Neubauer Zählkammer) bestimmt. Dazu wurde die Zellsuspension 1:1 mit Trypanblau-Lösung verdünnt, um die Lebendzellzahl zu ermitteln.

Der Farbstoff wird von lebenden Zellen aktiv ausgeschleust, sodass sich diese im Mikroskop farblos darstellen, während tote Zellen blau angefärbt werden.

2.2.4 Kultivierung von A 549-Zellen

Die Zellen der A 549-Linie wurden in Dulbecco's Modified Eagle Medium/Ham's F12 (DMEM/F12 = 1:1; Fa. Gibco, Eggenstein) unter Zusatz von 1 % Glutamin-Lösung (245 mM) und 10 % FKS bei 37°C mit 5 % CO₂ begast und wasserdampfgesättigt kultiviert. Die Zellen wurden in Kulturflaschen mit Kultivierungsflächen von 25 cm² und 75 cm² gezüchtet.

Zum Passagieren wurden die Zellen zunächst mit 2-3 ml angewärmter PBS-Lösung gewaschen und danach 2 ml Trypsin-EDTA-Lösung (0,05 % Trypsin und 0,02 % EDTA in PBS) zugegeben. Nach ca. 5 minütiger Inkubation im Brutschrank wurde das vollständige Ablösen der Zellen mikroskopisch kontrolliert. Es wurden zwischen 0,5 und 1 Mio. Zellen pro Kulturflasche ausgesät.

Die Zellen wurden zweimal pro Woche passagiert; dabei betrug die Split ratio zwischen 1:5 und 1:10.

2.2.5 Kultivierung von SCL II-Zellen

Die Zellen der SCL II-Linie wurden analog zu den A 549-Zellen in Dulbecco's Modified Eagle Medium/Ham's F12 (DMEM/F12 = 1:1; Fa. Gibco, Eggenstein) unter Zusatz

von 1 % Glutamin-Lösung (245 mM) und 10 % FKS bei 37°C mit 5 % CO₂ begast und wasserdampfgesättigt kultiviert. Das Passagieren erfolgte in gleicher Weise wie bei den A 549-Zellen.

2.2.6 Kultivierung von HaCaT-Zellen

Die Kulturbedingungen entsprachen denen der SCL II-Zellen, mit dem Unterschied, dass als Nährmedium Dulbecco`s Modified Eagle Medium mit 5 % FKS-Zusatz verwendet wurde. Die Zellen wurden ebenfalls zweimal pro Woche passagiert; bei einer Split ratio von 1:10.

2.2.7 Anlegen einer Keratinozyten-Primärkultur

Zur Züchtung einer Kultur von humanen Keratinozyten wurden Präparate von Zirkumzisionsoperationen verwendet. Die Präparation erfolgte leicht modifiziert in Anlehnung an Saffran et al. (1997). Die frische Vorhaut wurde mehrmals mit steriler Pufferlösung (PBS) gewaschen und unter sterilen Bedingungen bearbeitet. Zuerst erfolgte die Zerteilung des Gewebes in ca. 4 mm² große Stücke mittels Einmalskalpell in einer Petrischale.

Die Hautstückchen wurden in 2,5 ml Dispase-II-Lösung (2,4 U/ml) unter Zusatz von 25 µl Penicillin/Streptomycin (10.000 I.U./ml bzw. 10.000 µg/ml) über Nacht im Kühlschrank (4-8°C) inkubiert. Dabei kam es zur proteolytischen Separation des dermalen und epidermalen Gewebes entlang der Lamina densa (Werrlein et al., 1998). Am folgenden Tag wurde mit Hilfe steriler Pinzetten das Epithel abgelöst, mit steriler PBS gewaschen und in 6 ml Trypsin/EDTA-Lösung überführt. Die Disaggregation des Epithels erfolgte im Wasserbad bei 37°C unter gelegentlichem Aufschütteln. Die Zellsuspension wurde nochmals zentrifugiert (1000 Upm entsprechend 173 g) und mit 5 ml FKS gewaschen. Nach erneutem Zentrifugieren wurde das Zellpellet in Keratinocyte Growth Medium-2 (KGM-2) resuspendiert und jeweils zwischen 0,5 - 1*10⁶ Zellen in 15 ml KGM-2 in einer Kulturflasche mit 75 cm² Kulturfläche ausgesät und inkubiert. Nach 24 Stunden wurde das Medium gewechselt.

2.2.8 Kultivierung von Keratinozyten

Als Zellkulturmedium wurde Keratinocyte Growth Medium-2 (KGM-2) verwendet. Das Medium ist serumfrei und enthielt jeweils 0,1 % Epidermal Growth Factor, Insulin, Hydrocortison, Gentamicin/Amphotericin B (0,1 µg/ml), sowie 0,4 % Rinderhypophysenextrakt (BPE).

Die Zellen wurden sowohl in Kulturflaschen mit 25 cm² (Falcon®) als auch mit 75 cm² Kulturfläche (Falcon®, Primaria®) kultiviert, dabei wurden 5 bzw. 15 ml Medium zugegeben. Die Inkubation erfolgte im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO₂ wasserdampfgesättigt.

Passagiert wurde bei einer Zelldichte von ca. 80 %, wobei ca. 1 Million Zellen pro 75 cm² Kulturfläche ausgesät wurden.

Beim Passagieren wurde zunächst selektiv trypsinisiert (siehe folgenden Abschnitt) um die vereinzelt in der Kultur vorhandenen Fremdzellen, vor allem Fibroblasten, zu entfernen. Nach dem Trypsinieren wurden die Zellen mit FKS gewaschen (höhere Vitalität und bessere Anheftungsrate; Saffran et al., 1997) und zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in KGM-2 resuspendiert, die Zellzahl bestimmt und ausgesät.

Alle zwei Tage erfolgte ein Mediumwechsel; bei frischen Kulturen erfolgte vor dem Mediumwechsel ein selektives Trypsinieren.

2.2.9 Optimierung der Primärkultur durch Fibroblasteneliminierung

Zur Eliminierung vorhandener Fibroblasten aus den frisch angelegten Primärkulturen wurde zunächst die sog. EDTA-Trituration angewendet. Dazu wurden die Zellen mit 0,02 % EDTA in PBS für 10 min inkubiert und der Überstand, der vorwiegend Fibroblasten enthielt, abgesaugt und verworfen (Rheinwald und Green, 1975). Anschließend wurde den verbleibenden Zellen frisches Nährmedium zugesetzt und weiter kultiviert.

In der Literatur ebenfalls beschrieben ist das Verfahren der selektiven Trypsinierung (Owens et al., 1976). Hierfür wurden die Zellen zunächst mit 2 ml Trypsin kurzzeitig behandelt und der Überstand verworfen. Anschließend erfolgte das Passagieren der Zellen mit 4 ml Trypsin und längerer Inkubationszeit.

Beide Verfahren machen sich zu nutze, dass sich Fibroblasten schneller durch Trypsin vom Boden der Kulturflaschen ablösen als Keratinozyten. Durch eine kürzere Einwirkdauer des Trypsins auf die Zellen, können zunächst die Fibroblasten selektiv abgelöst und mit dem Überstand verworfen werden, während die Keratinozyten ihre Adhärenz am Flaschenboden weitgehend behalten.

Die selektive Trypsinierung wurde bis zum ersten Passagieren alle zwei Tage vor dem Mediumwechsel durchgeführt sowie unmittelbar vor dem Passagieren der Zellen.

2.2.10 Immunhistochemischer Nachweis von Fibroblasten

Aus Bindegewebe isolierte Fibroblasten wurden auf mit Poly-D-Lysin beschichteten Deckgläschen ausgesät und bis zu 70 %iger Konfluenz gezüchtet. Nach Fixierung der Zellen mit 4 % Paraformaldehyd-Lösung wurden die Zellen mit Peroxidase-Quenching-Lösung (Histostain-Plus Kit) behandelt, um vorhandene endogene Peroxidase zu deaktivieren und andere Störfaktoren mit „Serum Blocking Solution“ (Histostain-Plus Kit) eliminiert.

Die Fibroblasten wurden nun mit monoklonalen fibroblasten-spezifischen Antikörpern (AS02) markiert und durch einen Sekundärantikörper mittels Streptavidin-Peroxidase visualisiert. Anschließend wurden die Zellkerne mit Hämatoxylin gegengefärbt.

2.2.11 Klonogenizitätstest, zur Untersuchung des Proliferationsverhalten

Es wurden 600 Zellen pro Petrischale in 5 ml des entsprechenden Nährmediums ausgesät. 24 Stunden später wurden nach Absaugen des Nährmediums pro Petrischale 5 ml einer S-Lost-Lösung in den Konzentrationen 0; 0,1; 1; 10; 100 nM; 1; 10; 25; 50 und 100 µM bzw. bei den A 549-Zellen in den Konzentrationen 0; 0,1; 0,3; 1; 3; 10 und 30 µM zugegeben und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Exposition wurde die Schwefellost-haltige Lösung abgesaugt und pro Petrischale jeweils 5 ml Nährmedium zugegeben. Die Zellen wurden so lange im Brutschrank kultiviert, bis sich Klone gebildet hatten (ca. 7 - 10 Tage).

Das Medium wurde entfernt und die Petrischalen vorsichtig mit entmineralisiertem Wasser gewaschen. Anschließend wurden die Klone mit 0,25 %iger wässriger Kristallviolett-Lösung 5 min lang angefärbt. Überschüssige Kristallviolett-Lösung wurde abgesaugt, nochmals mit entmineralisiertem Wasser gewaschen und trocknen gelassen.

Das Auszählen der Kolonien erfolgte mit dem OP-Mikroskop (160-fache Vergrößerung). Ein Zellhaufen ≥ 50 Zellen wurde als Kolonie gewertet.

Zur Auswertung wurde die Anzahl gebildeter Kolonien bei den exponierten Kulturen mit der Anzahl derer bei den Kontrollkulturen verglichen.

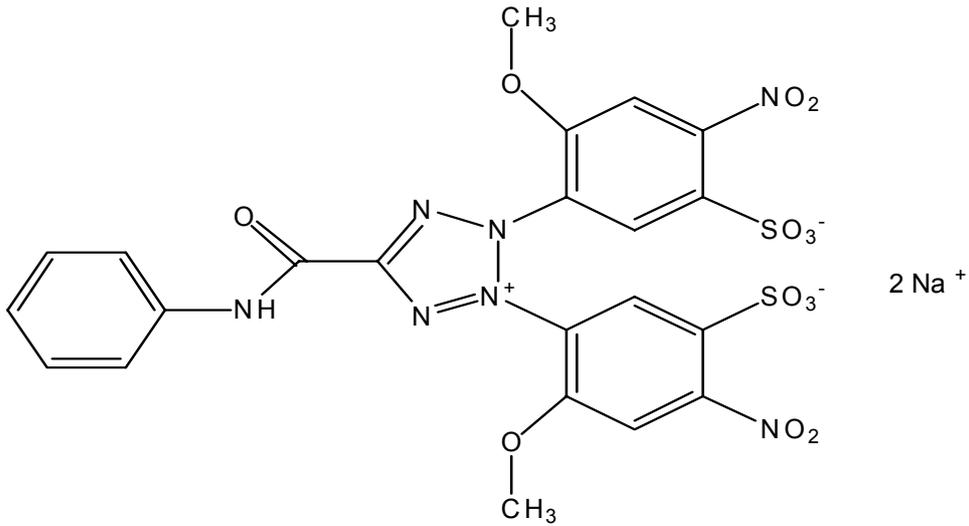
2.2.12 Vitalitätsprüfung mittels XTT-Test

Zur Messung der Vitalität wurde der XTT-Test herangezogen. In Mikrotiterplatten wurden 10.000 Zellen in 200 μ l Nährmedium pro well ausgesät. 24 Stunden später wurde das Medium abgesaugt und jeweils 100 μ l MEM mit S-List-Konzentrationen von 0, 1, 10, 100, 250, 500 oder 1000 μ M zugegeben. Die Zellen wurden 30 Minuten inkubiert und danach das Medium gewechselt. Pro well wurden anschließend 100 μ l Nährmedium zugefügt.

24, 48 und 72 h nach der Exposition wurden pro well 50 μ l XTT-Mischung zugegeben und 4 h lang bei 37°C wasserdampfgesättigt inkubiert.

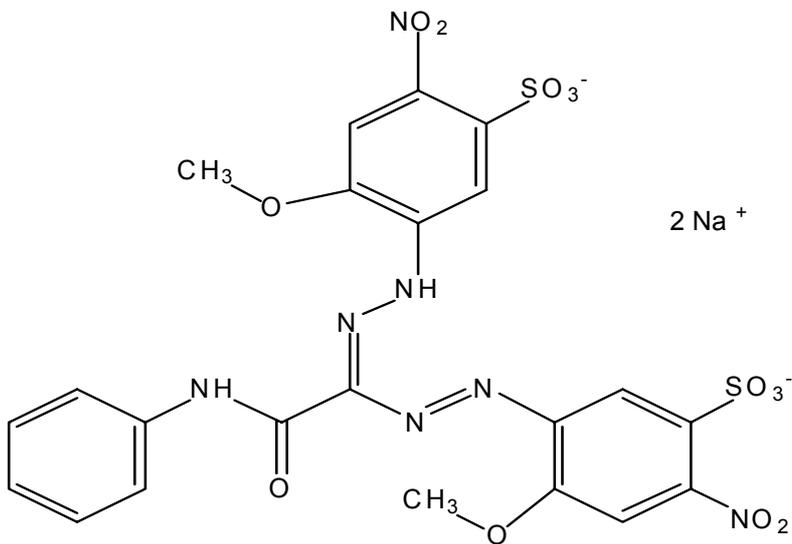
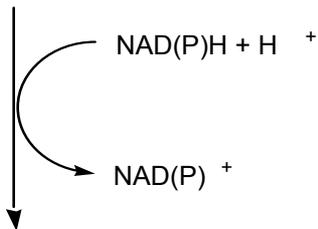
Das gelbe Tetrazolium-Salz XTT (Natrium 3'-[1-(phenylaminocarbonyl)-3,4-tetrazolium]-bis(4-methoxy-6-nitro) benzolsulfonsäure) wird durch metabolisch aktive Zellen in ein orange farbiges wasserlösliches Formazan umgewandelt (vgl. Abb. 7). Nach der Inkubationszeit bildet sich das orange Formazan, dessen Farbintensität zur Menge lebender Zellen (Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenasen) korreliert (Mosmann, 1983; Scudiero et al., 1988; Weislow et al., 1989).

Die spektralphotometrische Quantifizierung erfolgte mittels ELISA-Reader bei $\lambda = 450$ nm und einer Referenzwellenlänge von $\lambda = 630$ nm.



XTT

(Natrium 3'-[1-(phenylaminocarbonyl)-3,4-tetrazolium]-bis(4-methoxy-6-nitro) benzolsulfonsäure) (transparent)



Formazan (orange)

Abb. 7: Reaktionsgleichung des XTT-Tests: Reduktion des farblosen XTT mit $\text{NAD(P)H} + \text{H}^+$ in den Mitochondrien durch mitochondriale Dehydrogenasen zu dem löslichen, orangen Farbstoff Formazan. Die Quantifizierung der Formazanbildung erfolgte in einem Mikrotiterplattenlesegerät.

2.2.13 Versuchsanordnung beim Zytokin-Versuch

Die Zellen wurden in 75 cm² Kulturflaschen ausgesät und in dem entsprechenden Nährmedium kultiviert. Kurz vor Erreichen der Konfluenz des Zellrasens wurde das Medium gewechselt und 24 h später die Zellen mit 20 ml 500 µM Schwefellost-Lösung inkubiert. Die Kontrollkulturen wurden mit 20 ml MEM inkubiert. Nach einer Expositionszeit von 30 Minuten bei Raumtemperatur wurde das Medium durch 20 ml frisches Nährmedium ersetzt und 8 Stunden lang jeweils stündlich eine Probe aus dem Überstand entnommen. Die Proben wurden sofort nach Entnahme bei -20°C tiefgefroren. Um die Zellmenge pro Kulturflasche zu ermitteln und für die Berechnung der Zytokin-Ausschüttung, erfolgte im Anschluss an die letzte Probenziehung für den Zytokin-Versuch eine Proteinbestimmung.

2.2.14 Proteinbestimmung

Nachdem die letzte Probe für die Zytokin-Messung entnommen wurde, wurde das verbleibende Nährmedium abgesaugt und verworfen. Es wurden pro Kulturflasche 2 ml 0,5 N Natronlauge zugesetzt und der Zellrasen über Nacht bei 37°C lysiert.

Nach gutem Durchmischen der Proteinlösung erfolgte die Proteinbestimmung mit dem Pyrogallol Rot Total Protein Test Kit der Firma BioRad gemäß Gebrauchsanleitung. Der Test beruht auf der Bindung von Proteinmolekülen an den Farbstoff Pyrogallol-Rot im sauren Milieu. Bei der photometrischen Messung ist die Absorptionsänderung proportional zur Protein-Konzentration. Der Test ist bis zu einer Konzentration von 2 mg Protein pro ml linear.

Die photometrische Messung erfolgte bei einer Wellenlänge von $\lambda = 600$ nm.

Die Proteinkonzentration in der Probe wurde als Maß für die Zellzahl verwendet und diente als Berechnungsgrundlage zur Normierung der Zytokinkonzentration.

2.2.15 ELISA zur Bestimmung von Zytokinen

Die Bestimmung von IL-1, IL-6, IL-8 und TNF- α erfolgte in den Zellkulturüberständen mittels ELISA-Technik (enzyme-linked immuno sorbent assay).

Es wurde mit Testkits der Fa. Coulter-Immunotech gearbeitet.

Hierbei handelt es sich jeweils um einen Sandwich-ELISA, bei dem die Mikrotiterplatte bereits mit dem ersten monoklonalen Antikörper gegen das betreffende Zytokin beschichtet ist. Nach Inkubation von Proben bzw. Standards und nachfolgendem Waschen wurde ein zweiter monoklonaler Anti-Interleukin-Antikörper zugegeben. Dieser Antikörper ist mit Acetylcholinesterase konjugiert. Nach der Inkubation und erneutem Waschen wurde die verbleibende Enzymaktivität anhand der Umsetzung des chromogenen Substrates Acetylthiocholin und Natriumdithionitbenzoat bestimmt. Die Farbintensität ist proportional zur Zytokin-Konzentration in der Probe.

Die Durchführung der Tests erfolgte nach Herstelleranweisung mit den frisch aufgetauten, raumtemperierten Proben aus den Kulturüberständen der exponierten Zellkulturen, die bei - 20°C aliquotiert gelagert waren.

Die durch die Zytokinbestimmung ermittelte Zytokin-Konzentration der einzelnen Kulturflaschen wurden auf die Protein-Konzentration der jeweiligen Kulturflasche bezogen. Die Ergebnisse konnten so in pg Zytokin pro mg Protein ausgedrückt und miteinander verglichen werden.

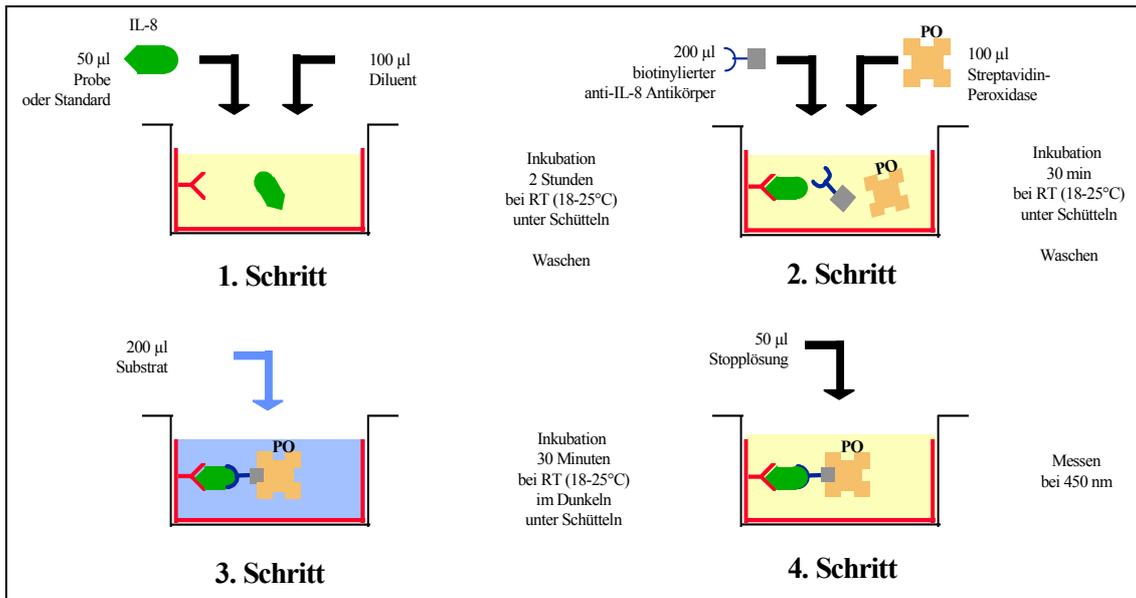


Abb. 8: Reaktionsprinzip der quantitativen Bestimmung von Zytokinen: Hier exemplarisch dargestellt der ELISA zur Interleukin 8-Bestimmung. IL-8-Antikörper, IL-8, biotinylierter anti-IL-8-Antikörper, Streptavidin-Peroxidase

2.2.16 Statistik

Die Zytokinkonzentration der Proben wurde auf den Proteingehalt pro Kulturflasche normiert und gegen die Zeit bzw. die Schwefellost-Konzentration aufgetragen. Die statistische Signifikanz wurde mittels 2-faktorieller ANOVA bestimmt, wobei die Signifikanz mit $p < 0,05$ definiert wurde. Alternativ wurde die Signifikanz aus den experimentell ermittelten Gruppen mit dem t-Test errechnet und nach Bonferroni-Holm korrigiert (Forst, 1985).

Die Berechnungen wurden mittels GraphPadPrism 3.0 (GraphPad Software Inc., San Diego CA, USA) für Windows 98 durchgeführt.

3 ERGEBNISSE

3.1 OPTIMIERUNG DER KERATINOZYTEN-KULTIVIERUNG

Es gelang auf Basis des Isolierungsprotokolls für Keratinozyten aus der Schleimhaut des oberen Aerodigestivtraktes (Saffran et al. 1997) Keratinozyten aus Vorhaut zu isolieren und zu kultivieren.

Beim Dispase-Verdau zeigte sich, dass der Zerteilungsgrad der eingesetzten Hautstücke von Bedeutung ist. Als optimal erwies sich eine Größe von ca. 4 mm². Bei Stücken dieser Größe ließ sich das Epithel als Ganzes von den darunter liegenden Schichten abziehen. Größere Stücke hatten den Nachteil, dass sich nach der Dispase-Inkubation zwar die Ränder ablösen ließen, im mittleren Bereich die proteolytische Separation jedoch noch nicht abgeschlossen war. Es konnte bestätigt werden, dass die für die Dispase-Inkubation von Saffran et al. (1997) angegebenen Bedingungen, 12 Stunden bei einer Temperatur von 4°C, ideal sind.

Durch das zweimalige Waschen der Zellen mit fötalem Kälberserum nach jeder Trypsin-Behandlung (Saffran et al., 1997) konnte erreicht werden, dass die Keratinozyten schon nach ca. 5 Stunden eine Adhärenz von über 50 % aufwiesen, bei gleichzeitig sehr hoher Vitalität (>80 %).

Die in Passage 0 vereinzelt enthaltenen Fibroblasten konnten mittels selektiver Trypsinierung (Owens et al., 1976; Rheinwald und Green, 1975) quantitativ entfernt werden. Die Fibroblastenfreiheit der primären Keratinozyten-Kultur wurde mit einem Fibroblasten-spezifischen Antikörper (AS02) überprüft.

Wie in der Abbildung 9 zu sehen, sind die Fibroblasten rot gefärbt und heben sich deutlich von den vorhandenen Keratinozyten (schwach bläulich mit blauen Zellkernen) ab.

Eine reine Keratinozyten-Kultur, wie sie für die Versuche verwendet wurde, ist in der Abbildung 10 zu sehen.

Da die Keratinozyten ab Passage 4 deutliche morphologische Veränderungen im Sinne eines Alterungsprozesses zeigten, wurden für die nachfolgend beschriebenen Versuche nur Keratinozyten der zweiten und dritten Passage verwendet.

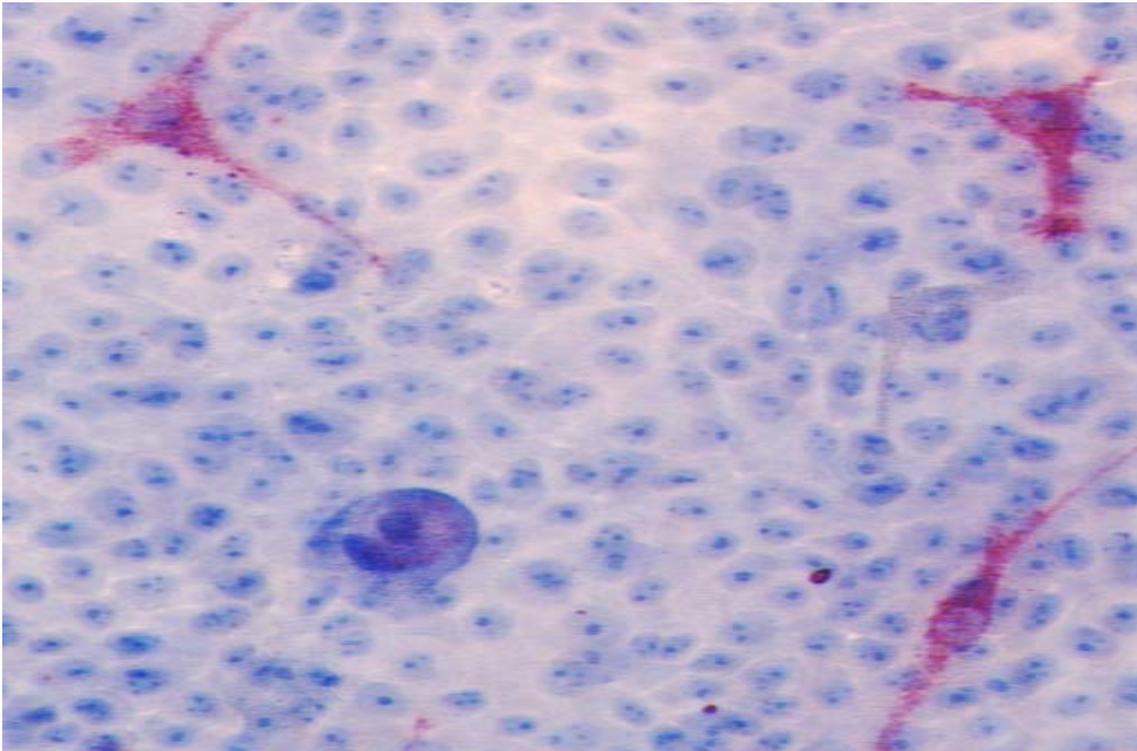


Abb. 9: Fibroblasten-haltige Keratinozyten-Kultur: Neben den bläulich angefärbten Keratinozyten sind mittels spezifischen Antikörpern markierte Fibroblasten erkennbar. Diese heben sich durch ihre Rotfärbung deutlich von den Keratinozyten ab.

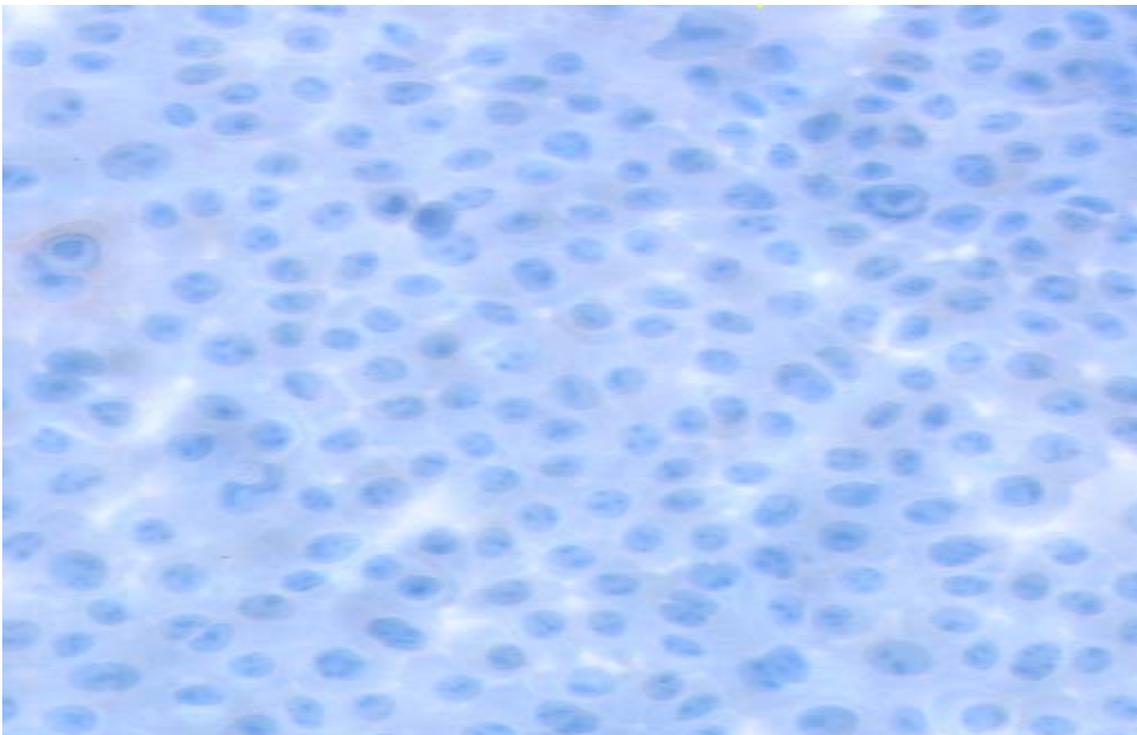


Abb. 10: Reine Keratinozyten-Kultur: Die Keratinozyten wurden mit Hämatoxilin angefärbt.

3.2 WIRKUNG VON SCHWEFELLOST AUF DIE KLONOGENIZITÄT VERSCHIEDENER KULTIVIERTER ZELLEN

Bei A 549-Zellkulturen konnte ein Rückgang der Koloniebildung nach Exposition gegenüber Schwefellost bei Konzentrationen größer 1 μM beobachtet werden. Mit zunehmender Dosis verringerte sich die Anzahl der Kolonien stetig, sodass bei einer Konzentration von 3 μM Schwefellost ca. 14 % und bei einer Konzentration von 30 μM Schwefellost ca. 80 % weniger Kolonien feststellbar waren als bei der Kontrollgruppe (vgl. Abb. 11).

SCL II-, HaCaT- und Keratinozyten-Kulturen wurden schon von Schwefellost-Konzentrationen ab 0,1 μM in ihrem Proliferationsverhalten empfindlich gestört (Rückgang der Koloniebildung im Vergleich zu den Kontrollkulturen um etwa 20-30 % (vgl. Abb. 12–14). Die Schwefellost-Exposition in einer Konzentration von 100 μM führte bei allen Zelllinien dazu, dass die Zellteilung so stark gehemmt wurde, dass keine Koloniebildung mehr feststellbar war.

Im Vergleich zeigte sich, dass die Koloniebildung der A 549-Zellen bei einer Konzentration von ca. 13 μM Schwefellost um 50 % gegenüber den Kontrollkulturen reduziert wurde, während dies bei den epidermalen Zelllinien bereits bei S-Lost-Konzentrationen unter 2 μM S-Lost zu beobachten war. Hierbei waren die HaCaT-Zellen die in ihrer Proliferation am stärksten beeinträchtigten Zellen, gefolgt von den Keratinozyten und schließlich den SCL II-Zellen.

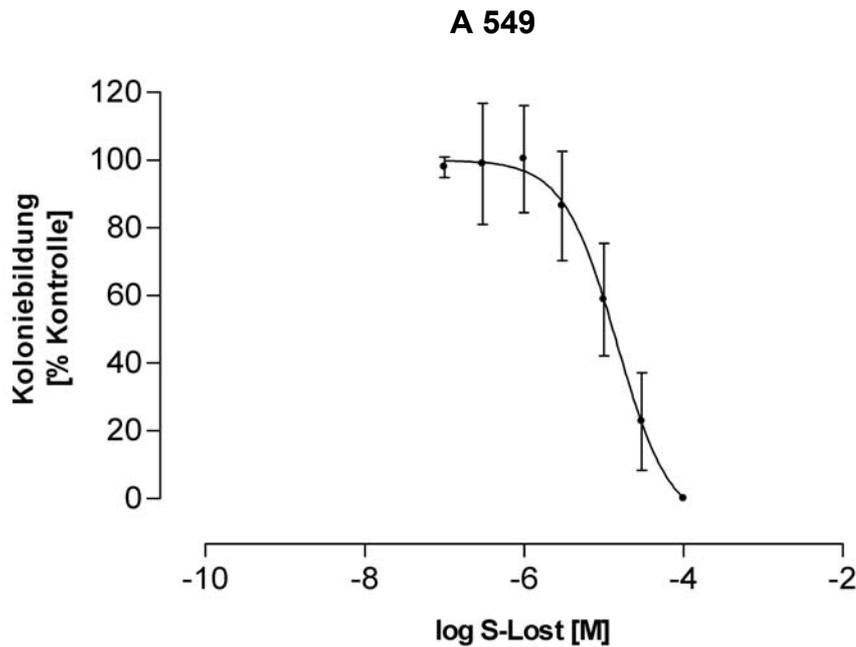


Abb. 11: Koloniebildung bei Kulturen von A 549-Zellen nach Inkubation mit Schwefellost: Die Zellen wurden für 30 min mit Schwefellostlösung verschiedener Konzentration inkubiert und nach einem Mediumwechsel 7-10 Tage weiter kultiviert. Dargestellt ist die Anzahl gebildeter Kolonien im Verhältnis zur Anzahl derer bei den Kontrollkulturen, (n = 6).

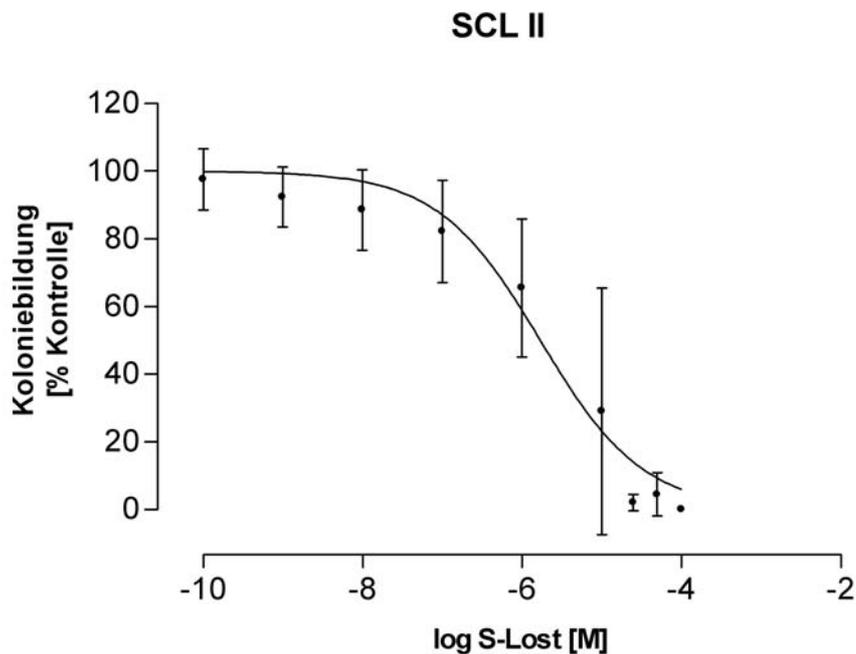


Abb. 12: Koloniebildung bei Kulturen von SCL II-Zellen nach Inkubation mit Schwefellost: Die Zellen wurden für 30 min mit Schwefellostlösung verschiedener Konzentration inkubiert und nach einem Mediumwechsel 7-10 Tage weiter kultiviert. Dargestellt ist die Anzahl gebildeter Kolonien im Verhältnis zur Anzahl derer bei den Kontrollkulturen, (n ≥ 6).

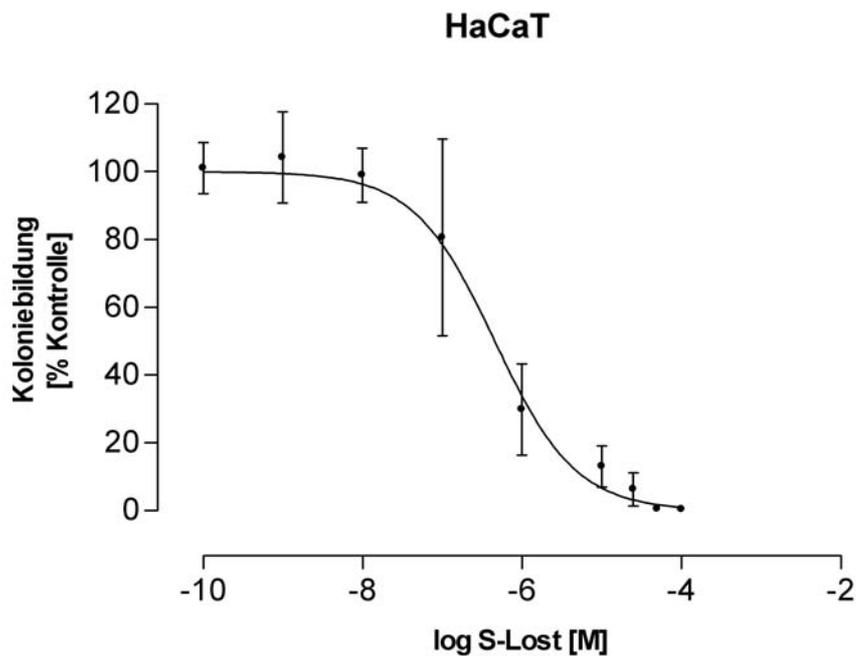


Abb. 13: Koloniebildung bei Kulturen von HaCaT-Zellen nach Inkubation mit Schwefellost: Die Zellen wurden für 30 min mit Schwefellostlösung verschiedener Konzentration inkubiert und nach einem Mediumwechsel 7-10 Tage weiter kultiviert. Dargestellt ist die Anzahl gebildeter Kolonien im Verhältnis zur Anzahl derer bei den Kontrollkulturen, ($n \geq 6$).

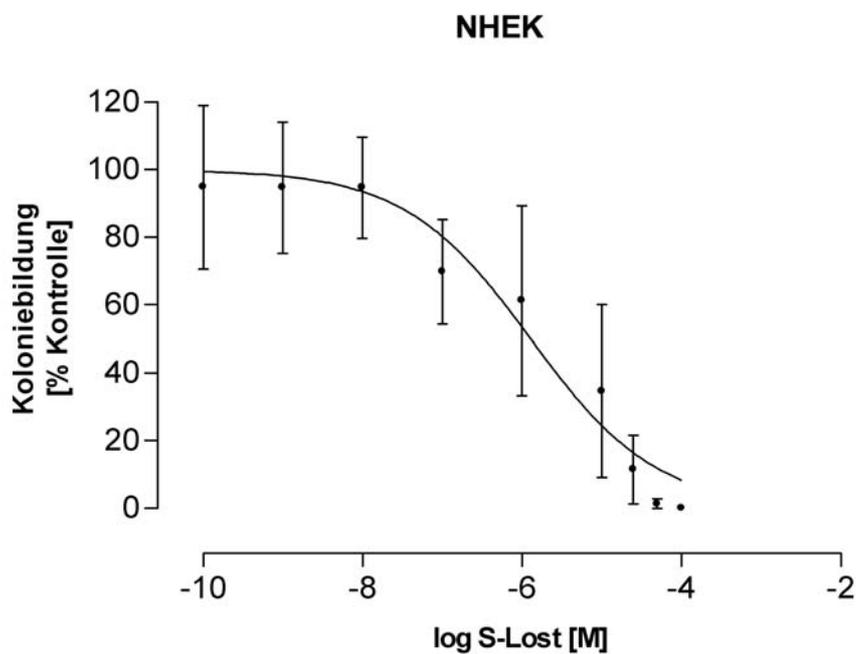


Abb. 14: Koloniebildung bei Kulturen von Keratinozyten nach Inkubation mit Schwefellost: Die Zellen wurden für 30 min mit Schwefellostlösung verschiedener Konzentration inkubiert und nach einem Mediumwechsel 7-10 Tage weiter kultiviert. Dargestellt ist die Anzahl gebildeter Kolonien im Verhältnis zur Anzahl derer bei den Kontrollkulturen, ($n \geq 6$).

3.3 WIRKUNG VON SCHWEFELLOST AUF DIE VITALITÄT VERSCHIEDENER KULTIVIERTER ZELLEN (XTT-TEST)

Bei allen mit Schwefellost inkubierten Zellkulturen konnte konzentrations- und zeitabhängig eine Abnahme der Formazanproduktion (Vitalität) beobachtet werden. Dabei konnte bei allen Zelllinien zwischen den 24-Stunden-Werten und den 48-Stunden-Werten eine größere Abnahme der Formazanproduktion beobachtet werden, als zwischen den 48- und 72-Stunden-Werten.

In A 549-Zellen wurden 24 Stunden nach Inkubation mit einer Schwefellost-Konzentration von 1000 μM 35 % , nach 48 Stunden 55 % und nach 72 Stunden 60 % weniger Formazan als in scheinbehandelten Kontrollzellen produziert. Auffällig bei den A 549-Zellen war, dass es erst ab einer Konzentration von über 500 μM zu einer deutlichen Verminderung der Formazanproduktion 48 bzw. 72 Stunden nach Exposition gegenüber dem 24 h-Wert kam. In niedrigeren Konzentrationsbereichen unterschieden sich die zu den verschiedenen Zeiten gemessenen Vitalitätsverläufe kaum voneinander (Abb. 15).

Bei den SCL II-Zellen nahm die Formazanproduktion nach 24 Stunden innerhalb des untersuchten Konzentrationsbereiches um nur knapp 30 % der Kontrolle ab, während sie nach 48 Stunden bereits um mehr als 80 % der Kontrolle abnahm. Im Bereich zwischen 10 und 500 μM kam es zu einer linearen Abnahme der Formazanproduktion, die nach 72 Stunden noch größer ausfiel. Hier sank die Formazanproduktion von 92 % der Kontrolle nach Einwirkung von 10 μM S-Lost, auf 27,7 % der Kontrolle nach einer Dosis von 100 μM Schwefellost und fiel dann bei einer Expositions-Konzentration von 1000 μM auf eine Formazanproduktion von ca. 6 % der Kontrolle ab (Abb. 16).

Die HaCaT-Zellen zeigten bereits 24 Stunden nach der 1000 μM -Exposition eine Verminderung der Formazanproduktion von über 80 %, wobei Konzentrationen unter 100 μM scheinbar noch keinen allzu großen Einfluss auf die Formazanproduktion hatten. Dieser zeigte sich erst nach 48 Stunden, hier betrug der Unterschied in der Formazanproduktion zwischen der 10- und 100- μM -Exposition bereits mehr als 20 %. Noch gravierender zeigte sich der Effekt der Schwefellost-Exposition nach 72 Stunden. Während Konzentrationen zwischen 1 und 10 μM bereits zu einer Verminderung der Formazanproduktion von 10 % der Kontrolle führten, waren es bei 100 μM schon 45 %. Nach der Exposition gegenüber der höchsten untersuchten Konzentration konnte keinerlei Formazanproduktion (metabolische Aktivität) mehr nachgewiesen werden (Abb. 17).

Bei den Keratinozyten (Abb. 18) verlief die Konzentrations-Wirkungs-Kurve 24 Stunden nach der Schwefellost-Exposition genau wie bei den A 549-Zellen. Bei einer Konzentration von 1000 μM wurde die Formazanproduktion um 35 % gegenüber der Kontrolle vermindert.

Die Messungen nach 48 und 72 Stunden ergaben, dass die Vitalität der Keratinozyten bereits ab einer Konzentration von 1 μM Schwefellost beeinträchtigt wurde und mit steigender Konzentration weiter abnahm. Bei einer Konzentration von 1000 μM Schwefellost waren 48 Stunden nach der Exposition nur noch ein Fünftel der Zellen metabolisch aktiv, während nach 72 Stunden nur noch 6 % der Formazanproduktion der Kontrollkulturen erreicht wurden.

Der Vergleich der Zelllinien ergab, dass die Vitalität der A 549-Zellen im untersuchten Konzentrationsbereich durch Schwefellost am wenigsten beeinträchtigt wurde. Bei den HaCaT-Zellen konnte im untersuchten Konzentrationsbereich bereits am ersten Tag nach der Exposition (24-Stunden-Wert) ein massiver Vitalitätsverlust beobachtet werden. Bei den 48- und 72-Stunden-Werten war die Schwefellost-Konzentration, bei der nur noch die Hälfte der metabolischen Aktivität (im Vergleich zur Aktivität der Kontrollen) feststellbar war, bei HaCaT-Zellen und Keratinozyten, annähernd gleich.

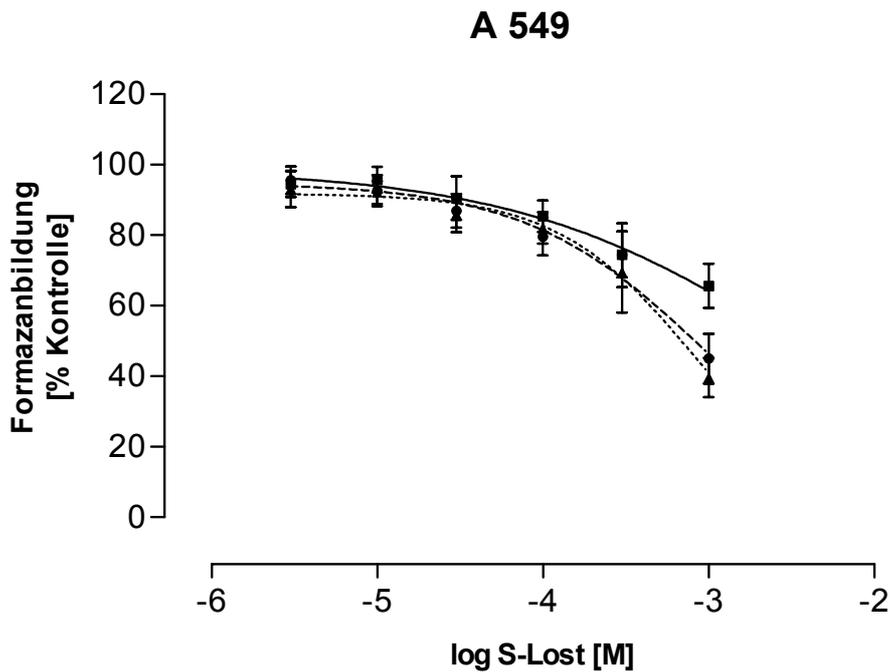


Abb. 15: Wirkung von Schwefellost auf die Vitalität von A 549-Zellen: Die Zellen wurden für 30 min mit Schwefellostlösung verschiedener Konzentration inkubiert. Nach Mediumwechsel wurden die Zellen 24, 48 und 72 Stunden ohne Schwefellost inkubiert und anschließend die Vitalität mit dem XTT-Test photometrisch bestimmt (■ = 24 h Werte, ● = 48 h Werte, ▲ = 72 h Werte; n = 24).

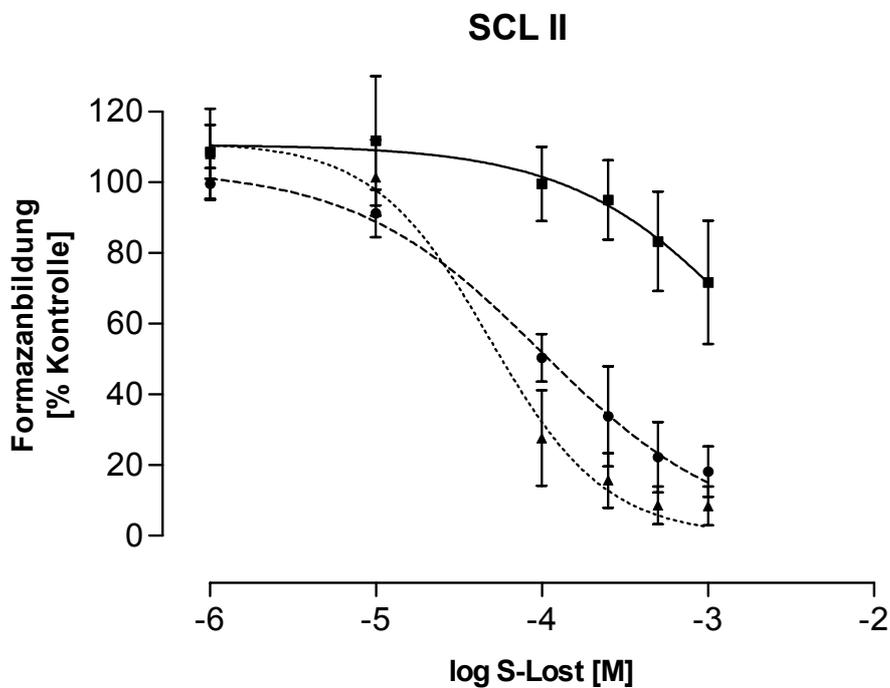


Abb. 16: Wirkung von Schwefellost auf die Vitalität von SCL II-Zellen: Die Zellen wurden für 30 min mit Schwefellostlösung verschiedener Konzentration inkubiert. Nach Mediumwechsel wurden die Zellen 24, 48 und 72 Stunden ohne Schwefellost inkubiert und anschließend die Vitalität mit dem XTT-Test photometrisch bestimmt (■ = 24 h Werte, ● = 48 h Werte, ▲ = 72 h Werte; n = 18).

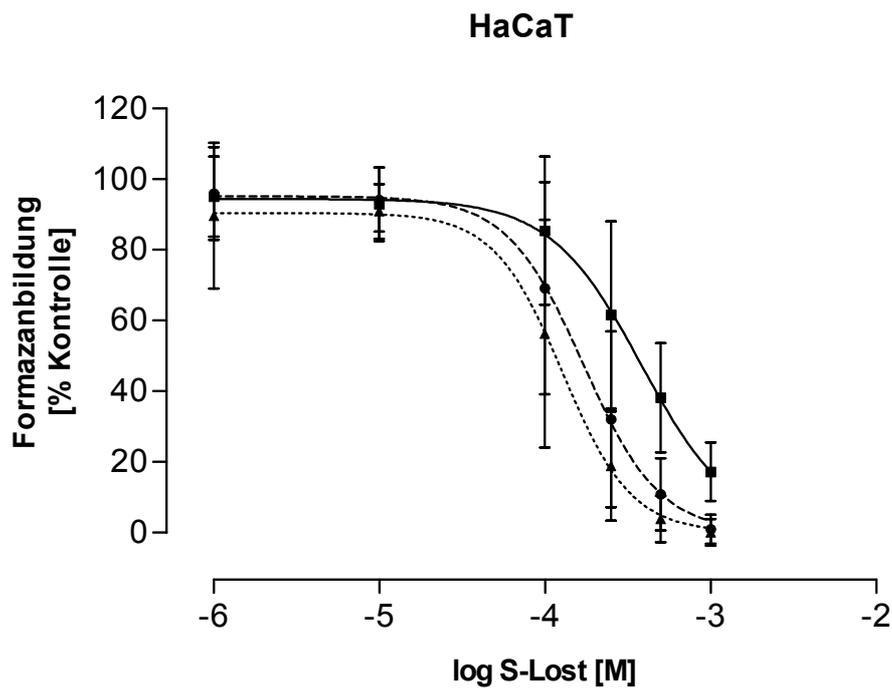


Abb. 17: Wirkung von Schwefellost auf die Vitalität von HaCaT-Zellen: Die Zellen wurden für 30 min mit Schwefellostlösung verschiedener Konzentration inkubiert. Nach Mediumwechsel wurden die Zellen 24, 48 und 72 Stunden ohne Schwefellost inkubiert und anschließend die Vitalität mit dem XTT-Test photometrisch bestimmt (■ = 24 h Werte, ● = 48 h Werte, ▲ = 72 h Werte; n = 24).

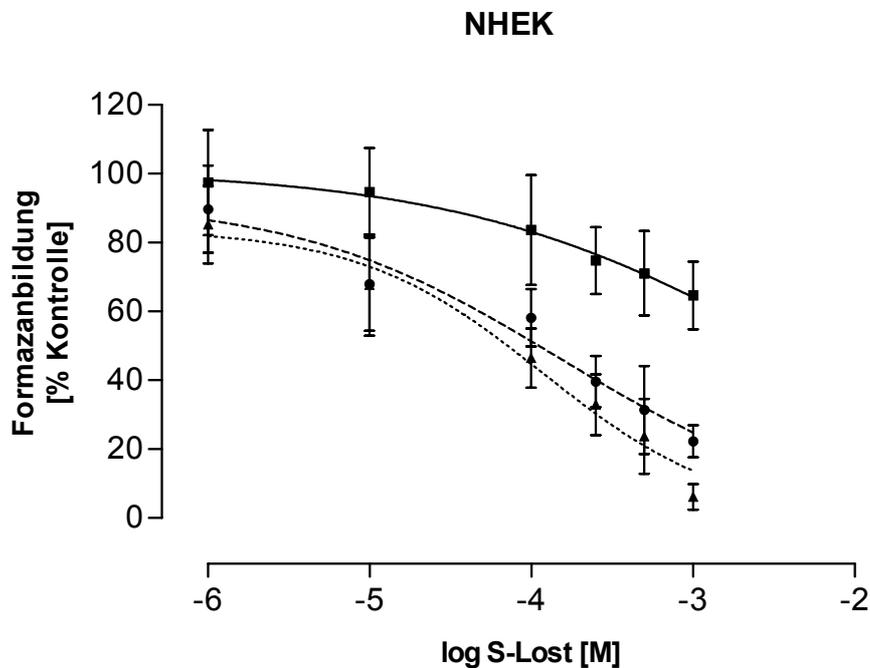


Abb. 18: Wirkung von Schwefellost auf die Vitalität von Keratinozyten: Die Zellen wurden für 30 min mit Schwefellostlösung verschiedener Konzentration inkubiert. Nach Mediumwechsel wurden die Zellen 24, 48 und 72 Stunden ohne Schwefellost inkubiert und anschließend die Vitalität mit dem XTT-Test photometrisch bestimmt (■ = 24 h Werte, ● = 48 h Werte, ▲ = 72 h Werte; n = 12).

3.4 WIRKUNG VON SCHWEFELLOST AUF DEN ZYTOKINGEHALT IM ÜBERSTAND VERSCHIEDENER KULTIVIERTER ZELLEN

In der Tabelle 1 sind die Zytokin-Konzentrationen, die in den Kontrollkulturen und den exponierten Kulturen der verschiedenen Zelllinien am Ende des Gesamtmessintervalls (8 bzw. 6 Stunden) gemessen wurden, zusammengefasst. Man erkennt, dass es nach Schwefellost-Einwirkung bei SCL II-, HaCaT-Zellen und Keratinozyten zu einer Erhöhung der TNF- α -Konzentration im Überstand kam. Außerdem lag die TNF- α -Konzentration in den Kontrollkulturen von HaCaT-Zellen und Keratinozyten im gleichen Bereich.

Betrachtet man die durch Schwefellost hervorgerufene Konzentrationsänderung von IL-1 α im Zellkulturüberstand, so erkennt man, dass es nur bei HaCaT-Zellen und Keratinozyten zu einer Erhöhung der Zytokinkonzentration nach der Exposition kam, welche jedoch nur bei den HaCaT-Zellen hoch signifikant ($p < 0,01$) war. Auffällig bei den Keratinozyten war die hohe IL-1 α -Konzentration in den Kontrollkulturen.

Die Interleukin 6 Konzentration änderte sich bei allen vier Zelllinien nach Schwefellost-Exposition signifikant. Hierbei wurden bei den HaCaT-Zellen die Werte, die 6 Stunden nach Exposition gemessen wurden angegeben, da die 7- und 8-Stundenwerte außerhalb des Messbereiches (also noch höher) lagen und nicht dargestellt werden konnten.

Beim Vergleich der einzelnen Zelllinien untereinander, ist erkennbar, dass die IL-6-Konzentration in den Kontrollkulturen von A 549-, HaCaT-Zellen und Keratinozyten in einem ähnlichen Konzentrationsbereich lag.

Bei allen untersuchten Zelllinien kam es im Vergleich zu den Kontrollkulturen zu einer signifikanten Erhöhung der IL-8-Konzentration nach Schwefellost-Exposition (Abb. 38).

In der Gesamtbetrachtung der Ergebnisse zeigt sich, dass es bei HaCaT-Zellen sowie bei den Keratinozyten durch Schwefellost-Einwirkung zu einer Konzentrationserhöhung bei allen vier untersuchten Zytokinen kam. Signifikante Konzentrationssteigerungen bei den SCL II-Zellen ließen sich außer bei IL-1 α , bei allen anderen Zytokinen beobachten, während die A 549-Zellen nur bei den Interleukinen 6 und 8 nach Schwefellost-Exposition im Zellkulturüberstand einen signifikanten Anstieg aufwiesen.

A 549

Zytokin	Kontrolle	500 μ M SL	SL/Ko
IL-1 α	0,18 \pm 0,40	0,00 \pm 0,00	0,00
IL-6	37,10 \pm 15,76	164,46 \pm 75,46	4,43
IL-8	355,74 \pm 244,93	748,24 \pm 51,02	2,10
TNF- α	0,13 \pm 0,40	0,07 \pm 0,16	0,54

SCL II

Zytokin	Kontrolle	500 μ M SL	SL/Ko
IL-1 α	1,23 \pm 2,11	0,00 \pm 0,00	0,00
IL-6	11,63 \pm 2,28	34,40 \pm 7,29	2,96
IL-8	139,81 \pm 59,88	490,48 \pm 43,37	3,51
TNF- α	0,38 \pm 0,79	1,53 \pm 2,62	4,03

HaCaT

Zytokin	Kontrolle	500 μ M SL	SL/Ko
IL-1 α	0,98 \pm 1,47	60,67 \pm 34,44	61,91
IL-6	33,00 \pm 10,44*	1600,20 \pm 82,69*	48,49
IL-8	261,54 \pm 84,74	732,66 \pm 268,22	2,80
TNF- α	3,79 \pm 3,46	88,27 \pm 29,92	23,29

NHEK

Zytokin	Kontrolle	500 μ M SL	SL/Ko
IL-1 α	15,27 \pm 10,70	48,89 \pm 56,82	3,20
IL-6	41,44 \pm 84,31	540,80 \pm 204,90	13,05
IL-8	110,30 \pm 144,06	1890,50 \pm 592,14	17,14
TNF- α	3,58 \pm 9,23	11,80 \pm 6,07	3,30

Tab. 1: Zytokin-Konzentrationen im Überstand von Schwefellost-exponierten und nicht-exponierten Zellen: Dargestellt ist die mittlere Zytokinkonzentration in pg pro mg Protein \pm SD, die 8 Stunden nach halbstündiger Exposition ohne (Kontrolle) bzw. mit 500 μ M Schwefellost (SL) im Zellkulturüberstand gemessen wurde. Gezeigt sind die Daten von vier Zelllinien. SL/Ko stellt den Quotienten aus der Zytokinkonzentration im Überstand von exponierten und nicht-exponierten Zellkulturen dar.

* Zytokin-Konzentration, die 6 h nach Schwefellost-Exposition gemessen wurde.

3.4.1 Wirkung von Schwefellost auf die Konzentration von TNF- α im Überstand verschiedener kultivierter Zellen

Unbehandelte A 549-Zellen produzierten kaum TNF- α (unter 0,4 pg/mg Protein, Abb. 19). Die Exposition mit Schwefellost führte zu keiner signifikanten Konzentrationserhöhung bei diesem Zytokin.

Nach Schwefellost-Exposition war bei SCL II-Zellen eine nicht signifikante Steigerung der TNF- α - Konzentration im Überstand zu beobachten, die ab der fünften Stunde konstant 1,5 pg pro mg Protein betrug (Abb. 20).

Sowohl bei HaCaT-Zellen als auch bei Keratinozyten war eine signifikante Konzentrationserhöhung von TNF- α nach Schwefellost-Exposition nachweisbar. Dabei zeigte sich bei den HaCaT-Zellen ein signifikanter Anstieg schon ab der dritten Stunde nach Exposition und erreichte das mehr als 23-fache der Kontrollgruppe 7 und 8 Stunden nach der Exposition. Ab der sechsten Stunde waren zwischen 85 und 90 pg/mg Protein im Zellkulturüberstand nachweisbar (Abb. 21).

Bei den Keratinozyten war ein Zytokinanstieg nach Schwefellost-Exposition messbar. Während die Basiskonzentration ab der fünften Stunde bei ca. 3 pg/mg Protein lag, zeigten sich bei den mit Schwefellost exponierten Kulturen vierfach höhere Konzentrationen, jedoch erreichte der Unterschied keine statistische Signifikanz zur Kontrolle ($p > 0,05$) (Abb. 22).

Der Vergleich von HaCaT-Zellen und Keratinozyten zeigt, dass beide Zelllinien eine ähnlich hohe Basiskonzentration aufwiesen. Die Einwirkung von Schwefellost führte bei den HaCaT-Zellen jedoch zu einer 7-mal höheren Endkonzentration als bei den Keratinozyten (Abb. 23).

A 549

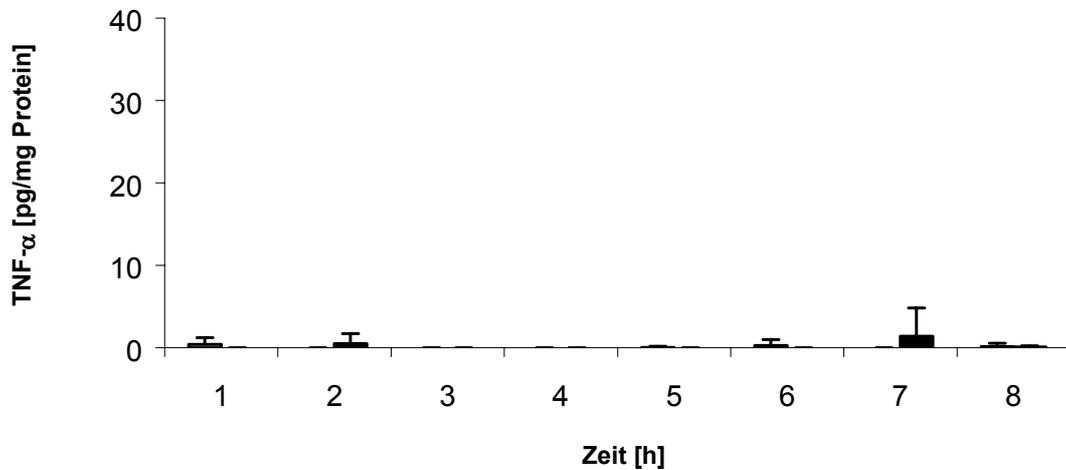


Abb. 19: TNF- α -Konzentration nach Schwefellost-Exposition im Kulturüberstand von A 549-Zellen: Die Zellen wurden für 30 min mit 500 μ M Schwefellost inkubiert. Danach wurde das Medium gewechselt und die Zellen ohne Schwefellost weitere 8 Stunden inkubiert. Es wurden stündlich Proben aus dem Überstand entnommen und die TNF- α -Konzentration mittels ELISA bestimmt. Darstellung des Mittelwertes der Zytokinkonzentration \pm SD in pg pro mg Protein. Graue Säulen: Kontrolle, schwarze Säulen: 500 μ M Schwefellost, ($n \geq 6$), * $p < 0,05$.

SCL II

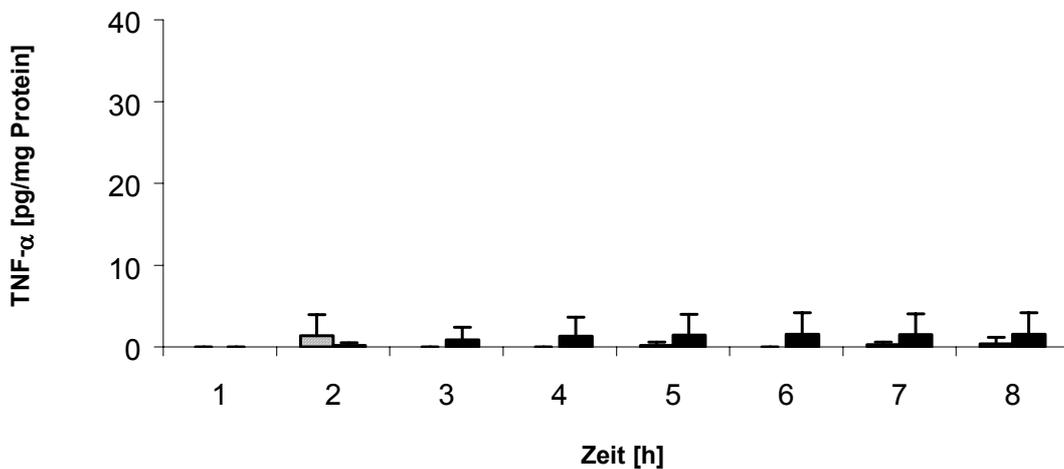


Abb. 20: TNF- α -Konzentration nach Schwefellost-Exposition im Kulturüberstand von SCL II-Zellen: Die Zellen wurden für 30 min mit 500 μ M Schwefellost inkubiert. Danach wurde das Medium gewechselt und die Zellen ohne Schwefellost weitere 8 Stunden inkubiert. Es wurden stündlich Proben aus dem Überstand entnommen und die TNF- α -Konzentration mittels ELISA bestimmt. Darstellung des Mittelwertes der Zytokinkonzentration \pm SD in pg pro mg Protein. Graue Säulen: Kontrolle, schwarze Säulen: 500 μ M Schwefellost, ($n \geq 7$), * $p < 0,05$.

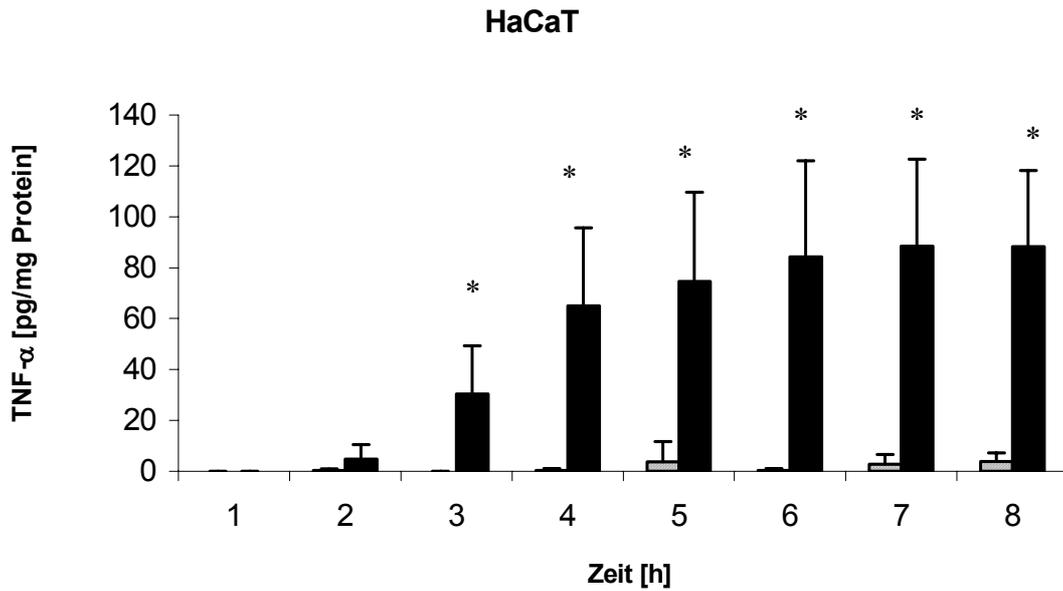


Abb. 21: TNF- α -Konzentration nach Schwefellostexposition im Kulturüberstand von HaCaT-Zellen: Die Zellen wurden für 30 min mit 500 μ M Schwefellost inkubiert. Danach wurde das Medium gewechselt und die Zellen ohne Schwefellost weitere 8 Stunden inkubiert. Es wurden stündlich Proben aus dem Überstand entnommen und die TNF- α -Konzentration mittels ELISA bestimmt. Darstellung des Mittelwertes der Zytokinkonzentration \pm SD in pg pro mg Protein. Graue Säulen: Kontrolle, schwarze Säulen: 500 μ M Schwefellost, (n \geq 7), * p < 0,05.

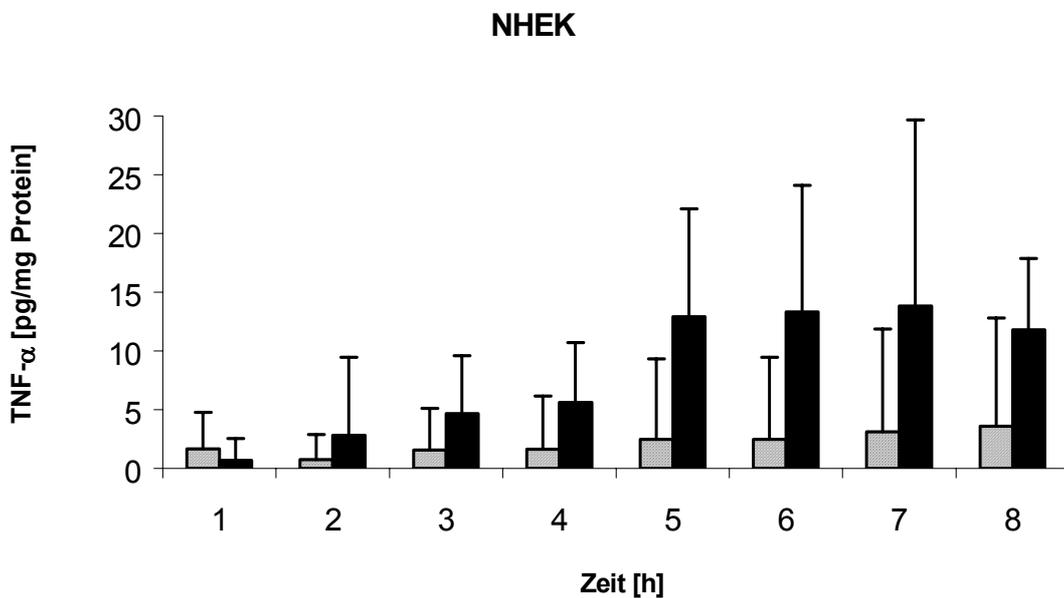


Abb. 22: TNF- α -Konzentration nach Schwefellostexposition im Kulturüberstand von Keratinozyten: Die Zellen wurden für 30 min mit 500 μ M Schwefellost inkubiert. Danach wurde das Medium gewechselt und die Zellen ohne Schwefellost weitere 8 Stunden inkubiert. Es wurden stündlich Proben aus dem Überstand entnommen und die TNF- α -Konzentration mittels ELISA bestimmt. Darstellung des Mittelwertes der Zytokinkonzentration \pm SD in pg pro mg Protein. Graue Säulen: Kontrolle, schwarze Säulen: 500 μ M Schwefellost, (n = 8), * p < 0,05.

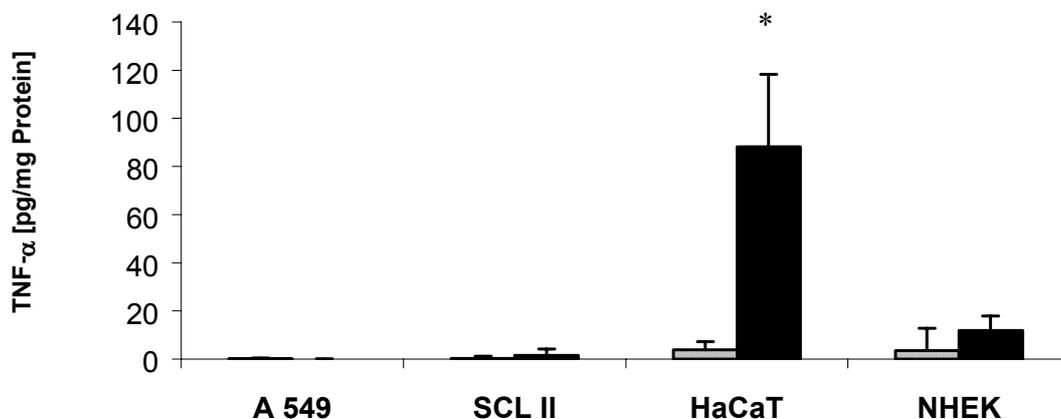


Abb. 23: Wirkung von Schwefellost auf die TNF- α -Konzentration im Überstand verschiedener Zelllinien: Vergleichende Darstellung der TNF- α Konzentration im Kulturüberstand von Kontrollkulturen (grau) und Schwefellost-exponierte Kulturen (schwarz) 8 Stunden nach Schwefellost-Exposition (* $p < 0,001$).

3.4.2 Wirkung von Schwefellost auf die Konzentration von IL-1 α im Überstand verschiedener kultivierter Zellen

Wie den Abbildungen 24 und 25 zu entnehmen, konnte sowohl bei A 549-Zellen als auch bei SCL II-Zellen nach Schwefellost-Exposition kein IL-1 α gemessen werden. Die Konzentration von IL-1 α lag in beiden Zelllinien bei den Kontrollgruppen unter 1 pg/mg Protein.

Bei HaCaT-Zellen (Abb. 26) kam es nach Schwefellost-Exposition zu einer deutlichen Steigerung der IL-1 α -Konzentration, die ab der fünften Stunde nach Exposition hochsignifikant war ($p < 0,01$) und bis zur achten Stunde kontinuierlich zunahm. In der achten Stunde nach Exposition lag die IL-1 α -Konzentration im Überstand fast 62-mal höher als die der Kontrolle.

Im Überstand der Keratinozytenkulturen (Abb. 27) fiel die ermittelte Zytokinkonzentration bei den exponierten Kulturen im Schnitt dreifach höher aus als bei den Kontrollen, jedoch waren die Unterschiede nicht signifikant ($p > 0,05$).

Vergleicht man die dargestellten Daten, zeigt sich, dass die Keratinozytenüberstände bereits ohne Schwefellost-Einwirkung eine im Vergleich zu den anderen untersuchten

Zellkulturen wesentlich höhere IL-1 α -Konzentration (ca. 11,5 pg/mg Protein) enthielten, die bereits nach der zweiten Stunde erreicht wurde und bis zur achten Stunde fast konstant blieb.

Betrachtet man die durch Schwefellost hervorgerufene Konzentrationsänderung von IL-1 α im Zellkulturüberstand, so erkennt man, dass es nur bei HaCaT-Zellen und Keratinozyten zu einer Erhöhung der Zytokinkonzentration nach SL-Exposition kam, welche jedoch nur bei den HaCaT-Zellen hoch signifikant ($p < 0,01$) war (Abb. 28).

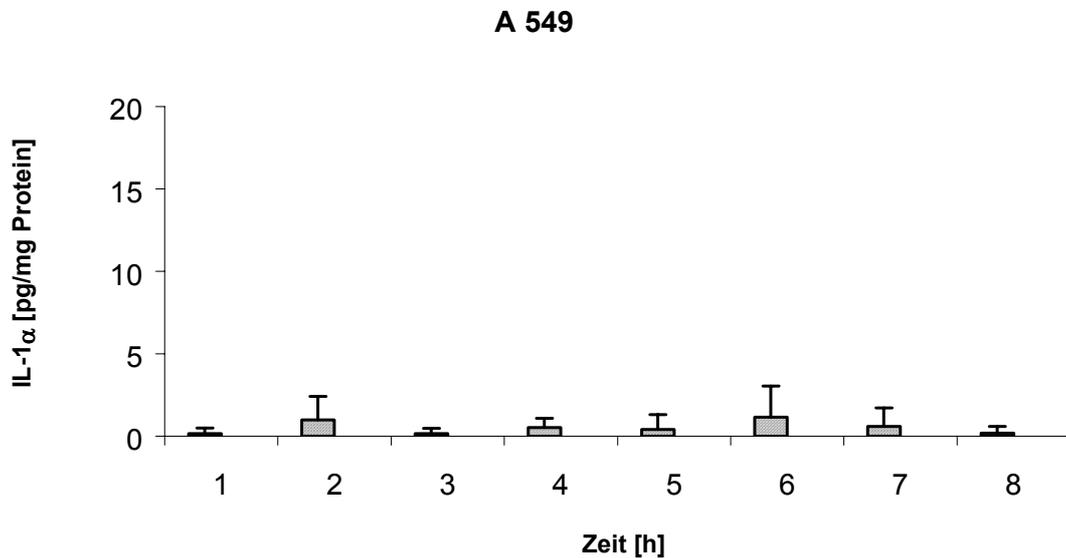


Abb. 24: IL-1 α -Konzentration nach Schwefellost-Exposition im Kulturüberstand von A 549-Zellen: Die Zellen wurden für 30 min mit 500 μ M Schwefellost inkubiert. Danach wurde das Medium gewechselt und die Zellen ohne Schwefellost weitere 8 Stunden inkubiert. Es wurden stündlich Proben aus dem Überstand entnommen und die IL-1 α -Konzentration mittels ELISA bestimmt. Darstellung des Mittelwertes der Zytokinkonzentration \pm SD in pg pro mg Protein. Graue Säulen: Kontrolle, schwarze Säulen: 500 μ M Schwefellost, ($n \geq 5$), * $p < 0,05$.

SCL II

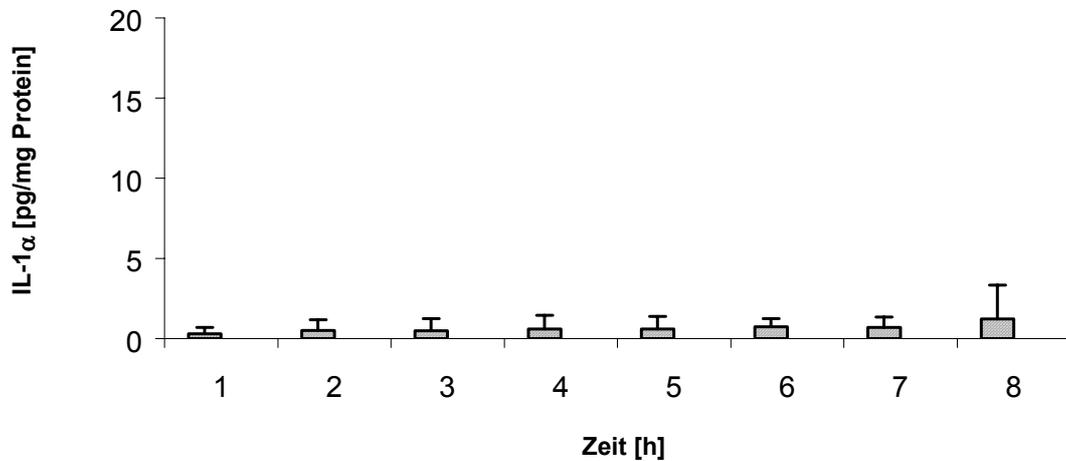


Abb. 25: IL-1 α -Konzentration nach Schwefellost-Exposition im Kulturüberstand von SCL II-Zellen: Die Zellen wurden für 30 min mit 500 μ M Schwefellost inkubiert. Danach wurde das Medium gewechselt und die Zellen ohne Schwefellost weitere 8 Stunden inkubiert. Es wurden stündlich Proben aus dem Überstand entnommen und die IL-1 α -Konzentration mittels ELISA bestimmt. Darstellung des Mittelwertes der Zytokinkonzentration \pm SD in pg pro mg Protein. Graue Säulen: Kontrolle, schwarze Säulen: 500 μ M Schwefellost, (n \geq 5), * p < 0,05.

HaCaT

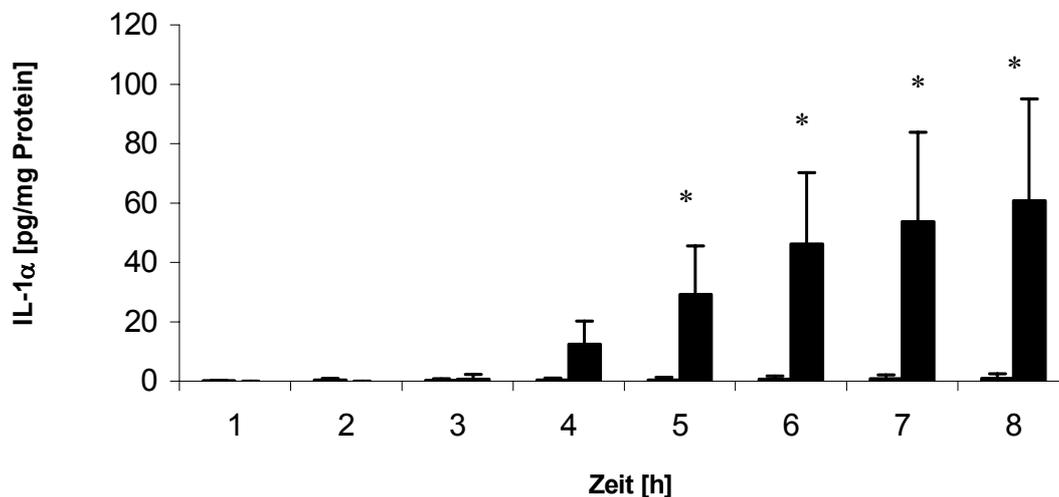


Abb. 26: IL-1 α -Konzentration nach Schwefellost-Exposition im Kulturüberstand von HaCaT-Zellen: Die Zellen wurden für 30 min mit 500 μ M Schwefellost inkubiert. Danach wurde das Medium gewechselt und die Zellen ohne Schwefellost weitere 8 Stunden inkubiert. Es wurden stündlich Proben aus dem Überstand entnommen und die IL-1 α -Konzentration mittels ELISA bestimmt. Darstellung des Mittelwertes der Zytokinkonzentration \pm SD in pg pro mg Protein. Graue Säulen: Kontrolle, schwarze Säulen: 500 μ M Schwefellost, (n \geq 5), * p < 0,01.

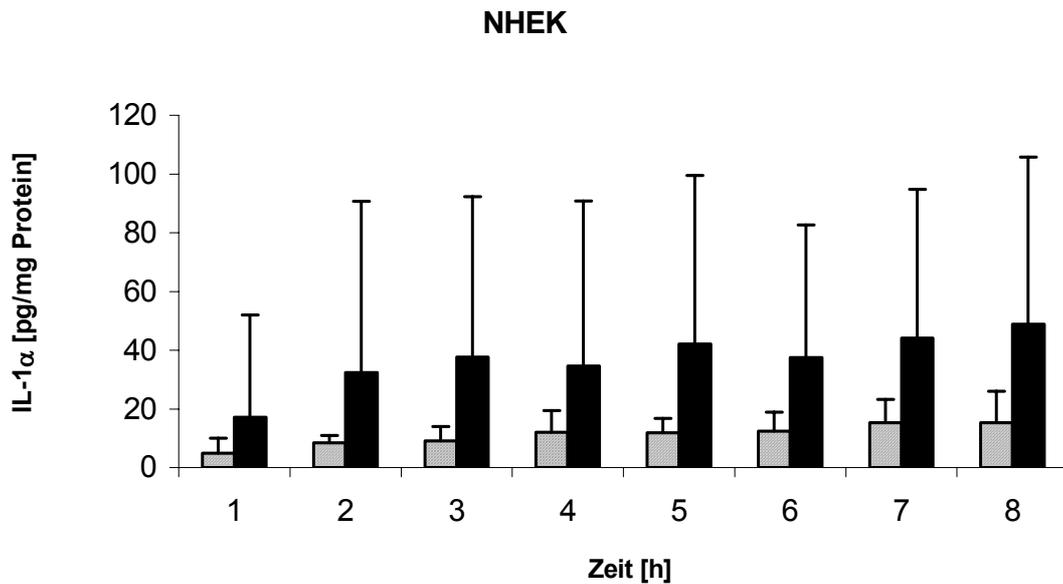


Abb. 27: IL-1 α -Konzentration nach Schwefellost-Exposition im Kulturüberstand von Keratinozyten: Die Zellen wurden für 30 min mit 500 μ M Schwefellost inkubiert. Danach wurde das Medium gewechselt und die Zellen ohne Schwefellost weitere 8 Stunden inkubiert. Es wurden stündlich Proben aus dem Überstand entnommen und die IL-1 α -Konzentration mittels ELISA bestimmt. Darstellung des Mittelwertes der Zytokinkonzentration \pm SD in pg pro mg Protein. Graue Säulen: Kontrolle, schwarze Säulen: 500 μ M Schwefellost, (n = 6), * p < 0,05.

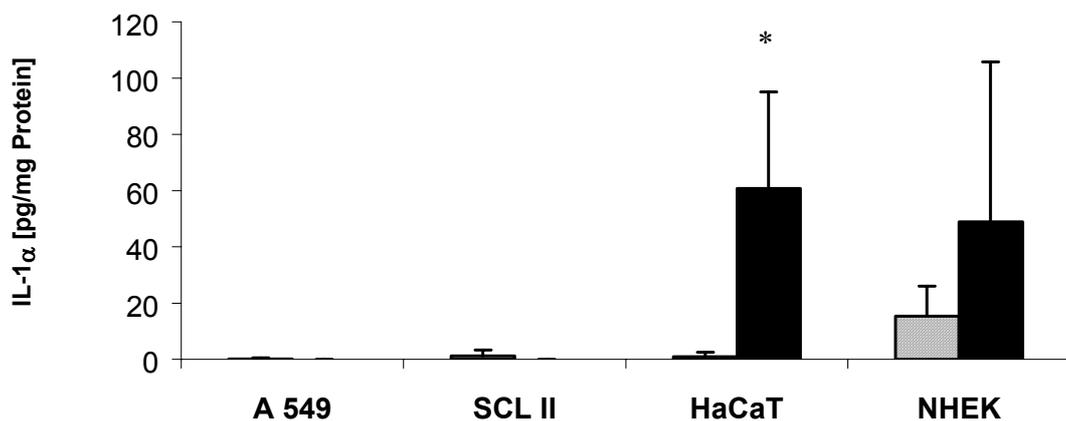


Abb. 28: Wirkung von Schwefellost auf die IL-1 α -Konzentration im Überstand verschiedener Zelllinien: Vergleichende Darstellung der IL-1 α Konzentration im Kulturüberstand von Kontrollkulturen (schraffiert) und Schwefellost-exponierte Kulturen (schwarz) 8 Stunden nach Schwefellost-Exposition (* p < 0,001).

3.4.3 Wirkung von Schwefellost auf die Konzentration von IL-6 im Überstand verschiedener kultivierter Zellen

Wie in den Abbildungen 29-33 zu sehen, konnte bei allen vier Zelllinien im Kulturüberstand eine erhöhte IL-6-Konzentration nach Schwefellost-Exposition gemessen werden. Von den exponierten Zellen reagierten die HaCaT-Zellen am stärksten auf den Kontakt mit Schwefellost, was sich in einer extremen Erhöhung der IL-6 Konzentration im Kulturüberstand zeigte. Bereits ab der dritten Stunde war die Konzentrationserhöhung gegenüber der Kontrolle signifikant unterschiedlich ($p < 0,01$). Die Konzentration nahm so rapide zu, dass sie in der sechsten Stunde nach Exposition beim ca. 50-fachen der Kontrollkonzentration lag und in der siebten Stunde den Messbereich überschritt.

Bei den A 549-Zellen kam es nach der Exposition rasch zu einer Erhöhung der Zytokin-konzentration, die ab der dritten Stunde signifikant war. Die IL-6-Konzentration stieg bis zum 4,5-fachen Wert der Kontrolle in der fünften Stunde an und erreichte dann ein Plateau. Insgesamt lag die durch A 549-Zellen produzierte Menge an IL-6 zehnfach niedriger im Vergleich zu dem, was in den Kulturüberständen der HaCaT-Zellen gemessen wurde.

Die bei den SCL II-Zellen erreichten IL-6-Werte lagen weit unter den Konzentrationen, die in den anderen Zelllinien gefunden wurden, und auch der Unterschied zwischen behandelten und unbehandelten Proben war bis zur sechsten Stunde nicht signifikant. Am Ende des Messintervalls konnte in den Schwefellost-exponierten Kulturen eine dreimal höhere IL-6 Konzentration im Überstand als in dem der unbehandelten Kontrollkulturen festgestellt werden.

Bei Schwefellost-exponierten Keratinozyten war eine signifikante Erhöhung des IL-6-Spiegels im Kulturüberstand ab der vierten Stunde nachweisbar. Bei den unbehandelten Kulturen pendelte sich die IL-6-Konzentration ab der vierten Stunde zwischen 30 und 40 pg pro mg Protein ein, während bei exponierten Kulturen die Zytokin-Werte innerhalb des Messzeitraumes kontinuierlich stiegen und in der achten Stunde das 13-fache der Werte der Kontrolle, also einen Mittelwert von ca. 540 pg pro mg Protein, erreichten.

A 549

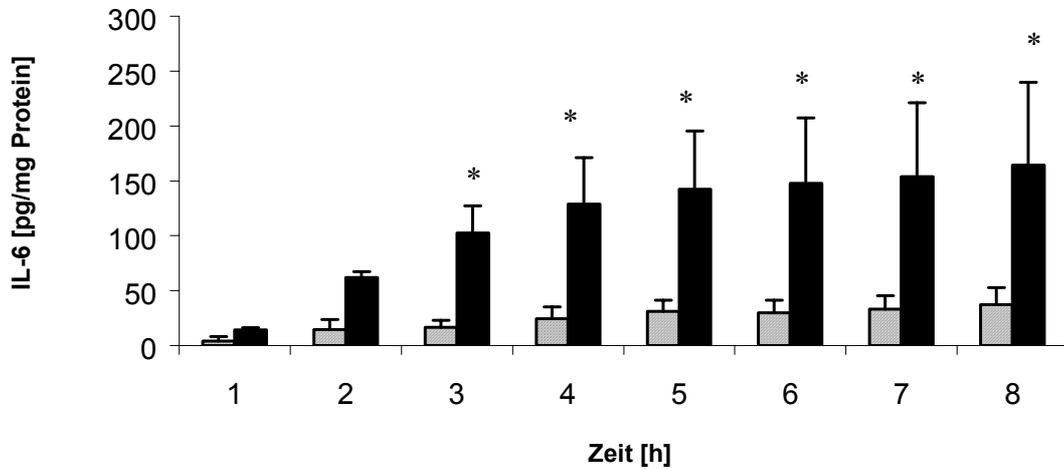


Abb. 29: IL-6-Konzentration nach Schwefellost-Exposition im Kulturüberstand von A 549-Zellen: Die Zellen wurden für 30 min mit 500 µM Schwefellost inkubiert. Danach wurde das Medium gewechselt und die Zellen ohne Schwefellost weitere 8 Stunden inkubiert. Es wurden stündlich Proben aus dem Überstand entnommen und die IL-6-Konzentration mittels ELISA bestimmt. Darstellung des Mittelwertes der Zytokinkonzentration ± SD in pg pro mg Protein. Graue Säulen: Kontrolle, schwarze Säulen: 500 µM Schwefellost, (n ≥ 5), * p < 0,05.

SCL II

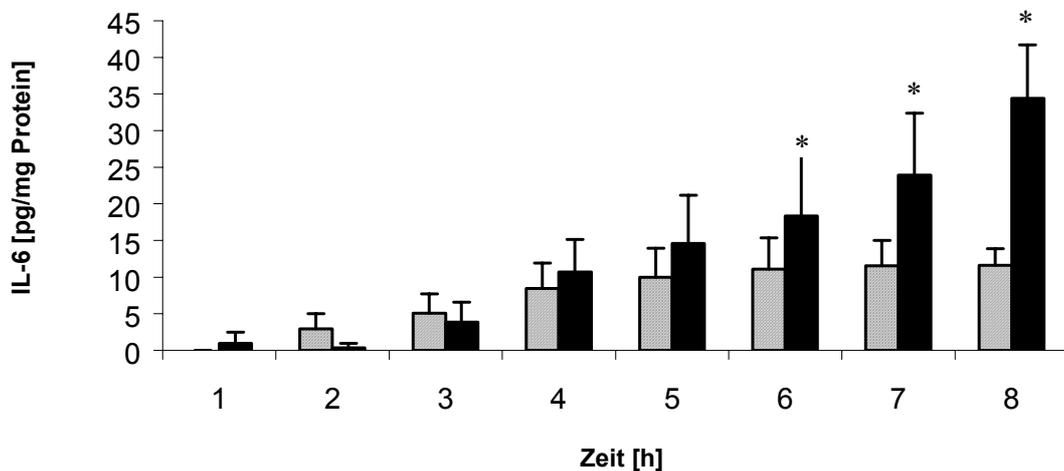


Abb. 30: IL-6-Konzentration nach Schwefellost-Exposition im Kulturüberstand von SCL II-Zellen: Die Zellen wurden für 30 min mit 500 µM Schwefellost inkubiert. Danach wurde das Medium gewechselt und die Zellen ohne Schwefellost weitere 8 Stunden inkubiert. Es wurden stündlich Proben aus dem Überstand entnommen und die IL-6-Konzentration mittels ELISA bestimmt. Darstellung des Mittelwertes der Zytokinkonzentration ± SD in pg pro mg Protein. Graue Säulen: Kontrolle, schwarze Säulen: 500 µM Schwefellost, (n ≥ 6), * p < 0,05.

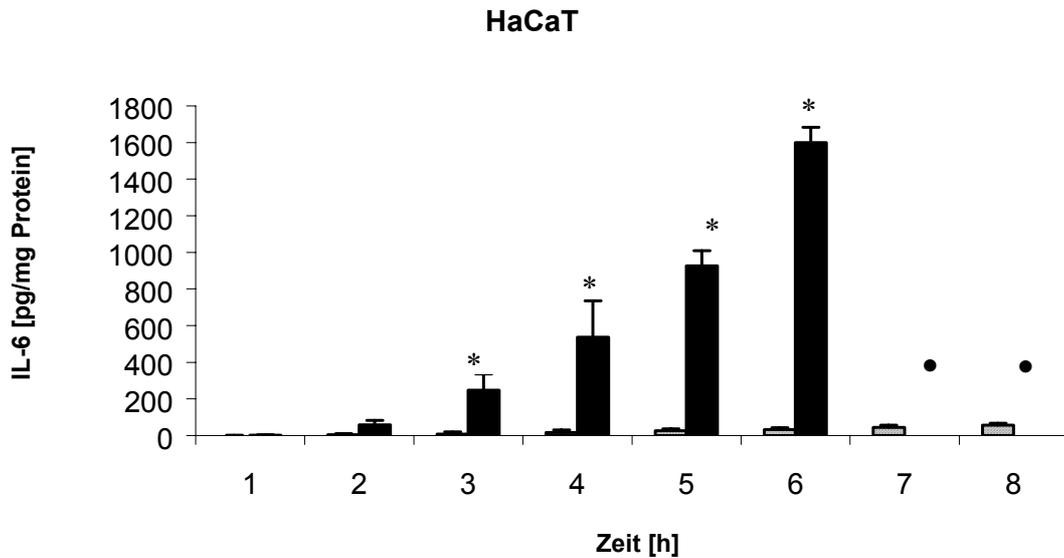


Abb. 31: IL-6-Konzentration nach Schwefellost-Exposition im Kulturüberstand von HaCaT-Zellen: Die Zellen wurden für 30 min mit 500 µM Schwefellost inkubiert. Danach wurde das Medium gewechselt und die Zellen ohne Schwefellost weitere 8 Stunden inkubiert. Es wurden stündlich Proben aus dem Überstand entnommen und die IL-6-Konzentration mittels ELISA bestimmt. Darstellung des Mittelwertes der Zytokinkonzentration ± SD in pg pro mg Protein. Graue Säulen: Kontrolle, schwarze Säulen: 500 µM Schwefellost, (n ≥ 6), * p < 0,01, ● = Werte lagen oberhalb des Messbereichs.

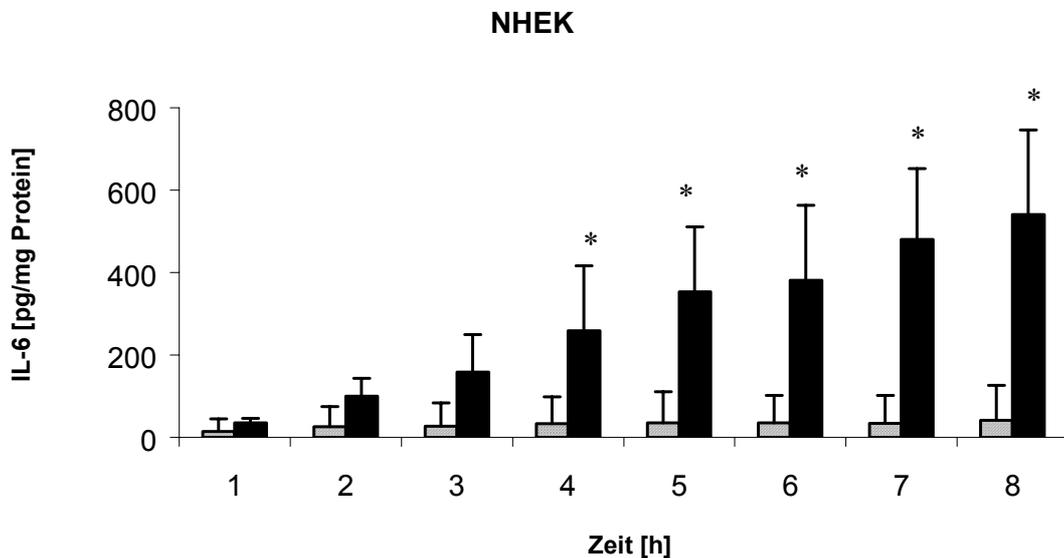


Abb. 32: IL-6-Konzentration nach Schwefellost-Exposition im Kulturüberstand von Keratinozyten: Die Zellen wurden für 30 min mit 500 µM Schwefellost inkubiert. Danach wurde das Medium gewechselt und die Zellen ohne Schwefellost weitere 8 Stunden inkubiert. Es wurden stündlich Proben aus dem Überstand entnommen und die IL-6-Konzentration mittels ELISA bestimmt. Darstellung des Mittelwertes der Zytokinkonzentration ± SD in pg pro mg Protein. Graue Säulen: Kontrolle, schwarze Säulen: 500 µM Schwefellost, (n = 6), * p < 0,05.

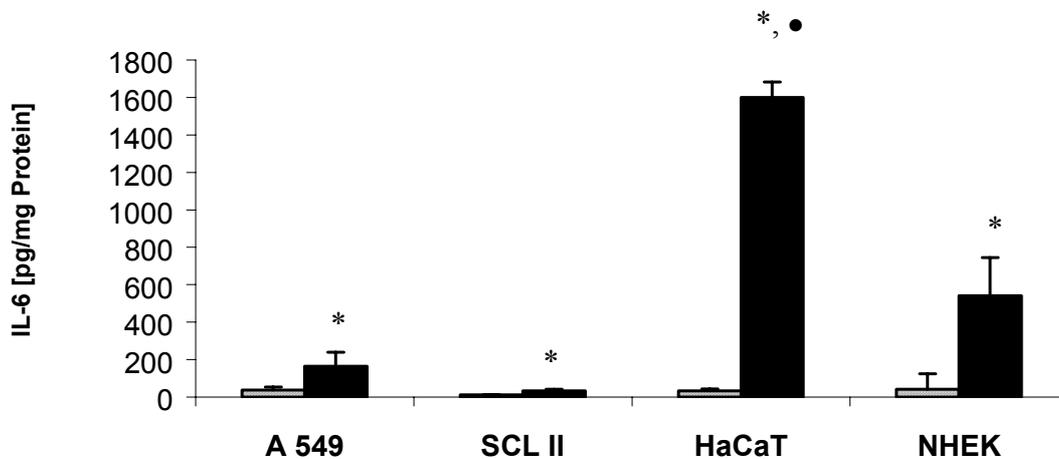


Abb. 33: Wirkung von Schwefelost auf die IL-6-Konzentration im Überstand verschiedener Zelllinien: Vergleichende Darstellung der IL-6 Konzentration im Kulturüberstand von Kontrollkulturen (grau) und Schwefelost-exponierte Kulturen (schwarz) 8 Stunden nach Schwefelost-Exposition (* $p < 0,001$; ● = 6 Stunden nach der Exposition).

3.4.4 Wirkung von Schwefelost auf die Konzentration von IL-8 im Überstand verschiedener kultivierter Zellen

Bei allen vier Zelllinien konnte nach Schwefelost-Exposition im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle eine Erhöhung der IL-8-Konzentration im Kulturüberstand festgestellt werden (Abb. 38).

SCL II-Zellen und HaCaT-Zellen (Abb. 35 und 36) zeigten einen ähnlichen absoluten Anstieg der IL-8-Konzentration. Im Überstand der A 549-Zellen stieg nach SL-Exposition die Zytokin-Konzentration sehr rasch an. Ab der vierten Stunde konnte keine weitere Erhöhung der Konzentration beobachtet werden (Abb. 34).

Bei den Keratinozyten kam es schon ab der zweiten Stunde zu einer signifikanten Erhöhung der IL-8 Konzentration mit kontinuierlich ansteigendem Verlauf. Die Konzentration erreichte in der achten Stunde das mehr als 17-fache der Kontrollkulturen (Abb. 37). Der Wert lag damit beim ca. Dreifachen der IL-8-Konzentration, die nach Exposition bei den anderen Zelllinien erreicht wurde.

A 549

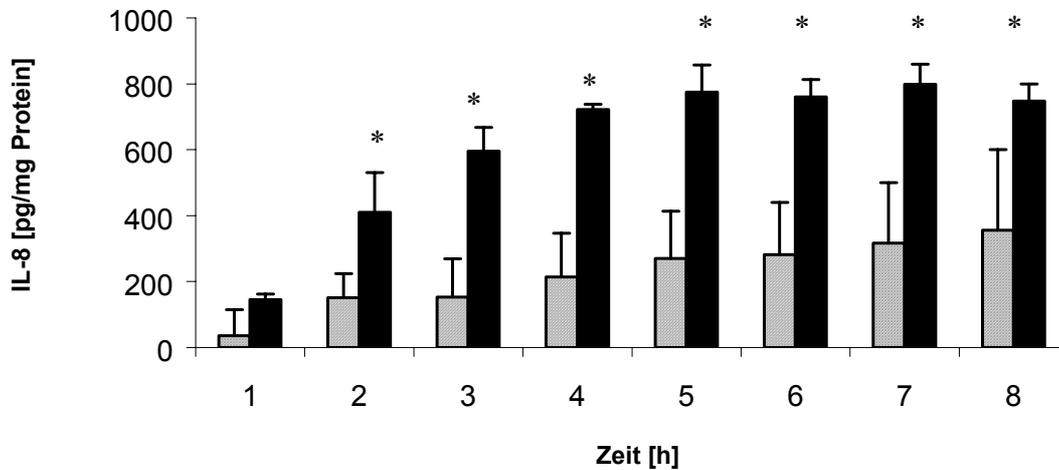


Abb. 34: IL-8-Konzentration nach Schwefellost-Exposition im Kulturüberstand von A 549-Zellen: Die Zellen wurden für 30 min mit 500 µM Schwefellost inkubiert. Danach wurde das Medium gewechselt und die Zellen ohne Schwefellost weitere 8 Stunden inkubiert. Es wurden stündlich Proben aus dem Überstand entnommen und die IL-8-Konzentration mittels ELISA bestimmt. Darstellung des Mittelwertes der Zytokinkonzentration ± SD in pg pro mg Protein. Graue Säulen: Kontrolle, schwarze Säulen: 500 µM Schwefellost, (n ≥ 5), * p < 0,05.

SCL II

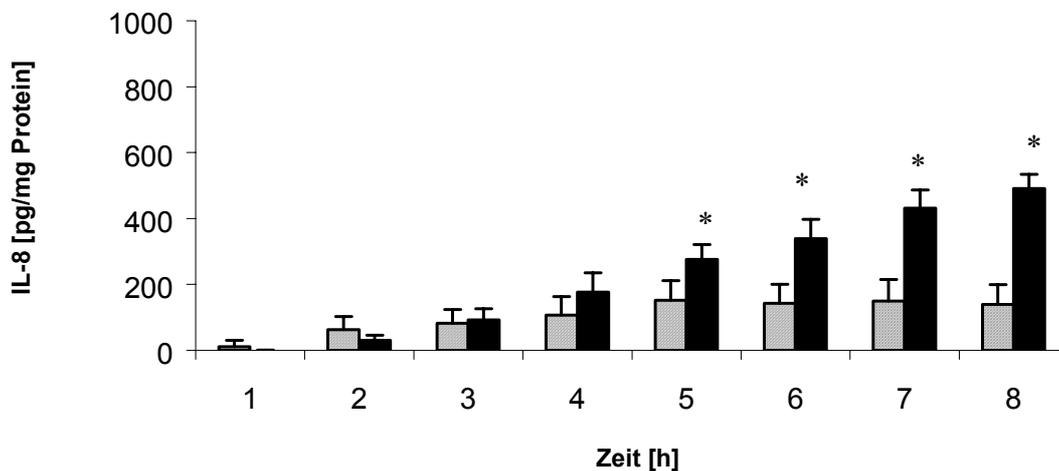


Abb. 35: IL-8-Konzentration nach Schwefellost-Exposition im Kulturüberstand von SCL II-Zellen: Die Zellen wurden für 30 min mit 500 µM Schwefellost inkubiert. Danach wurde das Medium gewechselt und die Zellen ohne Schwefellost weitere 8 Stunden inkubiert. Es wurden stündlich Proben aus dem Überstand entnommen und die IL-8-Konzentration mittels ELISA bestimmt. Darstellung des Mittelwertes der Zytokinkonzentration ± SD in pg pro mg Protein. Graue Säulen: Kontrolle, schwarze Säulen: 500 µM Schwefellost, (n = 6), * p < 0,05.

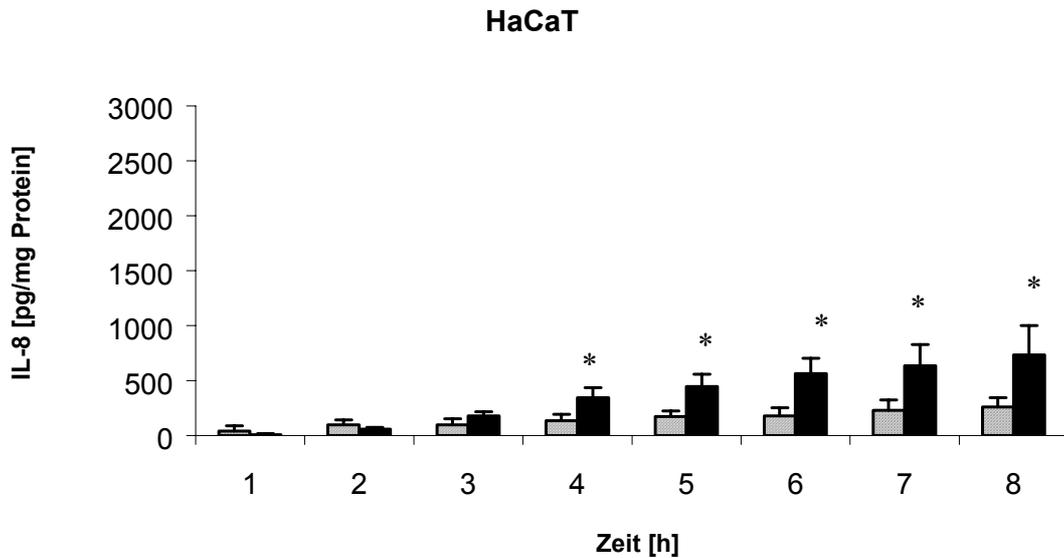


Abb. 36: IL-8-Konzentration nach Schwefellost-Exposition im Kulturüberstand von HaCaT-Zellen: Die Zellen wurden für 30 min mit 500 µM Schwefellost inkubiert. Danach wurde das Medium gewechselt und die Zellen ohne Schwefellost weitere 8 Stunden inkubiert. Es wurden stündlich Proben aus dem Überstand entnommen und die IL-8-Konzentration mittels ELISA bestimmt. Darstellung des Mittelwertes der Zytokinkonzentration ± SD in pg pro mg Protein. Graue Säulen: Kontrolle, schwarze Säulen: 500 µM Schwefellost, (n = 6), * p < 0,05.

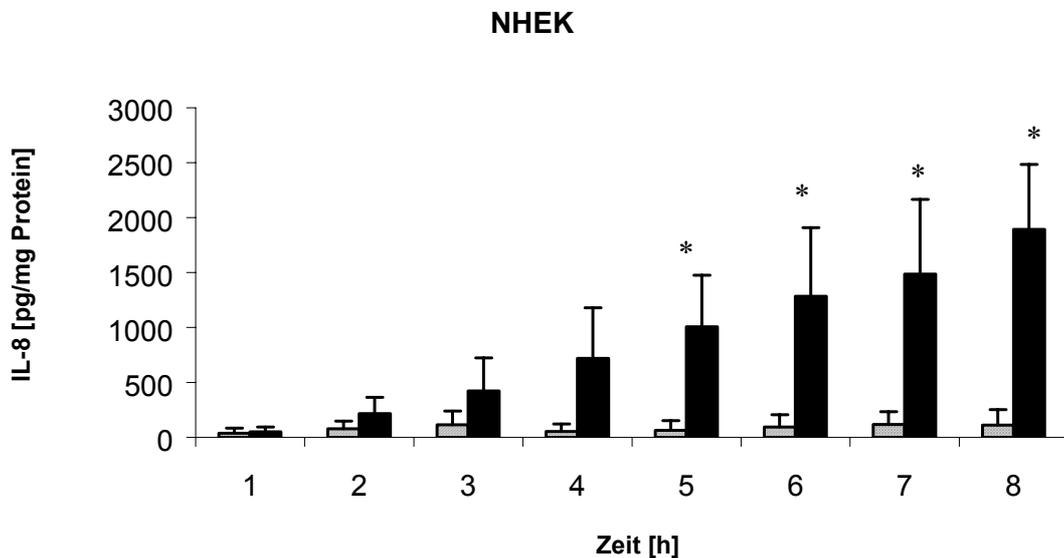


Abb. 37: IL-8-Konzentration nach Schwefellost-Exposition im Kulturüberstand von Keratinozyten: Die Zellen wurden für 30 min mit 500 µM Schwefellost inkubiert. Danach wurde das Medium gewechselt und die Zellen ohne Schwefellost weitere 8 Stunden inkubiert. Es wurden stündlich Proben aus dem Überstand entnommen und die IL-8-Konzentration mittels ELISA bestimmt. Darstellung des Mittelwertes der Zytokinkonzentration ± SD in pg pro mg Protein. Graue Säulen: Kontrolle, schwarze Säulen: 500 µM Schwefellost, (n = 8), * p < 0,05.

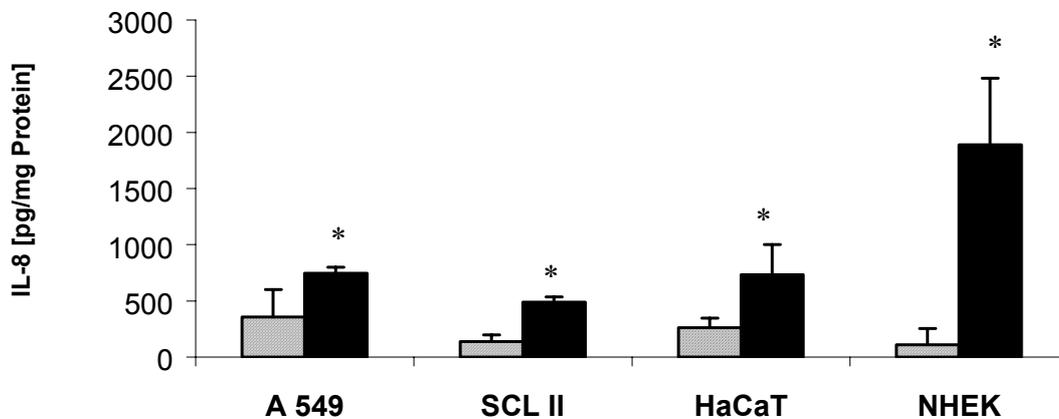


Abb. 38: Wirkung von Schwefellost auf die IL-8-Konzentration im Überstand verschiedener Zelllinien: Vergleichende Darstellung der IL-8 Konzentration im Kulturüberstand von Kontrollkulturen (grau) und Schwefellost-exponierte Kulturen (schwarz) 8 Stunden nach Schwefellost-Exposition (* $p < 0,001$).

3.4.5 Wirkung von Schwefellost auf die Konzentration von IL-6 im Überstand von kultivierten HaCaT-Zellen

Um Dosis-Wirkungs-Beziehungen zu untersuchen, wurden HaCaT-Kulturen für 30 Minuten mit Schwefellostlösung in den Konzentrationen 0, 10, 100, 300 und 500 μM exponiert.

Man erkennt, dass mit zunehmender Schwefellost-Konzentration die IL-6-Konzentration im Kulturüberstand ansteigt. Bei allen S-Lost-Konzentrationen kam es gegenüber den Kontrollkulturen zu einer hoch signifikanten Erhöhung der IL-6-Konzentration im Überstand ($p < 0,001$, Abb. 39). Eine Schwefellost-Konzentration von 100 μM führt zu einer Verzehnfachung und 300 μM S-Lost zu einer knappen Versechsdreifachung der IL-6 Ausschüttung gegenüber den Kontrollkulturen. Bei der höchsten untersuchten Schwefellost-Konzentration (500 μM) lag die IL-6 Konzentration bei knapp dem 50-fachen Wert der Kontrollkulturen ($p < 0,001$).

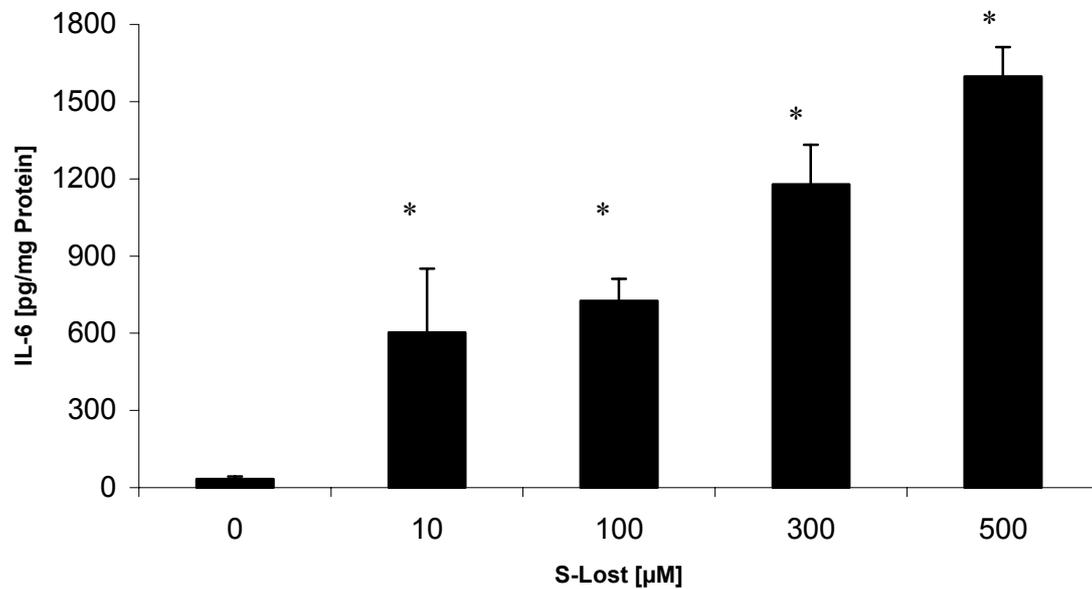


Abb. 39: Wirkung von Schwefellost auf die Konzentration von IL-6 im Überstand von HaCaT-Zellen: Die Zellen wurden für 30 min mit verschiedenen Konzentrationen von Schwefellost inkubiert (0-500 µM). Danach wurde das Medium gewechselt und die Zellen für weitere 6 Stunden ohne Schwefellost inkubiert. Nach 6 Stunden wurde die IL-6-Konzentration im Zellkulturüberstand mittels ELISA bestimmt. Darstellung der IL-6-Konzentration ± SD in pg pro mg Protein, (n = 8), * p < 0,001.

4 DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit konnte anhand von vier epithelialen Zelllinien gezeigt werden, dass die Wirkung von Schwefellost auf Proliferation, Vitalität und Zytokinsekretion dosis- und zeitabhängig ist.

Die Schwefellost-Exposition führte bei den untersuchten Zelllinien zu einer Proliferationshemmung, die sich in der Abnahme der Koloniebildung äußerte (Klonogenizitätstest). Bei höheren Schwefellost-Konzentrationen konnte eine Abnahme der Vitalität der Zellen, gemessen anhand ihrer metabolischen Aktivität (XTT-Test), beobachtet werden, sowie eine gesteigerte Ausschüttung der Interleukine 6 und 8.

Der Klonogenizitätstest zeigte, dass Schwefellost bereits in geringsten Konzentrationen ($\leq 1 \mu\text{M}$) die Proliferation der Zellen hemmte. Während SCL II-, HaCaT-Zellen und Keratinozyten bereits bei einer Konzentration von $0,1 \mu\text{M}$ 20 % weniger Kolonien bildeten, wurde die Koloniebildung bei den A 549-Zellen erst durch eine Konzentration von $3 \mu\text{M}$ Schwefellost um ein Fünftel reduziert. Mit zunehmender S-Lost-Konzentration nahm die Koloniebildungsrate, bezogen auf die unbehandelten Kulturen, stetig ab. Eine Konzentration von $100 \mu\text{M}$ Schwefellost führte bei Keratinozyten, HaCaT- und SCL II-Zellen zum Stillstand der Proliferation, d.h. es war keine Koloniebildung mehr feststellbar. Beim Klonogenizitätstest waren die A 549-Zellen am widerstandsfähigsten gegenüber einer Schwefellost-Exposition.

Schwefellost reagiert mit der DNA vorwiegend an der Position 7 des Guanins. Es kommt zu einem Zellzyklus-Arrest (S-Phase), bei dem die Zelle versucht, den Schaden zu reparieren und bei starken Schäden kommt es zum Zelltod (Smith et al., 1992). Die vorliegenden Daten zeigen, dass die Proliferationshemmung bei erheblich kleineren Konzentrationen auftritt, als die akute Toxizität innerhalb der ersten 72 Stunden. Diese Daten lassen den Schluss zu, dass mit niedrigen Schwefellost-Konzentrationen ($< 1 \mu\text{M}$) geschädigte Zellen eine Zeitspanne von 7-10 Tagen ohne Proliferation überleben können. Die bei tiefen durch S-Lost hervorgerufenen Wunden auftretende schlechte Heilung könnte demnach mit dem durch Schwefellost herabgesetzten Teilungsvermögen der Zellen erklärt werden.

Vorausgesetzt, es läge von der Mitte der Wunde bis zu den Wundrändern ein Konzentrationsgefälle vor, so kann davon ausgegangen werden, dass apoptotische und nekrotische Prozesse sich vor allem zentral in der Wunde abspielen, während sich die Schwefellost-Exposition in der Peripherie lediglich auf das Proliferationsverhalten der Zellen auswirkt. Die Wundränder zeigen ein stagnierendes Wachstum, was sich in der schlechten Heilung manifestieren könnte. Die geschädigten Zellen können sich nicht mehr teilen und zum Wundverschluss führen, außerdem wird das Einsprossen junger Zellen durch die teilungsinaktiven Zellen, die die eigentliche Wunde umgeben, behindert. Diese Hypothese vorausgesetzt, könnte das Entfernen (Herausschneiden) dieser proliferativ inaktiven Zellen an den Wundrändern den Heilungsprozess beschleunigen, wie dies bereits durch Graham et al. (1997) und Kjellstrom et al. (1997) an Schweinen gezeigt werden konnte.

Während die Zellproliferation in allen untersuchten Zelllinien bei 100 μM bereits vollständig gehemmt war, konnte eine Abnahme der Vitalität bzw. der metabolischen Aktivität erst ab dieser Konzentration beobachtet werden. Es zeigte sich, dass das Intervall zwischen Schwefellost-Exposition und Aktivitätsmessung von großer Bedeutung war. Je länger mit der Aktivitätsmessung nach erfolgter Exposition gewartet wurde, umso geringer wurde die Zahl metabolisch aktiver Zellen.

Die Latenzzeit bis zur Manifestierung des Zelltodes lässt vermuten, dass Schwefellost allenfalls in extrem hohen Konzentrationen durch Alkylierung vitaler Proteine einen raschen nekrotischen Zelltod induziert. Die Daten von Smith et al. (1992) zeigen, dass bei geringen Konzentrationen durch die DNA-Alkylierung ein Zellzyklusarrest in der frühen S-Phase induziert wird. Dies geht vermutlich mit der Erhöhung von p53 und der Verminderung von bcl2 (Rosenthal et al., 1998) einher, was für die Induktion von Apoptosen bei niedrigeren Konzentrationen spricht.

Die Abnahme der Vitalität nach der Inkubation mit Schwefellost könnte auch auf die von Werrlein et al. (1998) gemachte Beobachtung zurückgeführt werden, dass Schwefellost bei Keratinozyten zu einer Erhöhung der Permeabilität für Calcium führt. Das Calcium fördert die Ausdifferenzierung der Keratinozyten und beschleunigt deren Reifung, die in der Verhornung und damit dem Absterben der Keratinozyten gipfelt. Dem-

nach könnte Schwefellost bei Keratinozyten zu einer Steigerung des „programmierten Zelltodes“ durch terminale Differenzierung führen.

Insgesamt wird deutlich, dass die A 549-Zellen am robustesten sind. Bei der höchsten getesteten Schwefellost-Konzentration (1000 μM) kam es 48 bzw. 72 h nach der Exposition lediglich zu einem Vitalitätsverlust von ca. 55 %. Erklärt werden kann diese relative „Unempfindlichkeit“ dieser Zelllinie gegenüber Schwefellost mit Untersuchungsergebnissen von Brodie und Reed (1985), die zeigen, dass A 549-Zellen sehr viel Glutathion enthalten. Glutathion, das eine SH-Gruppe enthält, bindet einen Teil des Schwefellostes und wirkt damit als Scavenger, d.h. es fängt einen Teil der Schwefellostmoleküle ab, sodass die Zahl der Moleküle, die mit den Nukleinsäuren und anderen wichtigen Proteinen eine irreversible Bindung eingehen können, vermindert wird. Die Konzentration der ungebundenen Moleküle, die DNA-Schäden verursachen oder mit Proteinen reagieren können, wird so herabgesetzt, was sich in einer scheinbar größeren Unempfindlichkeit und damit höheren Vitalität der Zellen zeigt.

Praktische Folgen hat dieses Ergebnis auch im Bezug auf die Behandlungsmöglichkeit dieses Lungenkarzinomtyps, von dem die A 549-Zellen abstammen, mit Alkylanzien aus der Familie der Lose (vgl. Abb. 2). Es ist zu vermuten, dass diese Art von Lungenkarzinom mit Lostderivaten nur schwer therapierbar ist.

Die größte Empfindlichkeit gegenüber Schwefellost zeigten HaCaT-Zellen. Bereits am ersten Tag sank ihre Vitalität bei einer S-Lost Konzentration von 1000 μM auf ein Fünftel der Ausgangsvitalität ab; am zweiten und dritten Tag nach Exposition waren praktisch alle Zellen abgestorben, bzw. es war keine metabolische Aktivität mehr nachweisbar. Da es sich bei den HaCaT-Zellen um eine durch hohe Temperatureinwirkung in Verbindung mit einem geringen Calciumgehalt im Medium immortalisierte Zelllinie handelt, liegt die Vermutung nahe, dass der Zellstoffwechsel sich bei diesen Zellen deutlich von dem „normaler“ Zellen unterscheidet. HaCaT-Zellen haben ein mutiertes p53-Gen (Lehmann et al., 1993). Diese Veränderung könnten sich negativ auf den vorhandenen natürlichen Reparaturmechanismus der Zellen ausgewirkt haben.

SCL II-Zellen und Keratinozyten zeigten beim Vitalitätstest ein ähnliches Verhalten, auch hier nahm mit zunehmender Zeit nach der Exposition die Vitalität mit steigender Schwefellost-Konzentration ab.

Durch Schwefellost hervorgerufene Hautschäden sind neben der Blasenbildung auch durch Erythem mit Entzündungsreaktionen gekennzeichnet (Smith et al., 1995). Zur Gewinnung weiterer Einblicke in den Pathomechanismus von Schwefellost wurde die Bildung verschiedener Entzündungsmediatoren innerhalb 8 Stunden nach der Inkubation mit Schwefellost anhand der vier Zelllinien näher untersucht. Das 8-Stunden-Intervall wurde gewählt, um die Vorgänge während der Latenzzeit, in der noch keine Symptome einer Schwefellost-Intoxikation auftreten, näher zu betrachten. Die Versuchsreihe wurde mit einer Konzentration von 500 μ M Schwefellost durchgeführt. Diese Konzentration ist als sicher blasenbildend beschrieben worden (Hinshaw et al., 1999). Als Expositionszeit wurden 30 min gewählt. Das ist die Zeit, in der Schwefellost sicher in die Epidermis eingedrungen ist. Aufgrund der hohen Reagibilität ist weiterhin von einer vollständigen Reaktion des Schwefellostes mit Zellbestandteilen auszugehen. Des Weiteren wurde nach der Exposition das Medium gewechselt, um Effekte des Hydrolyseendproduktes Thiodiglykol (Franke et al., 1994) auszuschließen.

Unter Schwefellost-Einwirkung kam es im Zellkulturüberstand aller Zelllinien zumeist zu einer zeitabhängigen vermehrten Ausschüttung der Interleukine 6 und 8 sowie TNF- α . Unterschiede zwischen den Zelllinien zeigten sich vor allem in der Höhe der Konzentration der jeweils ausgeschütteten Zytokine und im Sekretionsverhalten.

Der Bestimmung von TNF- α in den Kulturüberständen ergab, dass sich durch die Schwefellost-Exposition lediglich bei den HaCaT-Zellen die Ausschüttung signifikant erhöhte. Die Keratinozyten reagierten auf Schwefellost-Einwirkung ab der fünften Stunde mit einer, allerdings nicht signifikanten, Verdreifachung der Konzentration und bei den SCL II-Zellen kam es zu einer nicht signifikanten leichten Erhöhung der Konzentration.

In Untersuchungen von Kock et al. (1990) konnte gezeigt werden, dass im Überstand von humanen epidermalen Zellen, unter anderem Keratinozyten, nach UV-B-Bestrahlung und nach Stimulation mit Lipopolysacchariden erhöhte TNF- α -Konzentrationen gemessen wurden. Die Dosis der UV-B-Bestrahlung wurde bei den Versuchen so gewählt, dass sie einen schweren Sonnenbrand verursachte. Kock et al. konnten ebenso durch Northern blot Analyse erhöhte mRNA-Konzentrationen für TNF- α nachweisen.

Bei den durch UV-B-Bestrahlung und ionisierenden Strahlen verursachten Schäden an der Haut sind Parallelen zu denen, die durch Schwefellost hervorgerufen werden, erkennbar. Aufgrund der entstehenden DNA-Schäden wird Schwefellost auch als radio-mimetische Substanz bezeichnet. Bei den genannten Strahlenschäden und nach Schwefellost kommt es nach einer Latenzzeit von mehreren Stunden zu einem Erythem und je nach Höhe der Dosis zu Blasenbildung. Wie in der Literatur (Paus et al., 1995) beschrieben, führt die UV-B-Strahlung in Keratinozyten zu einer in p53-kompetenten Zellen zu Apoptosen („sunburn cells“) und damit zum Zelltod der geschädigten Zellen, zum andern kann es jedoch durch die UV-B-Bestrahlung am Zellzyklusregulator p53 zu Punktmutationen kommen, sodass seine Fähigkeit Apoptose zu induzieren, verloren geht. Damit wird der natürliche Reparaturmechanismus, Induktion von Apoptose bei geschädigten Zellen durch p53, ausgeschaltet. Die Anzahl genetisch veränderter Keratinozyten in der Haut nach wiederholter oder intensiver UV-B-Bestrahlung nimmt zu, was sich in der Entstehung von Hauttumoren abzeichnen kann.

Auch Schwefellost kann nach Hautkontakt dosisabhängig zur Entstehung multipler Hauttumoren vom Typ der Basaliome, Plattenepithelkarzinome, Spinaliome und Morbus Bowen führen (Klehr, 1984).

Bei keiner der untersuchten Zelllinien konnte IL-1 β nachgewiesen werden. Die Exposition gegenüber Schwefellost führte auch zu keiner messbaren Erhöhung der IL-1 β -Konzentration (Daten nicht dargestellt). Dieses Ergebnis unterstützt die Beobachtung, dass in Keratinozyten hauptsächlich IL-1 α vorliegt und in geringerem Ausmaß die Vorstufe von IL-1 β . Das Pro-IL-1 β ist inaktiv und muss durch eine spezifische Protease, die in Keratinozyten nicht vorhanden ist, in die aktive Form gespalten werden (Luger und Schwarz, 1990; Nashan und Luger, 1999). Da HaCaT-Zellen immortalisierte Keratinozyten sind und auch die SCL II-Zellen „entartete Keratinozyten“ sind, legen die ermittelten Daten die Vermutung nahe, dass auch bei diesen beiden Zelllinien die spezifische Protease fehlt, die Pro-IL-1 β aktiviert.

Die Messungen von IL-1 α ergaben, dass HaCaT-, SCL II- und A 549-Zellen eine niedrige Basalsekretion haben (≤ 1 pg pro mg Protein), während sich bei den Keratinozyten ab der siebten Stunde nach dem Mediumwechsel ein Wert von 15 pg IL-1 α pro mg Protein im Kulturüberstand einstellte. Keratinozyten produzieren permanent IL-1, welches

durch Zellschädigung sofort freigesetzt wird, um benachbarte Keratinozyten zur Ausschüttung weiterer Entzündungsmediatoren wie IL-1, IL-6 oder IL-8 zu stimulieren (McKenzie und Sauder, 1990). Außerdem regeln Keratinozyten ihr Wachstum selbst über einen doppelt parakrinen Weg. Durch Keratinozyten sezerniertes IL-1 stimuliert angrenzende Fibroblasten, Keratinozyten Wachstumsfaktor (KGF) auszuschütten; dieser fördert das Wachstum der Keratinozyten (Maas-Szabowski et al., 2000).

Nach Schwefellost-Exposition konnte bei A 549- und SCL II-Zellen kein IL-1 α im Überstand nachgewiesen werden. Jedoch führte die S-Lost-Exposition sowohl bei den HaCaT-Zellen als auch bei den Keratinozyten zu einer vermehrten IL-1 α -Ausschüttung. Allerdings zeigten sich große Unterschiede in Bezug auf das Ausschüttungs- bzw. Sekretionsverhalten. Bereits eine Stunde nach der Exposition war bei den Keratinozyten eine Konzentration von über 17 pg pro mg Protein messbar, die sich ab der fünften Stunde zwischen 40 und 50 pg pro mg Protein einpendelte (keine Signifikanz). Auch Zhang et al. konnten nach Schwefellost-Exposition bei perfundierter Schweinehaut eine vermehrte IL-1 α -Ausschüttung feststellen (Zhang et al., 1995). Die IL-1 α -Ausschüttung leitet den Entzündungsprozess ein, indem sie bei Keratinozyten zu einer vermehrten IL-6-Produktion und zur Aktivierung des AP-1 (activator protein-1) und des nuclear factor- κ B (NF- κ B) führt, der im Zusammenwirken mit NF-IL-6 (nuclear factor IL-6) wiederum die IL-6 Expression fördert (Sugawara et al., 2001). Außerdem werden durch das IL-1 in vivo benachbarte Fibroblasten zur Ausschüttung von Keratinozyten Wachstumsfaktor (KGF) angeregt und damit das Wachstum der Keratinozyten gefördert, also der Wundheilungsprozess in Gang gesetzt.

Ebenso konnte im Zellkulturüberstand der HaCaT-Zellen ab der fünften Stunde nach der Exposition eine signifikante Erhöhung der IL-1 α -Konzentration gemessen werden (30 pg/mg Protein), die bis zur achten Stunde auf das Doppelte anstieg.

Alle untersuchten Zelllinien zeigten eine signifikante Erhöhung der IL-6- und der IL-8 - Ausschüttung nach Schwefellost-Exposition. Die durch Alkylierung entstandenen DNA-Schäden nach der S-Lost-Exposition führen zum Anstieg von p53, welches als „Wächter des Genoms“ Apoptose induziert, um Zellen mit DNA-Schäden zu eliminieren. Die Induktion von p53 führt zur Aktivierung des nuklearen Transkriptionsfaktors NF- κ B (Ryan et al., 2000). Die Aktivierung von NF- κ B führt z.B. bei Monozyten zur

Expression von vielen proinflammatorischen Zytokinen, wie z.B. IL-6, IL-1 β und TNF- α (Asea et al., 2000).

In einer zusätzlichen Versuchsreihe mit HaCaT-Zellen konnte für Interleukin 6 gezeigt werden, dass das Ausmaß der Ausschüttung von der eingesetzten Schwefellost-Konzentration abhängt. Je höher die eingesetzte Schwefellost-Dosis war, umso höher war die im Überstand gemessene IL-6-Konzentration.

Dabei wurde als kleinste Schwefellost-Dosis eine Konzentration gewählt, die die Zellproliferation bereits stoppte und auf die metabolische Aktivität noch kaum merklich einen Einfluss hatte. Untersuchungen von Arroyo et al. (1999) zeigten, dass auch bei humanen Keratinozyten IL-6 nach Schwefellost-Exposition konzentrationsabhängig ausgeschüttet wird.

Die Zytokin-Ausschüttung kann individuell verschieden sein kann. Zum einen durch die genetische Disposition (Craven et al., 2001), zum anderen wirken sich auch krankheitsbedingte immunologische Prozesse auf den Zytokinspiegel aus wie z.B. bei Psoriatikern. Die Arbeit von Neuner et al. (1991) belegt, dass Keratinozyten und Monozyten von Psoriatikern mehr IL-6 produzieren als die von gesunden Probanden.

Anhand der Ergebnisse sieht man, dass HaCaT-Zellen und Keratinozyten eine sehr ähnliche Rolle im inflammatorischen Geschehen einnehmen. Beide sezernieren zeitabhängig nach Exposition mit Schwefellost in erhöhtem Maße die Interleukine 1 α , 6, und 8 und TNF- α (Majetschak et al., 1999), bezogen auf die Basalsekretion unter physiologischen Bedingungen (Ansel et al., 1990). Unterschiede sind nur in den Konzentrationsbereichen und im Verlauf der Ausschüttung erkennbar. Eine mögliche Erklärung könnte in der unterschiedlichen Zusammensetzung der Nährmedien liegen. Das in dem Keratinozyten-Medium in geringer Dosis enthaltene Hydrocortison könnte die Zytokin-Ausschüttung reduzieren, wie z.B. die Herabsetzung der IL-6 Produktion in epidermalen Zellen durch Hydrocortison und andere Kortikosteroide zeigt (Kirnbauer et al., 1991).

Die Ergebnisse der Arbeit sprechen dafür, dass für weitere Untersuchungen an Hautzellen HaCaT-Zellen als in-vitro-Modell herangezogen werden können. Das einfachere und unkompliziertere Handling, sowie enorme Kosteneinsparungen bei der Kultivierung solcher permanenter Zelllinien, gestalten die Versuchsreihen kostengünstiger und effizienter. Ein weiterer Vorteil der HaCaT-Zellen gegenüber nativer Keratinozyten ist ihre

Homogenität. Die Zellen stammen von nur einem Spender und zeigen während der Kultivierung keine morphologischen Änderungen im Sinne eines Alterungsprozesses.

Zahlreiche andere Autoren verwendeten diese Zellen bereits als in-vitro-Modell für Untersuchungen an der Haut (Breitkreutz et al., 1998).

Vergleiche mit der Literatur ergeben, dass HaCaT-Zellen ein ähnliches Zytokinmuster zeigen, wie es Keratinozyten beispielsweise nach Bestrahlung mit UV-B oder Kontakt mit Nickelsulfat aufweisen (Barker et al., 1991).

Ein Vergleich aller erhobenen Daten zeigt, dass HaCaT-Zellen als Keratinozyten-Modell geeignet und den SCL II-Zellen vorzuziehen sind. Sie wiesen beim Klonogenizitätstest zwar eine höhere Empfindlichkeit auf als die Keratinozyten, jedoch war die Schwefellost-Konzentration, die zu einer Verminderung der metabolischen Aktivität um 50 % führte bei den 48- und 72-Stunden-Werten fast gleich. Zudem konnten einzig im Überstand der HaCaT-Kulturen nach Schwefellost-Exposition die gleichen Zytokine nachgewiesen werden, wie bei den Keratinozyten-Kulturen.

Alle dargestellten Ergebnisse belegen, dass Ausmaß und Schwere der durch Schwefellost hervorgerufenen Verletzungen abhängig ist von der aufgenommenen Dosis.

Schwefellost beeinträchtigte das Proliferationsverhalten bereits ab einer Konzentration von $0,1 \mu\text{M}$, während die metabolische Aktivität der Zellen (Maß für die Vitalität) erst ab Konzentrationen größer $10 \mu\text{M}$ innerhalb von 24 Stunden abnahm.

Bei der Vitalitätsmessung zeigte sich, dass von entscheidender Bedeutung für die Manifestierung des durch Schwefellost gesetzten Schadens das Intervall zwischen Exposition und Untersuchungszeitpunkt ist. Sowohl der Verlust der metabolischen Aktivität der Zellen als auch die Zytokin-Konzentration im Überstand der Zellkulturen wurden mit zunehmender Zeit nach Exposition größer.

Dies korreliert sehr gut mit der Tatsache, dass Schwefellost-Schäden erst nach einer Latenzzeit von mehreren Stunden festgestellt werden können und sich der Krankheitszustand mit zunehmender Zeit verschlechtert, bis sich ein der Dosis entsprechender Höhepunkt im Krankheitsverlauf abzeichnet.

Die Daten sprechen dafür, dass die Zellen am Rand der Wunde eine Proliferationshemmung aufweisen. Dies könnte die Wundheilung verzögern, bzw. die Entfernung dieser

Zellen die Wundheilung fördern. Dafür sprechen Untersuchungen mit mechanischer oder Laser-chirurgischer Entfernung dieser Zellen (Debridement), die eine beschleunigte Wundheilung zur Folge hatten.

Weiterhin legen die Daten nahe, dass Zytokine bei der Hautschädigungen durch Schwefellost eine bedeutende Rolle spielen und dass durch Gabe von Zytokinantagonisten die überschießende Wirkung von den entsprechenden Zytokinen herabgesetzt werden könnte. Durch Anti-IL-8 z.B. könnte die Neutrophilen-Infiltration herabgesetzt werden. Das Auftreten von Fieber und einer generalisierten Entzündungsreaktion könnte durch die Gabe eines IL-6-Antagonisten gemildert werden. Somit ergeben die Daten der Arbeit eine wichtige Basis für die Entwicklung von Therapeutika zur Behandlung der Hautschädigung durch Schwefellost.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Schwefellost ist ein blasenbildendes Alkylanz, welches auch heute noch eine Bedrohung durch seinen potenziellen Einsatz als chemischen Kampfstoff bei terroristischen Attacken oder durch den akzidentiellen Kontakt mit den sog. Rüstungsaltslasten darstellt.

Die klinischen Effekte auf der Haut nach Kontakt mit Schwefellost treten nach einer Latenzzeit von mehreren Stunden auf. Sie reichen von Rötung über Blasenbildung bis hin zu nekrotischer Geschwürbildung und zeichnen sich durch eine verzögerte sehr lange Wundheilung aus. Eine Kausaltherapie ist bisher noch nicht etabliert. Obwohl die Rolle von inflammatorischen Zytokinen, die nach Kontakt mit toxischen Chemikalien ausgeschüttet werden, bereits untersucht wurde, existieren hinsichtlich Schwefellost nur spärliche Daten. Von besonderem Interesse ist die symptomfreie Latenzzeit nach Schwefellost-Kontamination, in der der inflammatorische Prozess, unter anderem durch die Ausschüttung von Zytokinen, in Gang gesetzt wird. Durch die nähere Untersuchung des Pathomechanismus könnten sich neue Behandlungskonzepte von Schwefellost-Verletzungen ergeben.

Vier verschiedene epitheliale Zelllinien (A 549, SCL II, HaCaT und NHEK) wurden eingesetzt, um den Effekt von Schwefellost auf Proliferationsverhalten, Vitalität und Zytokin-Sekretion näher zu untersuchen und dabei auf Tierversuche verzichten zu können. Es gelang, das Protokoll für die Kultivierung von Keratinozyten aus der Schleimhaut des oberen Aerodigestivtraktes von Saffran et al. (1997) an die Kultivierung von Keratinozyten aus Vorhaut zu adaptieren. Die Optimierung der Keratinozyten-Kulturen konnte durch vollständige Fibroblastenelimierung mittels selektiver Trypsinierung erreicht werden, sodass reine Keratinozyten-Primärkulturen für die Versuchsreihen selber und damit kostengünstiger hergestellt werden konnten.

In den Versuchen konnte gezeigt werden, dass eine Schwefellost-Exposition bei allen vier untersuchten Zelllinien die Proliferation schon in Konzentrationsbereichen hemmte, bei denen noch keinerlei Einfluss auf die Vitalität (gemessen als metabolische Aktivität) der Einzelzelle erkennbar war. Es wurde festgestellt, dass Schwefellost in einer Konzentration unter 2 μM die Koloniebildung bei den epidermalen Zelllinien um 50 % gegenüber den Kontrollkulturen herabsetzte, während dies bei den A 549-Zellen erst bei

einer Konzentration von ca. 13 μM erreicht wurde. Insgesamt wurden durch Schwefellost die HaCaT-Zellen in ihrer Proliferation am stärksten beeinträchtigt, gefolgt von den Keratinozyten und schließlich den SCL II-Zellen.

Der Einfluss von Schwefellost auf die Vitalität der Zellen wurde anhand Messung der metabolischen Aktivität untersucht. Hierbei zeigte sich, dass der zytotoxische Effekt von Schwefellost auf die untersuchten Zellen mit steigender Dosis zunahm, wobei sich die zytotoxische Wirkung mit zunehmendem Zeitintervall zwischen Exposition und Vitalitätsmessung verstärkte.

Der Vergleich der Zelllinien ergab, dass die Vitalität der A 549-Zellen im untersuchten Konzentrationsbereich durch Schwefellost am wenigsten beeinträchtigt wurde. Bei den HaCaT-Zellen konnte im untersuchten Konzentrationsbereich bereits am ersten Tag nach der Exposition (24-Stunden-Wert) ein massiver Vitalitätsverlust beobachtet werden. Bei den 48- und 72-Stunden-Werten war die Schwefellost-Konzentration, bei der nur noch die Hälfte der metabolischen Aktivität (im Vergleich zur Aktivität der Kontrollen) feststellbar war, bei HaCaT-Zellen und Keratinozyten, annähernd gleich.

Es wurde die Zytokin-Ausschüttung in den ersten acht Stunden nach Schwefellost-Exposition untersucht, wobei die Schwefellost-Konzentration so gewählt wurde, dass sie in vivo zu Blasenbildung führte. Die Zytokinmessungen im Zellkulturüberstand zeigten deutlich, dass durch eine Schwefellost-Exposition mit 500 μM für 30 Minuten die Zytokin-Ausschüttung im Vergleich zu den Kontrollkulturen gesteigert wurde, und sie mit zunehmendem Zeitintervall nach der Exposition größer wurde. Während bei den A 549-Zellen nur eine vermehrte Ausschüttung von IL-6 und IL-8 festgestellt werden konnte, zeigte sich bei den SCL II-Zellen nach Schwefellost-Exposition eine gesteigerte Sekretion von IL-6, IL-8 und TNF- α . Bei den HaCaT-Zellen und den Keratinozyten kam es bei allen vier untersuchten Zytokinen (IL-1 α , IL-6, IL-8 und TNF- α) zu einer Konzentrationserhöhung im Kulturüberstand.

Für HaCaT-Zellen konnte gezeigt werden, dass mit zunehmender Schwefellost-Konzentration die Interleukin-6 Konzentration im Zellkulturüberstand anstieg.

Die Daten zeigen, dass nach Exposition mit Schwefellost die Zellproliferation, der Zelltod und die Ausschüttung von Entzündungsmediatoren von der Konzentration und der Zeit nach der Exposition abhängig sind.

Die Ergebnisse sprechen dafür, dass die Entfernung proliferationsgehemmter Zellen die Wundheilung beschleunigen könnte.

Die Daten stützen die Hypothese, dass Keratinozyten, welche den Hauptbestandteil der Epidermis ausmachen und in ihrer Barrierefunktion als erste Zellen durch Schwefellost geschädigt werden, die weitere Reaktion der Haut durch Freisetzung von Zytokinen während der Latenzzeit modulieren. Durch Antagonisierung der Wirkung von IL-6 und IL-8 könnte der Entzündungsprozess beeinflusst werden. Somit ergeben die Daten der Arbeit eine wichtige Basis für die Entwicklung von Therapeutika zur Behandlung der Hautschädigung durch Schwefellost.

Der Vergleich aller erhobenen Daten zeigt, dass von den untersuchten permanenten Zelllinien die HaCaT-Zellen als Keratinozyten-Modell besonders geeignet sind, da sie die Veränderungen in Keratinozyten am besten widerspiegeln.

6 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ADP	Adenosindiphosphat
ANOVA	Analysis of variance (Varianzanalyse)
Bcl2	B cell lymphoma 2, Protoonkogen, Apoptosesuppressor
CSF	Kolonie-stimulierender Faktor
DKFZ	Deutsches Krebsforschungszentrum (Heidelberg)
DMEM	Dulbecco`s modified Eagle Medium
DNA	Deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked immuno sorbent assay
FKS	Fötales Kälberserum
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen – Kolonie-stimulierender Faktor
HaCaT	Humane immortalisierte Keratinozyten-Zelllinie
HSF	Hepatozyten-stimulierender Faktor
IL	Interleukin
KGM	Keratinocyte growth medium (Keratinozyten-Wachstumsmedium)
KGF	Keratinocyte growth factor (Keratinozyten-Wachstumsfaktor)
MEM	Minimum essential medium Eagle
NAD	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
NAP-1	Neutrophil activating peptide-1, Interleukin 8
NF-IL-6	Nuclear factor-IL-6 (nuklearer Transkriptionsfaktor-IL-6)
NF-κB	Nuclear factor-κB (nuklearer Transkriptionsfaktor-κB)
NHEK	Normale humane epidermale Keratinozyten
PBS	Phosphate buffered saline, Phosphatpuffer
RNA	Ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
SCL II	Squamous cell carcinoma line II
SD	Standard deviation, Standardabweichung
SL	Schwefellost, S-Lost
TNF	Tumornekrosefaktor
Upm	Umdrehungen pro Minute
XTT	Natrium 3'- [1-(phenylaminocarbonyl)-3,4-tetrazolium]-bis (4-methoxy-6-nitro) benzolsulfonsäure

7 TABELLEN- UND ABBILDUNGSVERZEICHNIS

7.1 TABELLEN

Tab. 1: Zytokin-Konzentrationen im Überstand von Schwefellost-exponierten und nicht-exponierten Zellen

7.2 ABBILDUNGEN

Abb. 1: Strukturformel von Schwefellost

Abb. 2: Strukturformeln von verschiedenen Stickstofflostverbindungen

Abb. 3: Oberflächliche bis tiefe bullöse Form eines Losthautschadens ca. 16 Stunden nach Exposition

Abb. 4: Ausgedehnte oberflächliche bis mittelschwere bullöse Form eines Losthautschadens ca. 24-48 Stunden nach Exposition

Abb. 5: Veränderung der DNA durch Schwefellost

Abb. 6: Schematische Darstellung des Pathomechanismus der Schädigung durch Schwefellost

Abb. 7: Reaktionsgleichung des XTT-Tests

Abb. 8: Reaktionsprinzip der quantitativen Bestimmung von Zytokinen

Abb. 9: Fibroblasten-haltige Keratinozyten-Kultur

Abb. 10: Reine Keratinozyten-Kultur

Abb. 11-14: Koloniebildung verschiedener kultivierter Zellen nach Inkubation mit Schwefellost

Abb. 15-18: Wirkung von Schwefellost auf die Vitalität verschiedener kultivierter Zellen

Abb. 19-23: TNF- α -Konzentration nach Schwefellost-Exposition im Kulturüberstand verschiedener kultivierter Zellen

Abb. 24-28: IL-1 α -Konzentration nach Schwefellost-Exposition im Kulturüberstand verschiedener kultivierter Zellen

Abb. 29-33: IL-6-Konzentration nach Schwefellost-Exposition im Kulturüberstand verschiedener kultivierter Zellen

Abb. 34-38: IL-8-Konzentration nach Schwefellost-Exposition im Kulturüberstand verschiedener kultivierter Zellen

Abb. 39: Wirkung von Schwefellost auf die Konzentration von IL-6 im Überstand von HaCaT-Zellen

8 LITERATURVERZEICHNIS

Adams, D.H. and Lloyd, A.R. (1997) Chemokines: leucocyte recruitment and activation of cytokines. *Lancet*. **349**, 490-495.

Andus, T., Heinrich, P.C., Castell, J.C., Gerok, W. (1989) Interleukin-6: ein Schlüsselhormon der Akutphase-Reaktion. *Dtsch. Med. Wschr.* **114**, 1710-1716.

Ansel, J., Perry, B., Brown, J., Damm, D., Phan, T., Hart, C., Luger, T., Hefenieder, S. (1990) Cytokine modulation of keratinocyte cytokines. *J. Invest. Dermatol.* **94**, 101-107.

Antilla, H.S., Reitamo, S., Erkko, P., Miettinen, A., Didierjean, L., Saurat, J. H. (1990) Membrane and cytosolic interleukin-1 alpha and beta in normal human epidermal cells: variability of epitope exposure in immunohistochemistry. *J. Invest. Dermatol.* **95**, 31-38.

Arroyo, C.M., Schafer, R.J., Kurt, E.M., Broomfield, C.A., Carmichael, A.J. (1999) Response of normal human keratinocytes to sulfur mustard (HD): cytokine release using a non-enzymatic detachment procedure. *Human & Experimental Toxicology* **18**, 1-11.

Asadullah, K., Döcke, W.D., Reinke, P., Sterry, W., Volk, H.D. (1997) Zytokinbestimmungen. *Dtsch. med. Wschr.* **122**, 1424-1431.

Asea, A., Kraeft, S.K., Kurt-Jones, E.A., Stevenson, M.A., Chen, L.B., Finberg, R.W., Koo, G.C., Calderwood, S.K. (2000) HSP70 stimulates cytokine production through a CD14-dependant pathway, demonstrating its dual role as a chaperone and cytokine. *Nat. Med.*, **6 (4)**, 435-442.

Barker, J.N.W.N., Mitra, R.S., Griffiths, C.E.M., Dixit, V.M., Nickoloff, B.J. (1991) Keratinocytes as initiators of inflammation. *Lancet*, **337**, 211-214.

Beebe, G.W. (1960) Lung cancer in World War I veterans: Possible relation to mustard-gas injury and 1918 influenza epidemic. *J. Nat. Cancer Inst.* **25**, 1231-1252.

Boukamp, P., Petrussevska, R.T., Breitkreutz, D., Hornung, J., Markham, A., Fusenig, N.E. (1988) Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J. Cell Biol.* **106**, 761-771.

Breitkreutz, D., Schoop, V.M., Mirancea, N., Baur, M., Stark, H.J., Fusenig, N.E. (1998) Epidermal differentiation and basement membrane formation by HaCaT cells in surface transplants. *Eur. J. Cell Biol.* **75** (3), 273-286.

Brodie, A.E., and Reed, D.J. (1985) Buthionine sulfoximine inhibition of cystine uptake and glutathione biosynthesis in human lung carcinoma cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **77** (3), 381-387.

Case, R.A.M. and Lea, A.J. (1955) Mustard gas poisoning, chronic bronchitis, and lung cancer; an investigation into the possibility that poisoning by mustard gas in the 1914-18 war might be a factor in the production of neoplasia. *Br. J. Prev. Soc. Med.* **9**, 62-72.

Castells-Rodellas, A., Castell, J.V., Ramirez-Bosca, A., Nicolas, J.F., Valcuende-Cavero, F., Thivolet, J., (1991) Interleukin-6 in normal skin and psoriasis. *Acta Derm Venereol (Stochh).* **72**, 165-168.

Craven, N.M., Jackson, C.W., Kirby, B., Perrey, C., Pravica, V., Hutchinson, I.V., Griffiths, C.E. (2001) Cytokine gene polymorphisms in psoriasis. *Br. J. Dermatol.* **144** (4), 849-853.

Dabrowska, M.I., Becks, L.L., Lelli, J.L., Levee, M.G., Hinshaw, D.B. (1996) Sulfur mustard induces apoptosis and necrosis in endothelial cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **141**, 568-583.

Dickel, H., Fincke, A., Gohr, H. (1952) Vergiftungen mit β,β' -Dichlodiäthylsulfid. Die Medizinische **20**, 686-690.

Dingermann, T. (1999) Gentechnik, Biotechnik. 1. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart. S. 424-451.

Easton, D.F., Peto, J., Doll, R. (1988) Cancers of the respiratory tract in mustard gas workers. Br. J. Ind. Med. **45**, 652-659.

Estler, C.-J. (2000) Pharmakologie und Toxikologie. 5. Auflage, F. K. Schattauer Verlag, Stuttgart.

Forst, H.T. (1985) Probleme des multiplen Testens und Schätzens in der Arzneimittelforschung. Arzneim Forsch/Drug Res. **35 (1)**, Nr. 3, 563-567.

Fox, M. and Scott, D. (1980) The genetic toxicity of nitrogen and sulphur mustard. Mutation Res. **75**, 131-168.

Franke, S. (1977) Militärchemie. 2. überarbeitete Auflage, Militärverlag der Deutschen Demokratischen Republik (VEB), Berlin.

Franke, S., Koehler, K.F., Kostyanovsky, R.G., Kuntsevich, A.D. (1994) Chemie der Kampfstoffe – Umwandlung und Vernichtung. Dr. Koehler mbH, Munster.

Fritsch, P. (1998) Dermatologie und Venerologie: Lehrbuch und Atlas. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

Giard, D.J., Aaronson, S.A., Todaro, G.J., Arnstein, P., Kersey, J.H., Dosik, H., Parks, W.P. (1973) In vitro cultivation of human tumors: Establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. J. Natl. Cancer Inst. **51 (5)**, 1417-1423.

Gillert, E. (1944) Die Kampfstoffverletzungen. Urban & Schwarzenberg, Berlin und Wien.

Graham, J.S., Smith, K.J., Braue, E.H., Martin, J.L., Matterson, P.A., Tucker, F.S., Hurst, C.G., Hackley, B.E. (1997) Improved healing of sulfur mustard-induced cutaneous lesions in the weanling pig by pulsed CO₂ laser debridement. *J. Toxicol. Cutaneous Ocul. Toxicol.* **16** (4), 275-295.

Gross, C.L., Meier, H.L., Papirmeister, B., Brinkley, F.B., Johnson, J.B. (1985) Sulfur mustard lowers nicotinamide adenine dinucleotide concentrations in human skin grafted to athymic nude mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **81**, 85-90.

Guthrie, F. (1860) Ueber einige Derivate der Kohlenwasserstoffe C_nH_n. *Annal. d. Chem. u. Pharm.* **113**, 266-288.

Harris, R. und Paxman, J. (1983) Eine höhere Form des Tötens. Econ Verlag GmbH, Düsseldorf.

Heinsius, E. (1940) Über Kampfstoffwirkungen am Auge. *Münch. med. Wschr.* **14**, 4-5.

Hinshaw, D.B., Lodhi, I.J., Hurley, L.L., Atkins, K.B., Dabrowska, M.I. (1999) Activation of poly [ADP ribose] polymerase in endothelial cells and keratinocytes: role in an in vitro model of sulfur mustard-mediated vesication. *Toxicol. Appl. Pharmacol* **156**, 17-29.

Ibelgaufts, H. (1992) Lexikon - Zytokine. Medikon Verlag, München.

Illig, L. (1977) Die Behandlung der Psoriasis vulgaris mit Schwefel-Lost extern unter besonderer Berücksichtigung ihres möglichen Carcinogenese-Risikos. *Z. Hautkr.* **52** (19), 973-987.

Illig, L. (1977) Die Behandlung der Psoriasis vulgaris mit Schwefel-Lost extern unter besonderer Berücksichtigung ihres möglichen Carcinogenese-Risikos. Zur Cancerogenität von Schwefel-Lost im Tier-Versuch und beim Menschen. *Z. Hautkr.* **52** (20), 1035-1044.

Illig, L., Paul, E., Eyer, P., Weger, N., Born, W. (1979) Die Behandlung der Psoriasis vulgaris mit Schwefel-Lost extern unter besonderer Berücksichtigung ihres möglichen Carcinogenese-Risikos. Mitteilung. Klinisch-experimentelle Untersuchungen über das Ausmaß der percutanen und inhalativen Aufnahme von Schwefel-Lost. *Z. Hautkr.* **54** (21), 941-951.

Inada, S., Hiragun, K., Seo, K., Yamura, T. (1978) Multiple Bowen's disease in former workers of a poison gas factory in Japan, with special reference to mustard gas exposure. *J. Dermatol.* **5**, 49-60.

Katayama, H., Hase, T., Yaoita, H. (1994) Detachment of cultured normal human keratinocytes by contact with TNF α -stimulated neutrophils in the presence of Platelet-Activating Factor. *J. Invest. Dermatol.* **103** (2), 187-190.

Kirchner, H., Kruse, A., Neustock, P., Rink, L. (1993) Cytokine und Interferone; Botenstoffe des Immunsystems. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford.

Kirnbauer, R., Kock, A., Neuner, P., Forster, E., Krutmann, J., Urbanski, A., Schauer, E., Ansel, J.C., Schwarz, T., Luger, T.A. (1991) Regulation of epidermal cell interleukin-6 production by UV light and corticosteroids. *J. Invest. Dermatol.* **96** (4), 484-489.

Kjellstrom, B.T., Persson, J.K., and Runn, P. (1997) Surgical treatment of skin lesions induced by sulfur mustard ("mustard gas")--an experimental study in the guinea pig. *Ann.Acad.Med.Singapore.* **26** (1), 30-36.

Klehr, N.W. (1984) Spätmanifestationen bei ehemaligen Kampfgasarbeitern unter besonderer Berücksichtigung der cutanen Befunde. *Z. Hautkr.* **59**, 1161-1170.

Klimmek, R., Szinicz, L., Weger, N. (1983) Chemische Gifte und Kampfstoffe – Wirkung und Therapie. Hippokrates Verlag, Stuttgart.

Kock, A., Schwarz, T., Kirnbauer, R., Urbanski, A., Perry, P., Ansel, J.C., Luger, T.A., (1990) Human keratinocytes are a source for tumor necrosis factor alpha: evidence for synthesis and release upon stimulation with endotoxin or ultraviolet light. *J. Exp. Med.* **172 (6)**, 1609-1614.

Lehman, T.A., Modali, R., Boukamp, P., Stanek, J. Bennett, W.P., Welsh, J.A, Metcalf, R.A., Stampfer, M.R., Fusenig, N., Rogan, E.M., Hurris, C.C. (1993) p53 mutations in human immortalized epithelial cell lines. *Carcinogenesis.* **14**, 833–839.

Lieber, M., Smith, B., Szakal, A., Nelson-Rees, W., Todaro, G. (1976) A continuous tumor-cell line from a human lung carcinoma with properties of type II alveolar epithelial cells. *Int. J. Cancer.* **17 (1)**, 62-70.

Liersch, K.-M. (1989) Rüstungsaltslasten in Niedersachsen - Bestandsaufnahme, Handlungskonzept. Expertengespräch Rüstungsaltslasten, Niedersächsisches Umweltministerium, Hannover.

Lohs, K. (1974) Synthetische Gifte, vierte überarbeitete und ergänzte Aufl., Militärverlag der Deutschen Demokratischen Republik (VEB), Berlin.

Luger, T.A. und Schwarz, T. (1990) Evidence for an epidermal cytokine network. *J. Invest. Dermatol.* **95 (6)** 100S-104S.

Luster, A.D. (1998) Chemokines - chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N. Engl. J. Med.* **338**, 436-445.

Maas-Szabowski, N., Stark, H.J., Fusenig, N.E. (2000) Keratinocyte growth regulation in defined organotypic cultures through IL-1 induced keratinocyte growth factor expression in resting-fibroblasts. *J. Invest. Dermatol.* **114** (6), 1075-1084.

Majetschak, M., Flohe, S., Obertacke, U., Schroder, J., Staubach, K., Nast-Kolb, D., Schade, F.U., Stuber, F. (1999) Relation of a TNF gene polymorphism to severe sepsis in trauma patients. *Ann. Surg.* **230** (2), 207-214.

McKenzie, R.C. and Sauder, D.N. (1990) The role of keratinocyte cytokines in inflammation and immunity. *J. Invest. Dermatol.* **95** (6), 105-107.

Meier, H.L., Gross, C.L., Papirmeister, B. (1987) 2,2'-dichlorodiethyl sulfide (sulfur mustard) decreases NAD⁺ levels in human leukocytes. *Toxicol. Lett.* **39**, 109-122.

Meyer, V. (1886) Ueber Thiodiglykolverbindungen. *Ber. d. Dtsch. chem. Ges.* **19**, 3259-3266.

Mol, M.A., van de Ruit, A.-M.B.C., Kluivers, A.W. (1989) NAD⁺ levels and glucose uptake of cultured human epidermal cells exposed to sulfur mustard. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **98**, 159-165.

Momeni, A.Z., Enshaeih, S., Meghdadi, M., Amindjavaheri, M. (1992) Skin manifestations of mustard gas. *Arch. Dermatol.* **128**, 775-780.

Mosmann, T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* **65**, 55-63.

Motakallem, M.H. (1988) Evaluation of 17 patients severely injured with sulfur mustard. *M.J.I.R.I.* **2** (2), 99-104.

Muntsch, O. (1941) Leitfaden der Pathologie und Therapie der Kampfstoffkrankungen. Georg Thieme Verlag, Leipzig.

Nashan, D., Luger, T.A. (1999) Interleukin 1. *Der Hautarzt.* **50**, 680-688.

Nashan, D., Luger, T.A. (1999) Interleukin 1. *Der Hautarzt.* **50**, 756-763.

Neuner, P., Urbanski, A., Trautinger, F., Moller, A., Kirnbauer, R., Kapp, A., Schopf, E., Schwarz, T., Luger, T.A. (1991) Increased IL-6 production by monocytes and keratinocytes in patients with psoriasis. *J. Invest. Dermatol.* **97 (1)**, 27-33.

Niemann, A. (1860) Ueber die Einwirkung des braunen Chlorschwefels auf Elaylgas. *Annal. d. Chem. u. Pharm.* **113**, 288-292.

Nozaki, S., Feliciani, C., Sauder, N. (1991) Keratinocyte cytokines. *Adv. Dermatol.* **7**, 83-100.

Owens, R.B., Smith, H.S., Nelson-Rees, W.A., Springer, E.L. (1976) Brief communication: Epithelial cell cultures from normal and cancerous human tissues. *J. Natl. Cancer Inst.* **56**, 843-849.

Papirmeister, B., Gross, C.L., Meier, H.L., Petralli, J.P., Johnson, J.B. (1985) Molecular basis for mustard-induced vesication. *Fundam. Appl. Toxicol.* **5**, S134-S149.

Papirmeister, B., Feister, A.J., Robinson, S.I., Ford, R.D. (1991) Medical defense against mustard gas - Toxic mechanisms and pharmacological implications. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida.

Paus, R., Menrad, A., Czarnetzki, B.M. (1995) Nekrobiologie der Haut: Apoptose. *Hautarzt.* **46**, 285-303.

Pechura, C.M., and Rall, D.P. (1993) Veterans at risk: The health effects of mustard gas and Lewisite. National Academy Press Washington, D.C.

Pischke, G. (1989) Rüstung im 2. Weltkrieg – Standorte, Produktion, Recherche. Expertengespräch Rüstungsaltslasten, Niedersächsisches Umweltministerium, Hannover.

Ray, R., Legere, R.H., Majerus, B.J., Petrali, J.P. (1995) Sulfur mustard-induced increase in intracellular free calcium level and arachidonic acid release from cell membrane. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **131**, 44-52.

Rheinwald, G.J., and Green, H. (1975) Serial Cultivation of Strains of Human Epidermal Keratinocytes: The formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell.* **6**, 331-344.

Richter, W. (1941) Kampfstoffwirkung und Heilung. Wehr und Wissenschaft, Band 26. Verlag von Johann Ambrosius Barth, Leipzig.

Roeb, E., and Rose-John, S. (1996) Zytokine: Biologie und therapeutische Relevanz. *Dtsch. med. Wschr.* **121**, 803-809.

Rosenthal, D.S., Iyer, S., Spoonde, A., Smith, W., Ray, R., Smulson, M.E. (1998) Sulfur mustard induces markers of terminal differentiation and apoptosis in keratinocytes via a Ca²⁺-calmodulin and caspase-dependent pathway. *J. Invest. Dermatol.* **111** (1), 64-71.

Ryan, K.M., Ernst, M.K., Rice, N.R., Vousden, K.H. (2000) Role of NF-kappaB in p53-mediated programmed cell death. *Nature* **404**, 892-897.

Saffran, S., Gorogh, T., Lippert, B.M., Werner, J.A. (1997) Kultivierung humaner Keratinozyten der Schleimhaut des oberen Aerodigestivtraktes. *Laryngo-Rhinotologie.* **76** (2), 101-105.

Scudiero, D.A., Shoemaker, R.H., Paull, K.D., Monks, A., Tierney, S., Nofziger, T.H., Currens, M.J., Seniff, D., Boyd, M.R. (1988) Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer Res.* **48**, 4827-4833.

Schumacher, K. (1984) *Militärtoxikologie und Militärradiologie*. Militärverlag der DDR, Berlin.

Smith, K.J., Hurst, C.G., Moeller, R.B., Skelton, H.G., Sidell, F.R. (1995) Sulfur mustard: its continuing threat as a chemical warfare agent, the cutaneous lesions induced, progress in understanding its mechanism of action, its long-term health effects, and new developments for protection and therapy. *J. Am. Acad. Dermatol.* **32 (5)**, 1, 765-776.

Smith, W.J., Gross, C.L., Chan, P., Meier, H.L. (1990) The use of human epidermal keratinocytes in culture as a model for studying the biochemical mechanisms of sulfur mustard toxicity. *Cell Biol. Toxicol.* **6 (3)**, 285-291.

Smith, W.J., Sanders, K.M., Caulfield, J.E., Gross, C.L. (1992) Sulfur mustard-induced biochemical alterations in proliferating human cells in culture. *J. Toxicol.-Cut. & Ocular Toxicol.* **11 (4)**, 293-304.

Snell, J., Lillquist, D.R., Lewis-Younger, C., Wallace, D.O. (2000) Exposure at home to airborne concentrations of nitrogen mustard during topical application for the treatment of mycosis fungoides: A case study. *Dermatology* **200**, 124-128.

Spiegelhoff, W. und Watrin, H. (1953) Über funktionelle Spätschäden am Magen nach Lostvergiftung. *Münch. med. Wschr.* **10**, 287-289.

Steinkopf, W., Herold, J., Stöhr, J. (1920) Über das Thiodiglykolchlorid und einige Abkömmlinge desselben. *Ber. d. Dtsch. chem. Ges.* **53**, 1007-1012.

Sugawara, T., Gallucci, R.M., Simeonova, P.P., Luster, M.I. (2001) Regulation and role of interleukin 6 in wounded human epithelial keratinocytes. *Cytokine* **15 (6)**, 328-336.

Szinicz, L. (1994) Chemische Kampfstoffe. In: Marquardt, H. und Schäfer, S.G. Lehrbuch der Toxikologie. Wissenschaftsverlag Mannheim, Leipzig, Wien, Zürich, S. 571-588.

Theobald, N. (1996) Chemische Kampfstoffmunition in der Ostsee. *Wasser & Boden*, 48. Jahrg. 8, 16-20.

Tilgen, W., Boukamp, P., Breitkreutz, D., Dzarlieva, R., Engster, M., Haag, M., Fusenig, N.E. (1983) Preservation of morphological, functional and karyotypic traist during longterm culture and in vivo passage of two human skin squamous cell carcinomas. *Cancer Res.* **43**, 5995-6011.

Turanow, N.M., Trofimowa, L.J., Bolschakowa, G.M., Chapilowa, W.I. (1977) Erfahrungsbericht aus der UdSSR über die Behandlung Psoriasis-Kranker mit „Psoriasin“. *Z. Hautkr.* **52 (20)**, 1045-1049.

Von den Velden, R. (1921) Über Kampfgasvergiftungen. X. Klinik der Erkrankungen nach Dichloräthylsulfidvergiftungen. *Z. f. d. g. exp. Med.* **14**, 1-27.

Wada, S., Nishimoto, Y., Miyanishi, M., Kambe, S., Miller, R.W. (1968) Mustard gas as a cause of respiratory neoplasia in man. *Lancet*, June, **I**, 1161-1163.

Weislow, O.S., Kiser, R., Fine, D.L., Bader, J., Shoemaker, R.H., Boyd, M.R. (1989) New soluble-formazan assay for HIV-1 cytophatic effects: Application to high-flux screening of synthetic and natural products for AIDS-antiviral activity. *J. Natl. Cancer Inst.* **81**, 577-586.

Weiß, A. und Weiß, B. (1975) Karzinogenese durch Lost-Exposition beim Menschen, ein wichtiger Hinweis für die Alkylantien-Therapie. Dtsch. med. Wschr. **100**, 919-923.

Werrlein, R.J., Hamilton, T.A., Madren-Whalley, J.S. (1998) Development of human keratinocyte colonies for confocal microscopy and for study of calcium effects on growth differentiation and sulfur mustard lesions. In: Toxicity assessment alternatives: Methods, issues, opportunities, Salem, H., Katz, S.A.. Humana Press Inc., Totowa, NJ, pp. 165-174.

Willems, J.L. (1989) Clinical management of mustard gas casualties. Ann. Med. Milit. Belg. **3**, 1-16.

Yanagida, J., Hozawa, S., Ishioka, S., Maeda, H., Takahashi, K., Oyama, T., Takashi, M., Hakoda, M., Akiyama, M., Yamakido, M. (1988) Somatic mutation in peripheral lymphocytes of former workers at the Okunojima poison gas factory. Jpn. J. Cancer Res. **79**, 1276-1283.

Zhang, Z., Riviere, J.E., Monteiro-Riviere, N.A. (1995) Topical sulfur mustard induces changes in prostaglandins and interleukin-1 α in isolated perfused porcine skin. In Vitro Toxicol. **8 (2)**, 149-158.

DANKSAGUNG

Zu allererst gebührt mein Dank Herrn Prof. Dr. med. Ladislaus Szinicz, Leiter des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie an der Sanitätsakademie der Bundeswehr, München.

Bedanken möchte ich mich bei ihm für die freundliche Überlassung des Themas und die Ermöglichung der experimentellen Arbeiten in den Räumlichkeiten seines Institutes.

Herrn Dr. Kai Kehe möchte ich herzlich für die fachlich fruchtbare und persönlich gewinnbringende Zusammenarbeit danken.

Ein großes Dankeschön gilt der Arbeitsgruppe „Kehe“ für ihre Unterstützung während meiner Zeit im Labor.

LEBENS LAUF

NAME: Gudrun Krebs geb. Reuter
GEBURTSDATUM: 30. 03. 1971
GEBURTSORT: Mayen
ELTERN: Dietrich Reuter, Lehrer
Elisabeth Reuter geb. Peters, Lehrerin

AUSBILDUNG

1977-1981 Grund- und Hauptschule Burgbrohl
1981-1990 Gymnasium Calvarienberg, Ahrweiler
1990 Abitur
1990-1995 Studium der Pharmazie an der Johannes-Gutenberg-Universität, Mainz
1995-1996 Praktikum in der Rhein-Apotheke, Mainz
1996 Approbation

BERUF

1996-1998 Apothekerin in der Rosen- Apotheke, Koblenz
1998-2001 Wissenschaftliche Mitarbeiterin im Institut für Pharmakologie und Toxikologie an der Sanitätsakademie der Bundeswehr, München
2001-2002 Referentin im Bundesministerium der Verteidigung, Bonn
seit August 2002 Elternzeit