

Aus dem Walther-Straub-Institut für Pharmakologie und Toxikologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München
komm. Vorstand: Prof. Dr. med. Peter Eyer

**Zur Schädigung von A549 Zellen
durch Stickstoffdioxid (NO₂) und
zur Wirkung von Glucocorticoiden in vitro**

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

vorgelegt von

Alexander Hartl

aus

Bad Aibling

2006

Meinen Eltern

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: PD Dr. med. Dr. rer. nat. Harald Mückter

Mitberichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Bernhard F. Becker

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter:

Dekan: Prof. Dr. med. Dietrich Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 15.11.2006

Die experimentellen Arbeiten zu dieser Dissertationsschrift wurden von August 2002 bis März 2004 am Walther-Straub-Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität München ausgeführt.

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	In vitro Modelle zum Studium volatiler Gifte	1
1.2	Reizgase	9
1.2.1	Hydrophile Reizgase (hohe Wasserlöslichkeit)	10
1.2.2	Mäßig hydrophile Reizgase (mittlere Wasserlöslichkeit).....	10
1.2.3	Wenig hydrophile Reizgase (geringe Wasserlöslichkeit)	10
1.3	NO₂ als Reizgas	10
1.3.1	Physikochemische Eigenschaften von NO ₂	10
1.3.2	Wirkungen von NO ₂ in Organismen	12
1.3.3	Zur Bedeutung von NO ₂ -Vergiftungen	14
1.3.4	Gesundheitlich relevante Richtwerte beim Umgang mit NO ₂	14
1.4	Pathophysiologische Veränderungen bei Reizgasvergiftungen	15
1.5	Therapeutische Optionen bei Reizgasvergiftungen	16
1.6	Glucocorticoide	16
1.6.1	Strukturmerkmale von Beclomethason und Budesonid	16
1.7	Fragestellung und Ziele der Arbeit	18
2	MATERIALIEN UND METHODEN	19
2.1	Geräte	19
2.2	Chemikalien und Feinbiochemika	19
2.3	Materialien für die Zellkultur	20
2.3.1	Zellen	20
2.3.2	Zellkulturmedien und -lösungen.....	20
2.4	Zellkulturtechnik	20
2.4.1	Zellzüchtung	20
2.4.2	Zellpassage	20
2.5	Versuchsapparatur	21
2.5.1	Aufbau der Apparatur	21
2.5.2	Inbetriebnahme der Apparatur	27
2.6	Biochemische Methoden	28
2.6.1	Glutathion-Bestimmung	28

2.6.2	Proteinbestimmung	30
2.6.3	Bestimmung der NO ₂ -Disproportionierungsprodukte	31
2.7	Morphologie.....	33
2.8	Zellvitalität	33
2.9	Auswertung und Statistik.....	34
3	ERGEBNISSE	35
3.1	Funktionsprüfung der Apparatur (zellfreie Versuche)	35
3.1.1	Nitritbildung unter verschiedenen Expositionsszenarien	35
3.1.2	Zeitlicher Verlauf der Nitritbildung aus NO ₂	43
3.1.3	NO ₂ -Extraktion bei unterschiedlicher Strömungsrichtung	44
3.2	Expositionsversuche mit Zellen	45
3.2.1	Einfluss der Verweilzeit des Mediums auf den GSX-Gehalt	45
3.2.2	Wahl der NO ₂ -Konzentration	46
3.2.3	Konzentrations-/Wirkungs-Kurve	48
3.2.4	Erholungsversuche: Wahl der Glucocorticoidkonzentration.....	50
3.2.5	Wirkungen von Glucocorticoiden auf NO ₂ -exponierte Zellen.....	52
4	DISKUSSION	57
4.1	Zusammenfassung der Ergebnisse	57
4.2	Apparatur.....	58
4.3	NO₂-Exposition.....	60
4.4	Spontanerholung	61
4.5	Wirkungen von Beclomethason und Budesonid.....	61
4.6	Ausblick	62
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	63
6	ANHANG.....	66
7	LITERATURVERZEICHNIS.....	82
8	DANKSAGUNG.....	84
9	LEBENS LAUF.....	85

Abkürzungen

CAS	Chemical Abstract Service
ARDS	Acute Respiratory Distress Syndrome
CBG	Carbogen™ Gas (= 95% O ₂ + 5% CO ₂)
DAD	Diffuse Alveolar Damage (diffuser Alveolarschaden)
DMEM-F12mix	Dulbecco's Modified Eagle Medium / Ham F12 Medium
DTNB	Bis-(4-nitrophenyl)-disulfid-3,3'-dicarbonsäure
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraacetat
GC	Glucocorticoide
GR	Glutathion-Reduktase
GSH	Reduziertes Glutathion
GSSG	Oxidiertes Glutathion
GSX	Gesamt-Glutathion (= GSH + GSSG)
HBSS	Hanks's Balanced Salt Solution
KPP	Kaliumphosphatpuffer
MAK	Maximale Arbeitsplatz Konzentration
NAD/NADH	Nicotinamidadenindinukleotid (oxidiert bzw. reduziert)
NADP/NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (oxidiert bzw. reduziert)
NNED	N-(1-Naphthyl)-ethylendiamindihydrochlorid
ppm	parts per million (1 auf 1.000.000)
SNK	Student-Newman-Keuls Test (post-hoc Test mehrerer Gruppen)
TRA	Triethanolaminhydrochlorid
PTFE	Polytetrafluorethylen
Fl	Flasche
Wafra	Waschflasche

1 Einleitung

1.1 In vitro Modelle zum Studium volatiler Gifte

In dieser Arbeit wird eine neue Apparatur zur Exposition von Zellkulturen gegenüber volatilen Giftstoffen und -gasen vorgestellt. Der Umgang mit volatilen Stoffen in Zellkulturen hat aufgrund der apparativen Probleme, die die kontrollierte Heranführung von Gasen an kultivierte Zellen mit sich bringt, in der Vergangenheit zu verschiedenen apparativen Lösungen geführt, die hier kurz angesprochen werden, um die Besonderheiten (Vorzüge oder Nachteile) der eigenen Apparatur herauszustellen. Abb. 1.1 zeigt eine Übersicht über die in der Vergangenheit erprobten Versuchsanordnungen.

Testapparatur:	Gas:	Zelltyp:	Literatur:
A) Zellen in Zellkulturflaschen, mit Bodenöffnung und Loch im Deckel (modifizierte T-60 Glaskolben); über daran befestigte Schläuche werden die Flaschen kontinuierlich vom Gas durchströmt	- NO ₂	- Lungenfibroblasten (L929) Maus	[1]
B) Zellen auf Milliporefilter, der in einem speziellen Halter eingespannt ist; die Begasung erfolgt über den Halter von unten durch den Filter	- NO ₂ - O ₃	Lungenfibroblastenzellen (V79) Hamster	[2] [3]
C) Zellen auf Petrischalen, die sich auf einer schaukelnden Plattform in einer vom Gas durchströmten Kammer befinden	- O ₃	Lungenfibroblastenzellen (WI38) Mensch	[4]
D) Zellen auf speziellen Schälchen mit gasdurchlässigem Boden in einer vom Gas durchströmten Kammer	- O ₃	Lungenfibroblastenzellen (V79) Hamster	[5]
E) "roller cultures": Zellen in drehenden, runden Flaschen; nicht mitdrehende Deckel und daran angebrachte Schläuche sorgen für kontinuierlichen Gasstrom	- O ₃	- Nierenepithelzellen (MDBK) Rind	[6]

Testapparatur:	Gas:	Zelltyp:	Literatur:
F) Zellen auf zweiphasiger Membran; die Membran befindet sich auf einem Schälchen, das mit Nährmedium gefüllt ist (Luft / Flüssigkeits-Barriere) Die Begasung erfolgt über verschiedene Systeme	- NO ₂	Bronchialepithelzellen (BEAS-2B) Mensch	[7]
	- NO ₂ - O ₃ - DEPs ⁽¹⁾ - IP ⁽²⁾ - UAP ⁽³⁾	- Alveolarmakrophagen - Alveolarepithelzelle Typ II vertreten durch A549-Zellen - Bronchialepithelzellen Mensch	[8]
	- NO ₂ - O ₃ - SA ⁽⁴⁾	- Lungenfibroblasten (Lk004) - Bronchialepithelzellen (HFBE-21) Mensch	[9]

Tab. 1.1: Methoden aus der Vergangenheit, kultivierte Zellen einem flüchtigen Gastrom auszusetzen

(1) DEPs: Diesel exhaust particles

(2) IP: Industrial pollutants (CO₂; H₂O-Dampf; NO_x; SO_x; HCl-Dampf) [10]

(3) UAP: Urban Air pollutants (NO, NO₂, SO₂, O₃, CO, Gesamtkohlenwasserstoffe) [11]

(4) Synthetic Air (20,5% O₂ in N₂)

Für Versuchsanordnungen, die eine kontrollierte Exposition von kultivierten Zellen in einem kontinuierlichem Gastrom ermöglichen, wurden folgende Kriterien aufgestellt [3]:

- 1) Präzise Gasfluss-Kontrolle (Input/Output-Balance)
- 2) Intensiver Gas-Zell-Kontakt, am besten ohne dass das Nährmedium den Gas-Zell-Kontakt behindert, aber unter Vermeidung von Austrocknung (Artefakte!)
- 3) Langfristige Expositionsmöglichkeiten
- 4) Flexible Versuchsprotokolle mit der Möglichkeit fraktionierter Exposition und Nachexposition (zur Probennahme, für "Therapie"versuche).

Im folgenden sollen die Merkmale der einzelnen Versuchsanordnungen aus Tab. 1.1 kurz skizziert werden:

Zu **A)** Pace und Mitarbeiter wählten modifizierte T60 Glaskolben für ihre Exposition von L929 Zellen gegenüber NO₂-Gas [1]. Diese Kolben in Normschliffausführung erlauben eine direkte Gasführung über den Zellrasen hinweg (Abb. 1.1). Dabei ist der Zellrasen ständig vom Medium bedeckt (sog. "indirekte" Exposition), durch Drehung aus der Ruhelage können die Zellen direkt exponiert werden, vom Gas lediglich durch einen dünnen Flüssigkeitsfilm getrennt. Das Problem dieser Anordnung ist beim

indirekten Modus die Interferenz des Nährmediums mit dem Prüfgas, beim direkten Kontakt die Gefahr der Austrocknung der Zellen, nachdem das Medium abgelaufen ist [1].

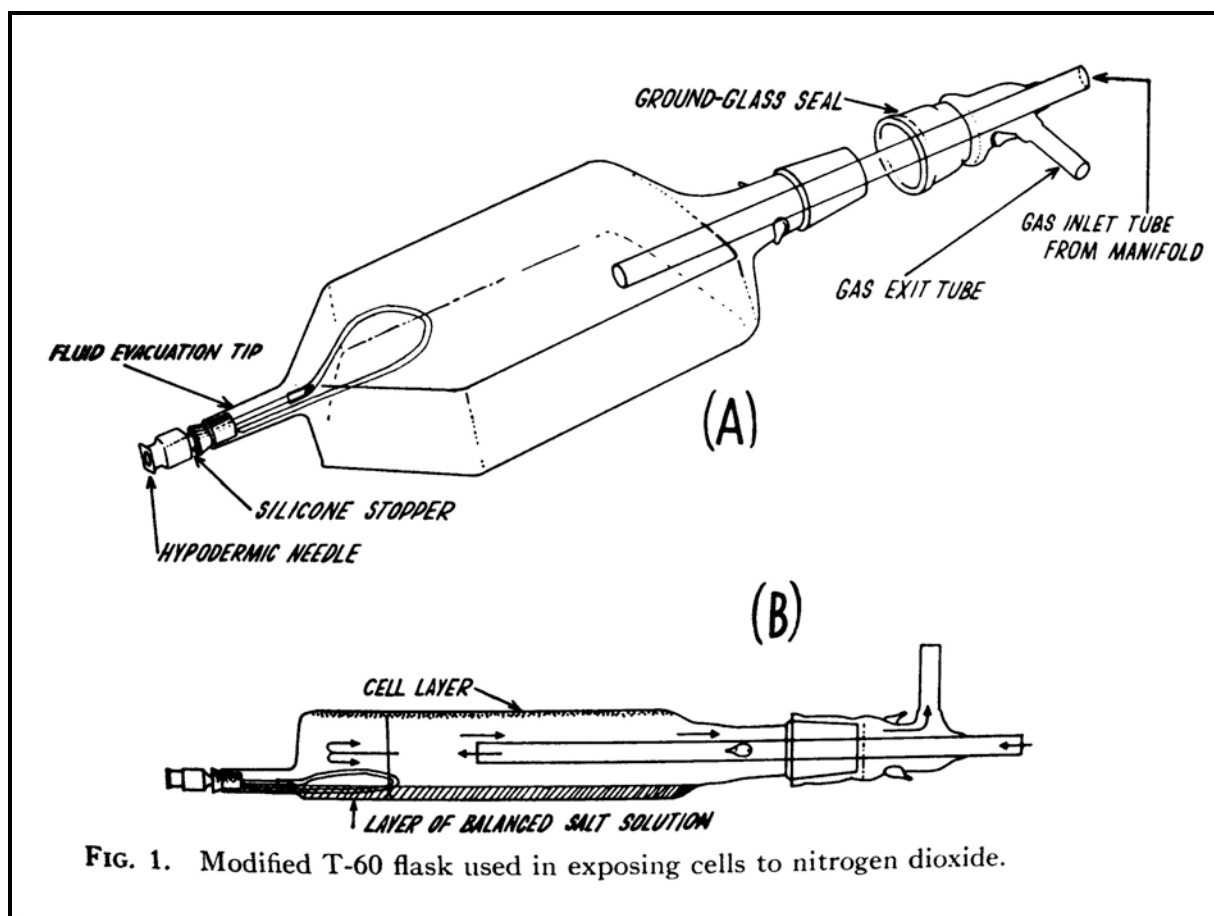


Abb. 1.1: Apparatur von Pace et al. [1]

Zu **B)** Samuelsen und Mitarbeiter entwickelten eine Apparatur, in der Zellen einem Gastrom ausgesetzt werden konnten, während sie gleichzeitig durch den Kontakt zum Nährmedium vom Austrocknen bewahrt wurden [2]. V79 Zellen wurden hierfür auf Millipore-Filter (Typ HAWP, aus Nitrozellulose) ausgebracht. Diese wurden in spezielle Edelstahlhalter eingespannt, wobei die Zellen oben auf waren. Die untere Kammer der Halter war mit Kulturmedium gefüllt, das über einen Zulauf erneuert werden konnte (Abb. 1.2). Die Exposition erfolgte in einer hermetischen Kammer mit Ein- und Auslass für das Prüfgas. Zu Versuchsbeginn wurde überschüssiges Nährmedium durch Umdrehen des Halters von den Zellen entfernt, die Versorgung der Zellen erfolgte fortan über den Zulauf der unteren Kammer. Rasmussen und Crocker verbesserten durch Anbringen einer Schlauchdrainage das Entfernen des Nährmediums. Diese Methode hatte den Vorteil, dass das während einer Exposition

durch die Filter durchgetretene Medium ebenfalls abgesaugt werden konnte [3]. Auffällig war, dass die Zellen in dieser Kammer sensibler waren als im Pace-System. Es wurde spekuliert, dass durch das Eindringen der Zellen in die Filterporen eine wesentlich größere Zelloberfläche dem Gasstrom ausgesetzt ist, die empfindlicher auf die Testgase reagiert [12].

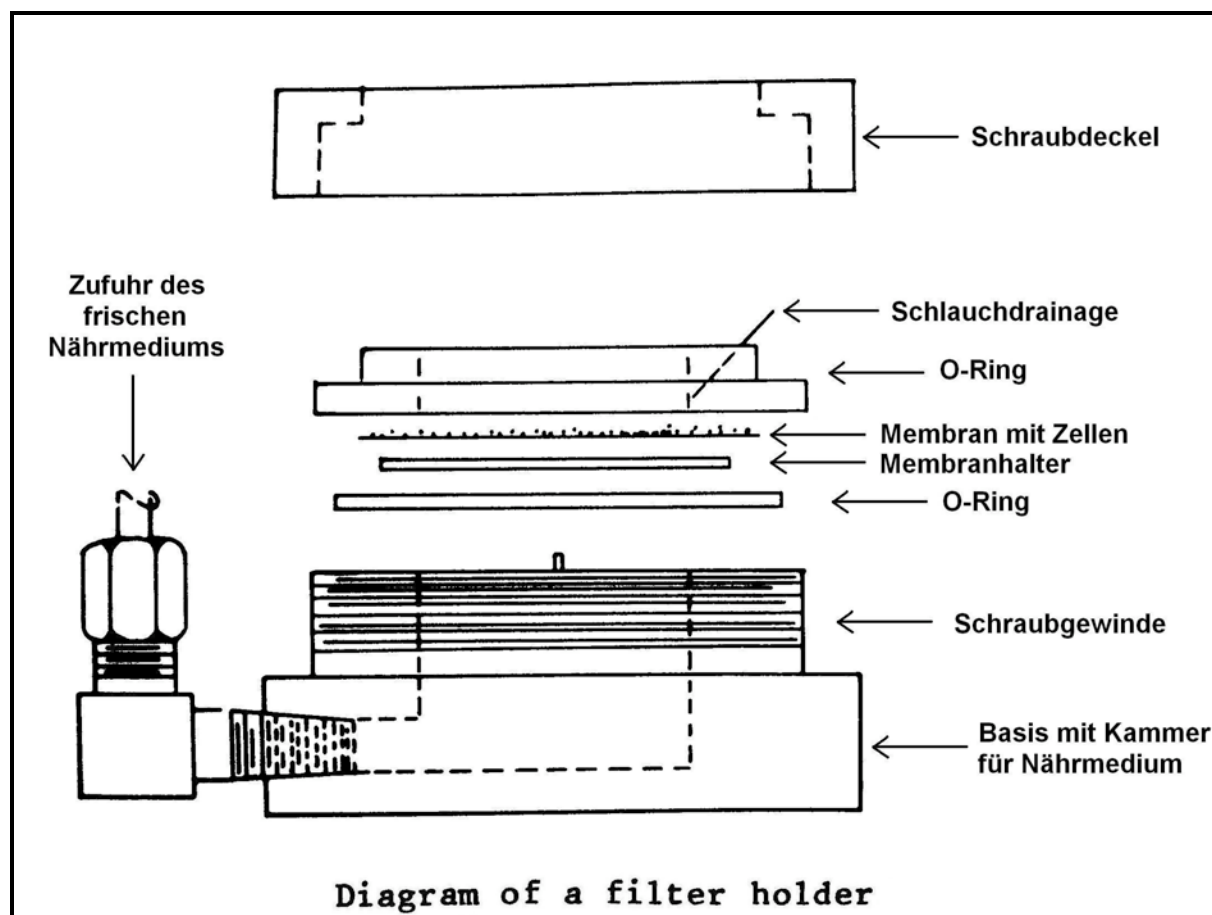


Abb. 1.2: Apparatur von Rasmussen und Crocker [3]

Zu C) Guerrero und Mitarbeiter untersuchten das Verhalten von WI38 Zellen gegenüber O_3 in Petrischalen aus Kunststoff, die auf einer Plattform in einem hermetischen Inkubator untergebracht waren und auf einer Taumelvorrichtung periodisch (2/min) bewegt wurden (Abb. 1.3). So war gewährleistet, dass die Zellen immer wieder direkt dem Gas ausgesetzt waren, aber nicht austrockneten. Zytotoxische Effekte traten bei diesem System bei etwa 1ppm O_3 auf. Ein Nachteil dieser Anordnung sind die teuren Apparaturteile (Edelstahlausführung!) [4].

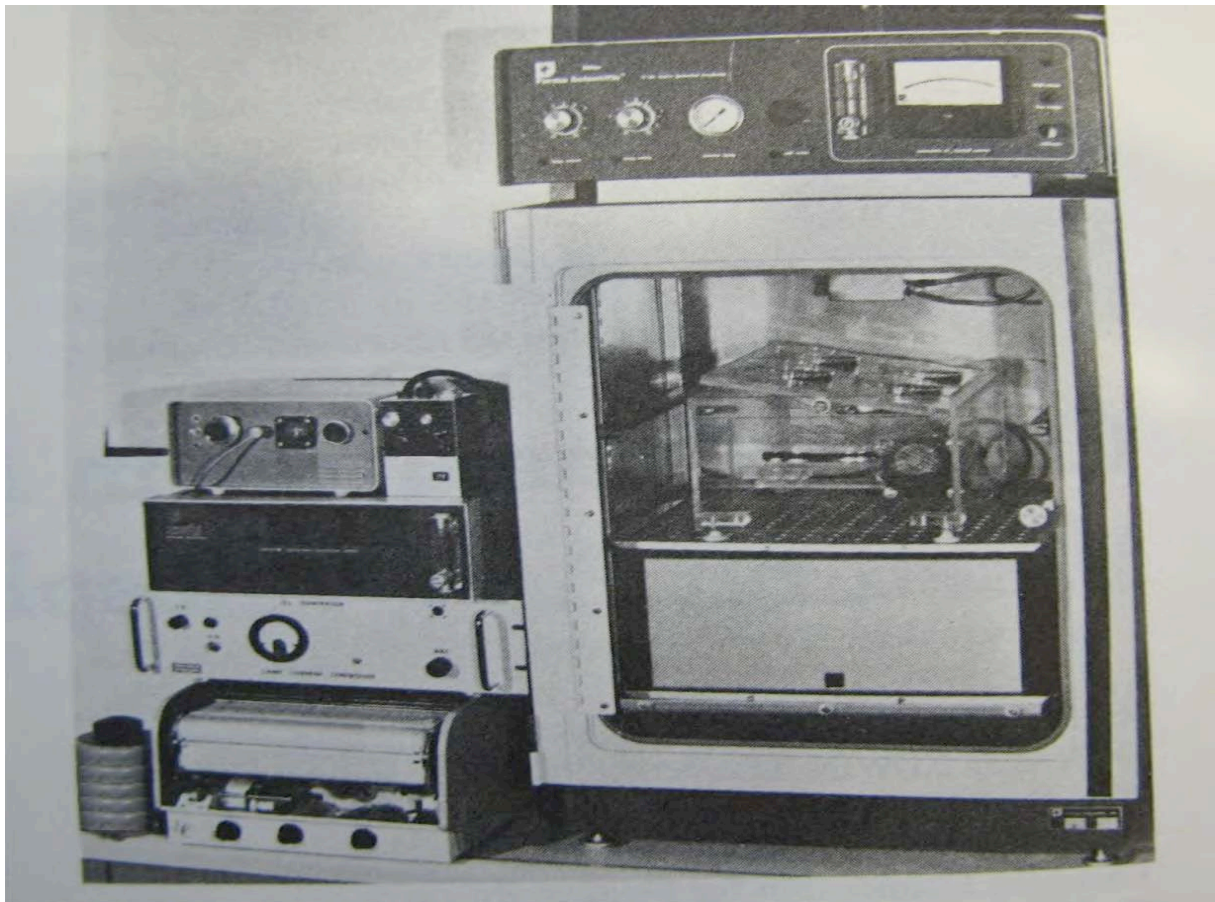


Abb. 1.3: Apparatur von Guerrero et al. [4]

Zu D) Alink und Mitarbeiter verwendeten für ihre Expositionsversuche eine Kunststoffschale, in der V79 Zellen direkt einem Ozongasstrom ausgesetzt wurden. Der Boden der Schale war als gasdurchlässige Kunststoffmembran aus Poly-Fluor-Ethylen/Propylen (Schichtdicke $25\mu\text{m}$; Abb. 1.4) ausgeführt. Auf der aufgerauten Membran wurden die Zellen ausgesät. Ein Teflonring, ein Deckel und eine Glasabdeckung sorgten dafür, dass Sterilität herrschte, während die Zellen dem Gasfluss ausgesetzt waren. Bis zu 4 solcher Petrischalen wurden pro Versuch in einem begasten Inkubator untergebracht. Nachteilig war die schwierige Dosimetrie, da die Zellen erst nach dem Durchtritt des Gases durch die Membran mit diesem in Kontakt kamen. Außerdem zeigten unterschiedliche Membranen eine deutlich variierende Ozonpermeation. Hohe externe Ozonkonzentrationen wurden benötigt, um in den Zellen Reaktionen hervorzurufen.

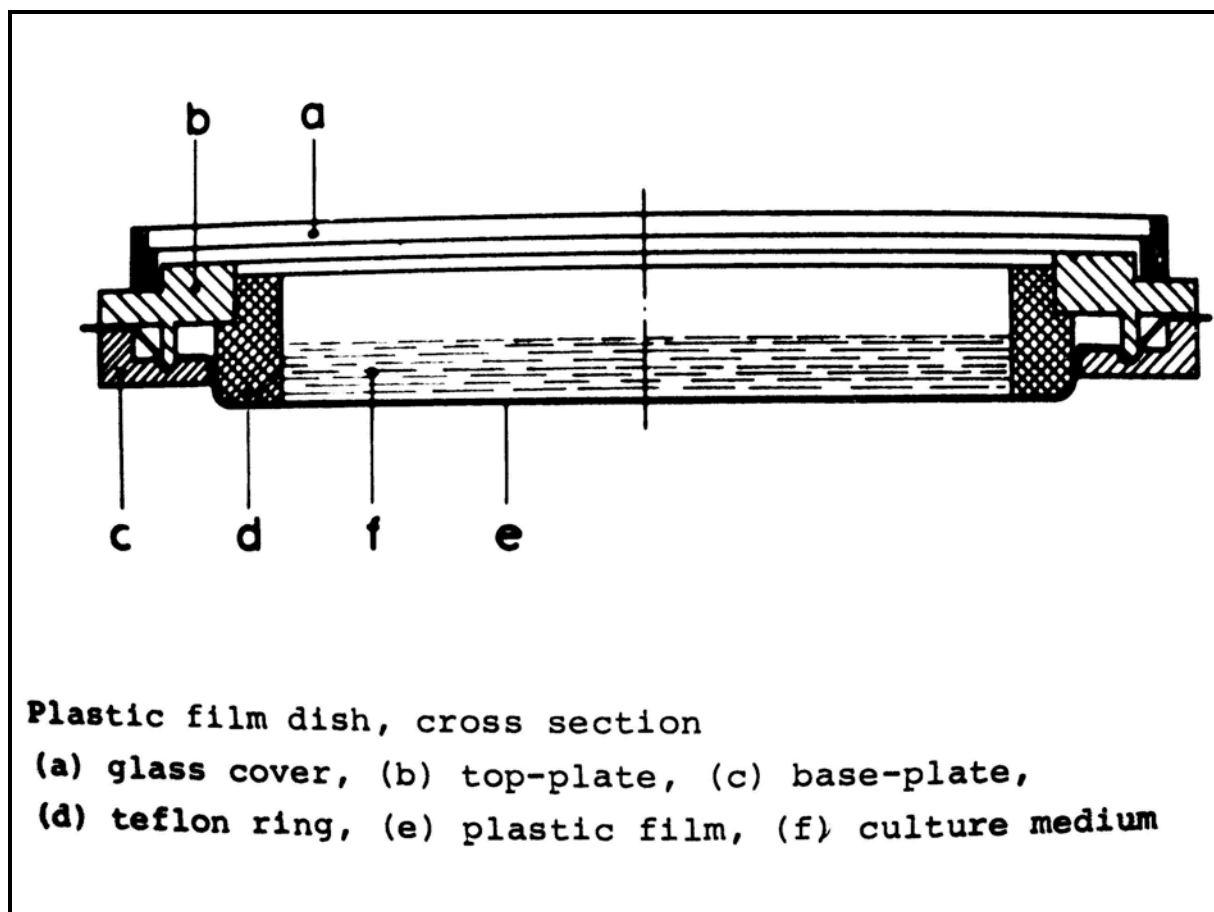


Abb. 1.4: Apparatur von Alink et al. [5]

Zu E) Bolton und Mitarbeiter entwickelten ebenfalls ein System mit direktem Zell-Gas-Kontakt, das gleichzeitig ein Austrocknen der Zellen verhinderte. In Rundflaschen aus Borosilicat ließ man die Zellen an der Wand anwachsen (Abb. 1.5). Eine besondere Deckelkonstruktion erlaubte ein Rotieren der Flaschen um ihre Längsachse. Die langsame Rotation der Flaschen sorgte dafür, dass immer ein Teil der Zellen gerade vom Nährmedium bedeckt war, um das Austrocknen zu verhindern, während der Rest einen intensiven Zell-Gas-Kontakt erlebte. Eine dritte Öffnung im Deckel erlaubte einen Mediumwechsel während des Versuchs, so dass langfristige Expositionen weit über 24h hinaus möglich waren. Nachteilig waren Inhomogenitäten des Zellrasens (u.U. sogar Zellablösung) und nicht zuletzt der erhebliche Preis.

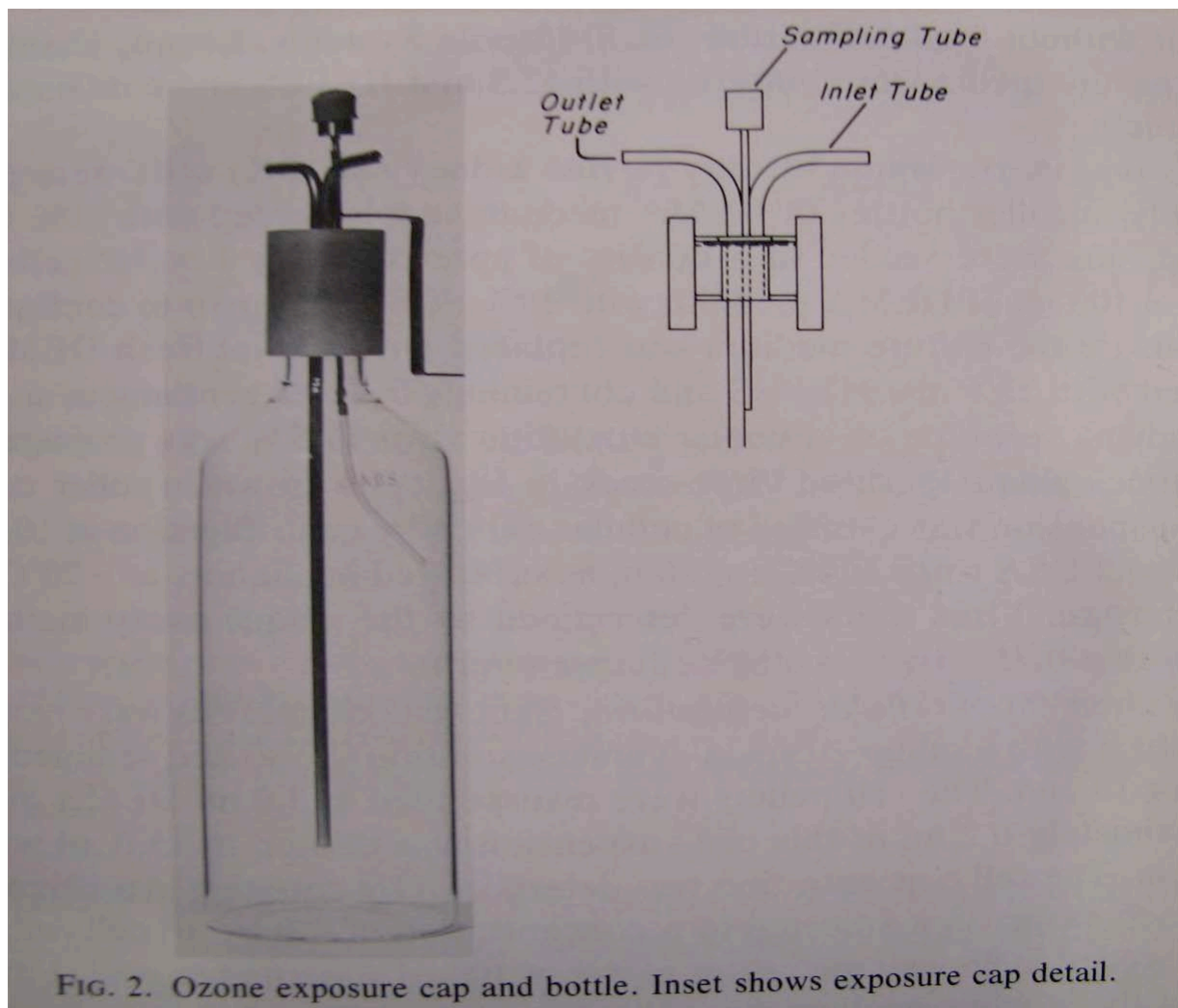


Abb. 1.5: Apparatur von Bolton et al. [6]

Zu F) Die Gruppen um Kienast oder Wallaert oder Ritter benützten eine zweiphasige Membran für ihre Expositionsversuche. Kienast benützte eine kollagenbeschichtete Polycarbonat-Membran (Porengröße $3\mu\text{m}$) [7], Wallaert bevorzugte eine Polysulfon-Membran (Porengröße $0,2\mu\text{m}$) und Ritter wählte eine PolyethylenTerephthalat-Membran (Porengröße $0,4\mu\text{m}$). Die mit Zellen bewachsenen Membranen wurden über einem mit Nährmedium gefüllten Schälchen positioniert. Über Kapillarkräfte saugte die Membran das Medium auf, so dass die Zellen nicht austrockneten. Dabei konnte die Oberfläche der Zellverbände direkt der Gasatmosphäre ausgesetzt werden (Abb. 1.6).

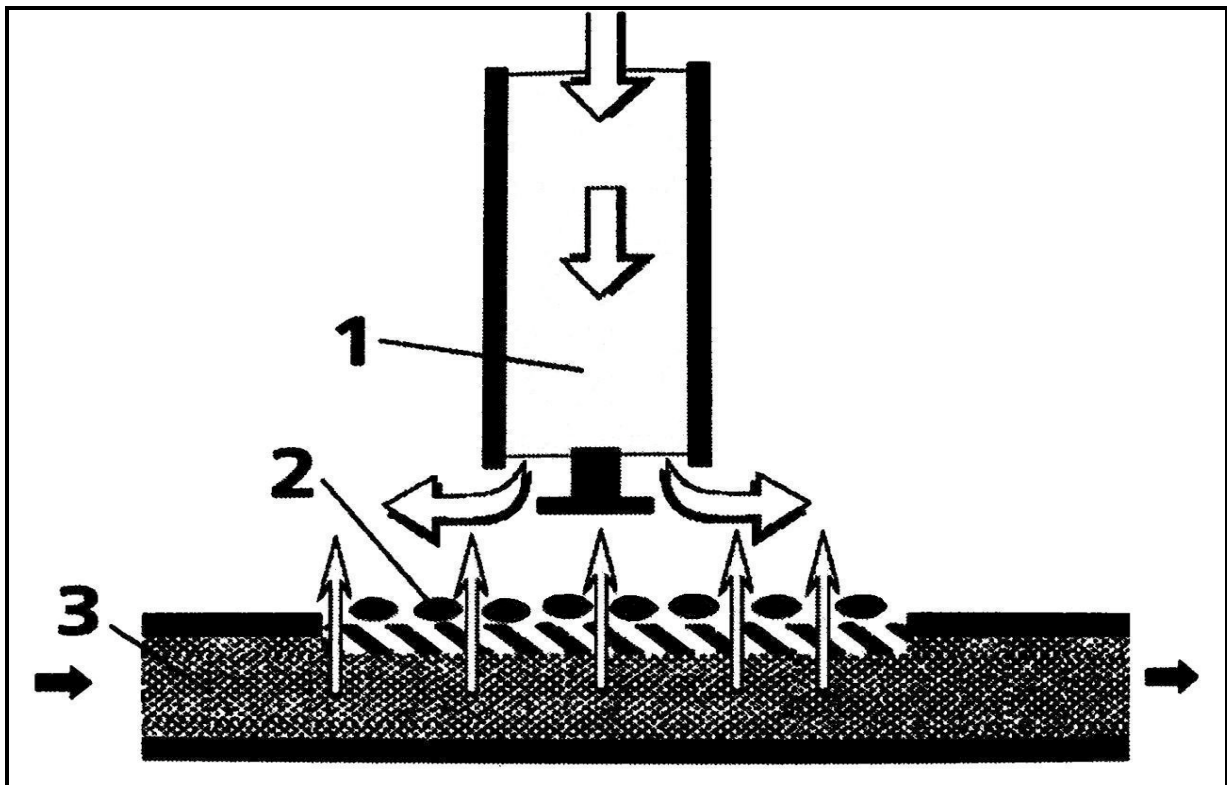


Abb. 1.6: Theoretisches Modell für das Design einer Expositionsapparatur nach Ritter et al.; 1 - Expositionsgas, an den Zellen vorbeigeleitet; 2 - menschliche Lungenzellen, kultiviert auf einer Membran mit einer Porengröße von $0,4\mu\text{m}$, die an der oberen Seite direkt dem Gasstrom ausgesetzt sind, da sie nicht mit Medium bedeckt sind; gleichzeitig wird durch Kapillarkräfte und Evaporation gewährleistet, dass die Zellen von unten durch das Kulturmedium mit Nährstoffen versorgt und feuchtgehalten werden; 3 - Zufuhr von frischem Nährmedium [9]

Für die Gasexpositionen wurden unterschiedliche Behälter gewählt. Kienast und Ritter verwendeten spezielle Begasungszylinder (Abb. 1.7), während Wallaert auf eine Gasdurchströmte Kammer setzte. Nachteilig waren bei Kienast und Ritter die aufwendige und teure Konstruktion, während bei Wallaert höhere Gaskonzentrationen eingestellt werden mussten, um vergleichbare Effekte zu erzeugen, da das Gas nicht direkt auf die Zellen einwirken konnte.

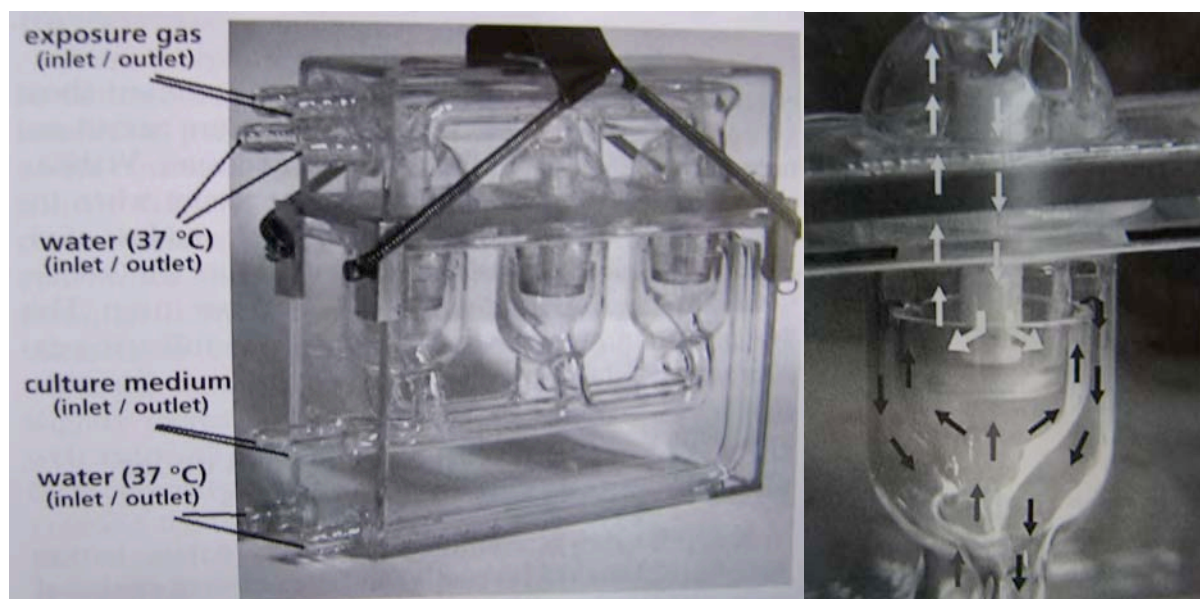


Abb. 1.7: Apparatur von Ritter et al.; im rechten Bild die detaillierte Ansicht eines Begasungszylinders (weiße Pfeile zeigen den Gasfluss an, schwarze Pfeile zeigen den Fluss des Mediums an) [9]

Unsere eigene Apparatur verzichtet auf Spezialgefäße zur Aufnahme der Zellen, sondern verwendet Standardkulturflaschen (50mL) mit geradem oder schrägem Hals, in denen die Zellen angezüchtet werden, bis sie zu Versuchsbeginn auf konische Gaszuführungen gesteckt werden und fortan periodisch aus der Ruhelage hin und her bewegt werden, um einen intensiven Gas-Zell-Kontakt zu gewährleisten. Die Details werden im Abschnitt 2 (Material & Methoden) vorgestellt. Aufgrund der chemischen Reaktivität der interessierenden Gase wurden alle Gas-führenden Komponenten aus chemisch inertem Kunststoff (PTFE) gefertigt, die einer chronischen Flutung mit Reizgasen widerstehen.

1.2 Reizgase

Reizgase sind Gase, die Haut und Schleimhäute reizen und nach Inhalation eine Schädigung im Respirationstrakt bis hin zur irreversiblen Zerstörung des betroffenen Gewebes verursachen können. Klinisch imponiert eine zunächst akute, später ggf chronische Entzündung mit Exsudation und Verengung der Atemwege und je nach Gasart einer (irreversiblen) Schädigung des Lungenparenchyms [13]. Entsprechend ihrer Wasserlöslichkeit werden drei Arten von Reizgasen unterschieden, die unterschiedliche Angriffspunkte und Eindringtiefe im Respirationstrakt haben.

1.2.1 Hydrophile Reizgase (hohe Wasserlöslichkeit)

Gut wasserlösliche Reizgase wie Ammoniak (NH_3), Salzsäure (HCl) und Formaldehyd (HCHO) bilden – teilweise nach Hydrolyse – stabile Hydrate und wirken hauptsächlich äußerlich (z.B. am Auge) und im oberen Respirationstrakt (Larynx, Trachea). Dort reagieren sie mit der Feuchtigkeit der Schleimhäute und können zu Verätzungen und Nekrosen führen. Langwierige Entzündungen und Narbenbildung können die Folge sein. Ist der Kehlkopf betroffen, so kann das Auftreten eines Stimmritzenkrampfes und Glottisödems akut tödlich sein [14].

1.2.2 Mäßig hydrophile Reizgase (mittlere Wasserlöslichkeit)

Mäßig wasserlösliche Gase wie Chlor (Cl_2) und Brom (Br_2), aber auch Säurechloride (RCOCl_2) und Schwefeldioxid (SO_2) erreichen tiefere Abschnitte des Respirationstraktes wie Bronchien und Bronchiolen. Hustenreiz, Hypersekretion mit Schleimbildung und Bronchokonstriktion bis hin zum Bronchospasmus treten auf. Diese Gase sollen eine (irreversible) kovalente Modifikation (Quervernetzung, Denaturierung) biologischer Strukturen bewirken. Typische Folgen sind eine chemische Bronchitis oder Bronchopneumonie [15].

1.2.3 Wenig hydrophile Reizgase (geringe Wasserlöslichkeit)

Stickstoffdioxid (NO_2), Ozon (O_3) und Phosgen (COCl_2) dringen aufgrund ihrer Lipophilie in die tiefen Abschnitte des Bronchialbaumes vor und greifen die Bronchiolen und das Lungparenchym mit seinen Alveolen und Kapillaren an [13]. Mit Feuchtigkeit reagieren sie teilweise unter Zersetzung, biochemische Strukturen werden denaturiert und/oder einem oxidativen Stress ausgesetzt.

1.3 NO_2 als Reizgas

Als Testsubstanz bei den eigenen Untersuchungen diente das Reizgas Stickstoffdioxid (NO_2), das aufgrund seiner chemischen Reaktivität und Giftigkeit eine Herausforderung gleichermaßen an den Experimentator und die Versuchapparatur stellt.

1.3.1 Physikochemische Eigenschaften von NO_2

Stickstoffdioxid (NO_2 ; CAS RegNr 10102-44-0) ist ein braunes, lipophiles Reizgas, welches bei fast jeder Verbrennung aus dem Abbrand von Stickstoff (z. B. aus Holz, Treibstoff und

Düngemitteln) entsteht. Auch die Einwirkung konzentrierter Salpetersäure auf Metalle oder organische Substanzen führt zur Entstehung nitroser Gase (NO_x), also auch von NO_2 .

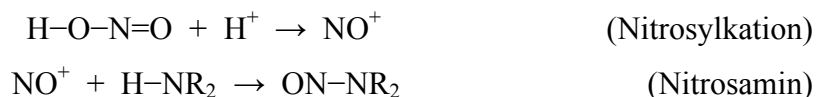
NO_2 besitzt eine radikalische Natur (1 ungepaartes Elektron) und ist als reaktive Sauerstoffverbindung bekannt, die auf zahlreiche biologische Strukturen oxidierend wirkt. Als Mechanismus für die (zell)membranschädigende Wirkung wird eine Reaktion des NO_2 mit den olefinischen Doppelbindungen in Fettsäuren diskutiert, die mit einem Radikalangriff und anschließender Lipidperoxidation einhergeht [15].

Bei Inhalation hoher Dosen an NO_2 (500ppm (parts per million)) kann der Erstickungstod innerhalb von Minuten durch Glottiskrampf und/oder Glottisödem eintreten [15].

Auch nach Inhalation von NO_2 in Konzentrationen unterhalb der Auslösung eines toxischen Lungenödems können dem Körper irreversible Schäden zugefügt werden. NO_2 hydrolysiert nach erfolgter Inhalation beim Kontakt mit Wasser(dampf) zur salpetrigen Säure (HNO_2) und zur Salpetersäure (HNO_3):

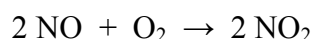


Aus der salpetrigen Säure kann bei niedrigem pH-Wert über die Zwischenstufe eines Nitrosylkations die Entstehung von Nitrosaminen (ON-NR_2) gefördert werden:

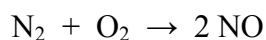


Nitrosamine werden durch Bioaktivierungsreaktionen in ultimale Kanzerogene umgewandelt, die auch nach langer Latenzzeit noch zur Entstehung bösartiger Tumore führen können.

Das bei Verbrennungsprozessen ebenfalls gebildete farblose Stickstoffmonoxid (NO) besitzt keinerlei Reizwirkung, obwohl es wie NO_2 ein ungepaartes Elektron und damit Radikalcharakter besitzt [15]. Dass NO aus Hämoglobin Methämoglobin bildet, spielt toxikologisch nur eine untergeordnete Rolle, da NO im Kontakt mit (Luft)Sauerstoff (O_2) bereits bei Raumtemperatur rasch zu NO_2 abreagiert [16]:



NO entsteht auch aus seinen Elementen, wenn hohe Temperaturen oder ein elektrischer Lichtbogen (Blitzentladungen bei Gewittern) für die notwendige Aktivierungsenergie sorgen:



Auch in diesem Fall wird NO durch den anwesenden Sauerstoff zu NO₂ oxidiert.

1.3.2 Wirkungen von NO₂ in Organismen

Die im Abschnitt vorher aufgeführten chemischen Eigenschaften von NO₂ können im Organismus, abhängig von Konzentration und Zeitdauer der NO₂-Exposition, unterschiedlich starke Reaktionen hervorrufen. Tab 1.2 zeigt Beispiele für toxische NO₂-Wirkungen in verschiedenen Spezies bei unterschiedlichen Expositionsszenarien:

Organismus:	c-t-Produkt [ppm h]	NO₂-Konzentration [ppm]:	Dauer [min]:	Wirkungen:	Literatur:
Mensch	8,33	100	5	- Atemreizung - Brustschmerz	[17]
Mensch	12,50	50	15	- Atemreizung - Brustschmerz	[17]
Mensch	16,66	200	5	- Lungenödem mit leicht verlaufender oder chronischer Läsion der Lunge	[17]
Mensch	20,00	40	30	- Atemreizung - Brustschmerz	[17]
Mensch	25,00	25	60	- Atemreizung - Brustschmerz	[17]
Mensch	25,00	100	15	- Lungenödem mit leicht verlaufender oder chronischer Läsion der Lunge	[17]
Mensch	33,33	400	5	- Lungenödem - Tod	[17]
Mensch	37,50	75	30	- Lungenödem mit leicht verlaufender oder chronischer Läsion der Lunge	[17]
Mensch	50,00	50	60	- Lungenödem mit leicht verlaufender oder chronischer Läsion der Lunge	[17]
Mensch	50,00	200	15	- Lungenödem - Tod	[17]
Mensch	75,00	150	30	- Lungenödem - Tod	[17]
Mensch	100,00	100	60	- Lungenödem - Tod	[17]

Organismus:	c-t- Produkt [ppm h]	NO₂- Konzentration [ppm]:	Dauer [min]:	Wirkungen:	Literatur:
Hund	13,66	164 (50% LC ₅₀)	5	- leichte Atemnot während der Exposition - leichter Husten, leichte Augenreizung - beschwerdefrei nach 1h	[18]
Hund	21,25	85 (50% LC ₅₀)	15	- leichte Atemnot während der Exposition - leichter Husten, leichte Augenreizung - beschwerdefrei nach 1h	[18]
Hund	58	58(50% LC ₅₀)	60	- leichte Atemnot während der Exposition - leichter Husten, leichte Augenreizung - beschwerdefrei nach 1h	[18]
Ratte	15,83	190 (50% LC ₅₀)	5	- schwere Atemnot - Augenreizung - beschwerdefrei nach 2 Tagen	[18]
Ratte	22,50	90 (50% LC ₅₀)	15	- schwere Atemnot - Augenreizung - beschwerdefrei nach 2 Tagen	[18]
Ratte	34,66	416 (LC ₅₀)	5	- schwere Atemnot - Augenreizung - Tod d. Lungenödem möglich, erst nach dem Überleben von 3 Tagen Genesung möglich	[18]
Ratte	50,25	201 (LC ₅₀)	15	- schwere Atemnot - Augenreizung - Tod d. Lungenödem möglich, erst nach dem Überleben von 3 Tagen Genesung möglich	[18]
Ratte	72	72 (50% LC ₅₀)	60	- schwere Atemnot - Augenreizung - beschwerdefrei nach 2 Tagen	[18]

Organismus:	c-t-Produkt [ppm h]	NO₂-Konzentration [ppm]:	Dauer [min]:	Wirkungen:	Literatur:
Ratte	81,00	162 (LC ₅₀)	30	- schwere Atemnot - Augenreizung - Tod d. Lungenödem möglich, erst nach dem Überleben von 3 Tagen Genesung möglich	[18]
Ratte	115,00	115 (LC ₅₀)	60	- schwere Atemnot - Augenreizung - Tod d. Lungenödem möglich, erst nach dem Überleben von 3 Tagen Genesung möglich	[18]

Tab. 1.2: Wirkungen von NO₂ in verschiedenen Spezies bei unterschiedlichen Expositionsszenarien

1.3.3 Zur Bedeutung von NO₂-Vergiftungen

Neben zahlreichen Einzelfallberichten, bei denen beruflich exponierte Personen durch NO₂ verletzt oder getötet wurden, finden sich in der Literatur auch mehrere Berichte über Massenvergiftungen durch NO₂, darunter vor allem Chemieunfälle, bei denen Stickoxide, u.a. auch NO₂, freigesetzt wurden. Eine große Menge an NO₂ entwich im September 2001 aus der Düngemittelfabrik AZF (Azote de France) im französischen Toulouse. Dabei kam es durch eine Explosion von 300 Tonnen Ammoniumnitratdünger zu zahlreichen Toten und Verletzten [19].

Eine massive NO₂-Freisetzung ereignete sich im Mai 2000 bei der Firma S.E. Fireworks in Enschede, NL, als 100t Pyrotechnik-Materialien explodierten. Wiederum waren zahlreiche Tote und Verletzte zu beklagen [20].

1.3.4 Gesundheitlich relevante Richtwerte beim Umgang mit NO₂

Die Gefährlichkeit von NO₂ für die menschliche Gesundheit hat zu einer Reihe gesetzlicher Richt- und Grenzwerte beim (beruflichen) Umgang mit dieser Substanz geführt. Die Senatskommission der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) hat NO₂ im Jahre 2003 neu bewertet und den alten MAK-Wert von 5ppm (der die zulässige Konzentration von NO₂ am Arbeitsplatz festsetzte) ausgesetzt, da einige (tier)experimentelle Befunde den Krebsverdacht für NO₂ erhärtet haben. Entsprechend wurde die Substanz in die Kanzerogenitätsstufe 3B (d.h. Stoffe mit begründetem Verdacht auf krebserzeugendes Potential) eingestuft. Gleichzeitig wurde auch die Einordnung in die Kurzzeitkategorie 1 (Reizstoffe), die angibt um

welchen Faktor ein MAK-Wert bei kurzzeitiger Exposition überschritten werden darf, für NO₂ widerrufen. Es wurde empfohlen, für den beruflichen Umgang mit der Substanz eine Richtkonzentration einzuhalten, die deutlich niedriger als der bisherige MAK-Wert von 5ppm (9,4mg/m³) liegt.

Andere Organisationen haben sich dieser Neubewertung von NO₂ durch die DFG bisher noch nicht angeschlossen und warten ab. So gilt beispielsweise in den USA noch immer ein zulässiger Grenzwert für beruflich Exponierte von 3ppm (5,6mg/m³) (TLV-TWA = Threshold Limit Value / time-weighted average = höchste zulässige Konzentration für den 8h-Arbeitstag bzw. die 40h-Arbeitswoche).

1.4 Pathophysiologische Veränderungen bei Reizgasvergiftungen

Reizgase, die über den Respirationsweg in die Lungen gelangt sind, treffen nach der Diffusion durch das Alveolarepithel auf die Kapillarendothelien und bewirken eine Permeabilitätserhöhung. Plasma tritt in den Interstitialraum über, das Alveolarepithel schwillt an und die Diffusionsstrecke, die sowohl O₂ als auch Kohlendioxid (CO₂) beim Gasaustausch überwinden, wird verlängert. Weil O₂ schlechter wasserlöslich ist als CO₂, macht sich die Störung des Gasaustausches für O₂ schneller bemerkbar als für CO₂. Die Sauerstoffsättigung des Hämoglobins nimmt ab, ohne dass die Atmung gesteigert wird. Die austretende Ödemflüssigkeit kann anfänglich noch über das Lymphsystem abtransportiert werden. Später versagt die Lymphdrainage zunehmend und Ödemflüssigkeit tritt in die Alveole über. Durch dieses alveoläre Ödem wird ein Circulus vitiosus ausgelöst, der mit der Bildung von Ödemschaum bei jedem Atemzug beginnt. Dieser Schaum steigt auf und verschließt die größeren Bronchien. Verstärkte Atemtätigkeit intensiviert die Schaumbildung im Bronchialtrakt. Innerhalb von 24 Stunden entwickelt sich nach entsprechender Exposition das volle Bild eines toxischen Lungenödems [13]. Die Prodromalphase ist arm an Symptomen (Husten, Spannungsgefühl), es gibt kaum Warnzeichen. In schweren Fällen tritt nach Stunden bis Tagen der Tod durch innere Erstickung ein. Wird die Ödemphase überlebt, kann sich auch noch nach Wochen eine tödliche Bronchiolitis obliterans entwickeln [15]. Das toxische Lungenödem ist eine von mehreren Möglichkeiten des akuten Lungenversagens (ARDS = "acute respiratory distress sndrome"), dazu gehört auch der diffuse Alveolarschaden (DAD = "diffuse alveolar damage"). Oberbegriff ist die akute Lungenschädigung (ALI = "acute lung injury") [21].

1.5 Therapeutische Optionen bei Reizgasvergiftungen

Personen, die kritischen Reizgaskonzentrationen ausgesetzt waren, werden mit Diazepam (5-10mg IV, zur Ruhigstellung), Sauerstoff (zuerst 4-8 L/min, danach entsprechend einer Blutgasanalyse) und inhalativen, eventuell auch parenteralen Glucocorticoiden behandelt [15]. Glucocorticoide sollen unabhängig von der auslösenden Noxe frühe (z.B. das Ödem) und späte Reaktionen (z.B. die Fibrose) hemmen. Schon seit längerem wird aber der therapeutische Nutzen der Steroide beim (toxischen) ARDS kontrovers diskutiert. So werden Glucocorticoidsprays von Feuerwehrärzten zwar in der Akutphase der Vergiftung durch eine inhalative Noxe empfohlen, jedoch nur kurzfristig am Einsatzort. Bei längerfristiger Behandlung mit Glucocorticoiden ergibt sich wegen der (immun)suppressiven Wirkung und der erhöhten Infektionsgefahr ein ungünstiges Nutzen/Risiko-Verhältnis [22].

1.6 Glucocorticoide

Unter den therapeutisch verwendeten Glucocorticoiden finden sich vor allem stark wirksame Vertreter wie Beclomethason oder Budesonid, die als Dosieraerosole verabreicht werden, und schwächer wirksame Stoffe wie Prednisolon, Methylprednisolon oder Dexamethason für die systemische Therapie (per os oder parenteral). In der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung von Beclomethason und Budesonid untersucht, die hier kurz skizziert werden.

1.6.1 Strukturmerkmale von Beclomethason und Budesonid

Beclomethason:

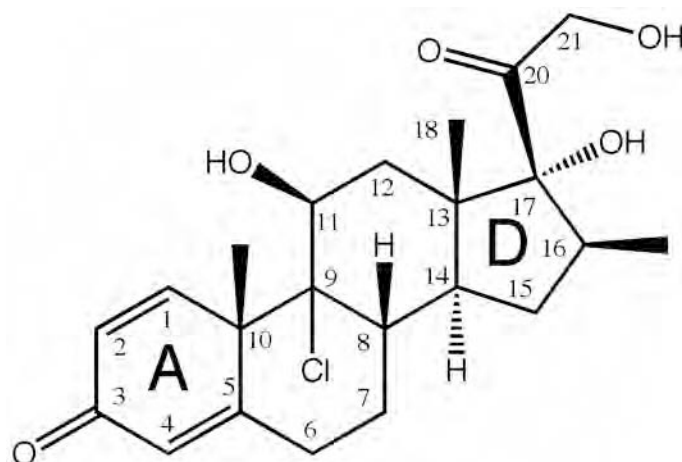


Abb. 1.9: Strukturformel von Beclomethason

Beclomethason besitzt etwa die 3000fache glucocorticoide Potenz im Vergleich zu Cortisol (= 1), seine Rezeptorbindungsaffinität beträgt rund 50% der des Dexamethason. Erhöhte Lipophilie wird erreicht durch:

- Einführung einer weiteren Doppelbindung im Ring A
- Halogenierung im Ring B

Budesonid:

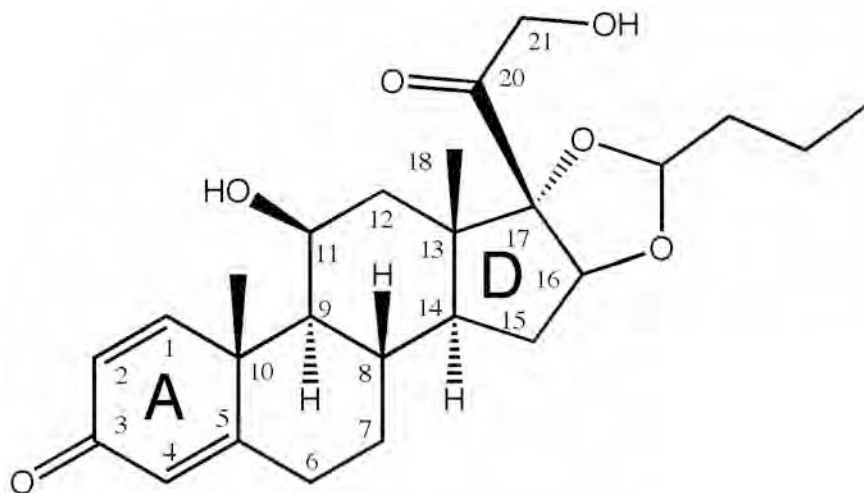


Abb. 1.10: Strukturformel von Budesonid

Budesonid besitzt etwa die 30.000fache glucocorticoide Potenz im Vergleich zu Cortisol (= 1), seine Rezeptorbindungsaffinität beträgt ebenfalls rund 50% der des Dexamethason. Erhöhte Lipophilie wird erreicht durch:

- Einführung einer weiteren Doppelbindung im Ring A
- Alkylacetalbildung an C-16 und C-17

Budesonid zeigt trotz der geringeren Lipophilie (rel. Lipophilie 3980 – im Vergleich zu Beclomethason mit rund 25000, gemessen am Retentionsverhalten auf RP-HPLC) eine stärkere Retention im Gewebe, da die Substanz mit ihrer Butylseitenkette verstärkt Fettsäureester bildet (über die –OH Gruppe an C-21) [23].

Beide Glucocorticoide zeigen starke anti-inflammatorische Aktivität und werden häufig bei obstruktiven Lungenerkrankungen (Asthma, chronisch Bronchitis) eingesetzt [24].

1.7 Fragestellung und Ziele der Arbeit

Vorrangige Aufgabe war die Betriebsprüfung der Expositionsapparatur mit einem stark korrodierenden Gas. Für die Wahl von NO_2 gab es mehrere Gründe. Zum einen stellte NO_2 hohe Anforderungen an die Apparatur, da die Substanz bzw. ihre Disproportionierungsprodukte stark korrodierend wirken. Zum anderen konnte die tatsächliche NO_2 -Exposition durch die vollständige Disproportionierungsreaktion in Wasser anhand der auftretenden Reaktionsprodukte Nitrit und Nitrat gut quantifiziert werden. Außerdem war NO_2 als toxisches Reizgas gut bekannt und bereits von anderen Untersuchern in Zellkulturen gut charakterisiert worden.

Die Korrosionsbeständigkeit einzelner Teile (Dichtungen, Schlauchstücke) gegenüber NO_2 war der Literatur nicht zu entnehmen, so dass eigene Erfahrungen gewonnen werden mussten. Auf die Beobachtungen zur Materialtauglichkeit wird allerdings im Text nicht eingegangen, vielmehr wird über zellfreie Vorversuche berichtet, die Aufschluss darüber geben, wie reproduzierbar die Apparatur arbeitet. Dabei galt das Augenmerk der Extraktion unterschiedlicher NO_2 Konzentrationen durch die Kulturen unter Berücksichtigung der seriellen Flaschenanordnung im Gasstrom. Wie stark NO_2 , das bereitwillig mit Wasser und Feuchtigkeit reagiert, auf die Zellen wirkte, konnte ebenfalls von vornherein nicht abgeschätzt werden. Als zelluläres Modell dienten A549 Zellen, eine häufig verwendete Zelllinie aus einer menschlichen Lunge. Durch die Untersuchung unterschiedlicher Gaskonzentrationen und verschiedener Expositionszeiten sollten geeignete Expositionsbedingungen gefunden werden, die eine reversible Schädigung der Zellen hervorriefen, so dass noch Raum für (spätere) Therapieversuche blieb.

Nachdem in der Toxikologie bis heute die Frage nach einem therapeutischen Nutzen einer Corticoidgabe nach einer Reizgasinhalation nicht geklärt ist, sollte als letzte Aufgabe der Einfluss von Glucocorticoiden auf A549 Zellen in der Akutphase nach NO_2 -Schädigung untersucht werden. Hierfür wurden zwei synthetische Glucocorticoide, Beclomethason und Budesonid, ausgewählt, die als Inhalationstherapeutika in Deutschland zugelassen sind.

2 Materialien und Methoden

2.1 Geräte

Sterilbank: LB-72-C LaminAir; Fa. Heraeus, Hanau

CO₂-Brutschrank: Fa. Heraeus, Hanau

Zentrifuge: Rotanta/R; Fa. Hettich, Tuttlingen

Mikroskop: Axiovert 35M, Fa. Zeiss, Jena

UV/VIS Spektrometer: LKB Biochrom 4060; Fa. Pharmacia, Freiburg

Software: Version 2.1 1994, Autor L. Bunnage

Sterilfilter: Fa. Sartorius, Göttingen

Kulturgefäß: Standardkulturflasche 260mL; Fa. Nalgene-Nunc, Wiesbaden

Expositionsgefäß: Standardkulturflasche 50mL; Fa. Nalgene-Nunc, Wiesbaden

Glaselektrode: Fa. Bachofer, Reutlingen

Indikatorpapier: Fa. Macherey-Nagel, Düren

2.2 Chemikalien und Feinbiochemika

Perchlorsäure: 70-72%; Fa. Merck, Darmstadt

Triethanolamin: reinst; Fa. Merck, Darmstadt

NA₂EDTA•2H₂O (Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraacetat): Fa. Merck, Darmstadt

DMSO (Dimethylsulfoxid): Fa. Merck, Darmstadt

DTNB (Bis-(4-nitrophenyl)-disulfid-3,3'-dicarbonsäure): Fa. Sigma, Deisenhofen

GSSG (oxidiertes Glutathion): Fa. Sigma, Deisenhofen

Glutathion-Reduktase: Fa. Sigma, Deisenhofen

NADPH (Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (reduziert)): Fa. Roche, Mannheim

Nitrat-Reduktase: Fa. Roche, Mannheim

Budesonid: Fa. Roche, Mannheim

Beclomethason: Fa. Roche, Mannheim

NO₂-Gas: Fa. Messer, Griesheim

Carbogen-Gas: Fa. Linde, Oberschleißheim

KH₂PO₄: Fa. Merck, Darmstadt

KHPO₄: Fa. Merck, Darmstadt

CuSO₄•5H₂O: Fa. Merck, Darmstadt

K, Na-Tartrat•4H₂O: Fa. Merck, Darmstadt

KI: Fa. Merck, Darmstadt

Sulfanilamid: Fa. Merck, Darmstadt

N-(1-Naphtyl-)ethylendiamin•2HCl: Fa. Merck, Darmstadt

TrypanBlau-Lösung: Fa. Serva, Heidelberg

2.3 Materialien für die Zellkultur

2.3.1 Zellen

A549: Zelllinie aus einem humanen Lungenadenokarzinom; Fa. American Type Culture Collection (ATCC), Rockville MD, USA

2.3.2 Zellkulturmedien und -lösungen

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM/F12, 1:1): Fa. Gibco, Eggenstein

Fötale Kalberserum: Fa. Biochrom, Berlin

Penicillin-Lösung: 10000 IU/mL; Fa. Invitrogen, Karlsruhe

Streptomycin-Lösung: 10000 IU/mL; Fa. Invitrogen, Karlsruhe

Trypsin/EDTA-Lösung: Trypsin (50µg/mL), (5mmol/l) in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) sterilfiltriert

Fa. LifeTechnologies, Eggenstein

2.4 Zellkulturtechnik

2.4.1 Zellzüchtung

Die Zellen der Linie A549 wurden in 260mL Kulturflaschen der Firma Nalgene-Nunc in einem Inkubator (37°C, 5%CO₂, wasserdampfgesättigt) gezüchtet. Als Nährmedium diente DMEM/F12 (1:1), dem fötales Kälberserum 5%ig dazugegeben wurde. Zur Vermeidung einer bakteriellen Kontamination wurde Penicillin (100IE/mL) und Streptomycin (50µg/mL) zugesetzt. Das Nährmedium wurde jeden zweiten Tag gewechselt.

2.4.2 Zellpassage

Nachdem die Zellen konfluent gewachsen waren, wurden sie folgendermaßen passagiert:

Nach Entfernung des Nährmediums mit Hilfe einer Pasteurpipette wurde den Zellen 3mL Trypsin/EDTA-Lösung zugegeben. Dadurch lösten sich die Zellen innerhalb von 15 Minuten bei 37°C im Inkubator von der Unterlage ab. Die erhaltene Zellsuspension wurde durch eine Messpipette in ein Zentrifugenröhrchen übergeführt und 3 Minuten bei ungefähr 400xg zentrifugiert. Nach dem Absaugen der überstehenden Trypsin/EDTA-Lösung wurde das gebildete Zellsediment in 5mL Nährmedium resuspendiert und der Vorgang des Zentrifugierens wiederholt. Dies wurde zweimal durchgeführt, um alles Trypsin/EDTA weitgehend auszuwaschen. Schließlich wurden die Zellen erneut in Nährmedium suspendiert und auf die erforderliche Anzahl an Zellkulturflaschen aufgeteilt. Nach rund 12 Stunden im Inkubator waren die Zellen angewachsen.

24 Stunden vor einem Expositionsversuch wurden die Zellen in dreizehn 50mL-Standardkulturflaschen mit 5mL Nährmedium ausgesät. Unmittelbar vor Versuchsbeginn wurde dieses Nährmedium gegen 2mL frisches Expositionsmedium getauscht.

2.5 Versuchsausrüstung

Die NO₂-Exposition der Zellen wurde mit einer speziellen Apparatur durchgeführt, die in einem thermostatisierten Standardinkubator untergebracht war [25]. Mit dieser Expositionsapparatur können isolierte Zellen (Zellkulturen) einem definierten Gasfluss ausgesetzt werden.

2.5.1 Aufbau der Apparatur

Die Versuchsanordnung umfasst drei Teilbereiche (Abb. 2.1 und 2.2):

Bereich 1 befand sich außerhalb des Sicherheitsabzugs, wo Vorratsflaschen mit NO₂- bzw. Carbogen-Gas aufgestellt waren. Carbogen-Gas (ein Gemisch aus 95% O₂ und 5% CO₂) diente als Trägergas für alle Versuche mit NO₂-Gas, zunächst um die Anlage vor jedem Versuch auf Dichtigkeit zu prüfen, so dann zur Mischung mit NO₂, um über einen weiten Bereich beliebige NO₂-Konzentrationen einzustellen.

Bereich 2 lag innerhalb des Abzugs, aber außerhalb des Brutschrankes. In diesem fanden endgültige Gasmischung und -anfeuchtung statt.

Das Herzstück der Anordnung, die Expositions-kammer, in der die Begasung der Zellen stattfand, befand sich innerhalb des Brutschrankes, der ebenfalls im Abzug aufgestellt war. Der Innenraum des Brutschrankes bildete den Teilbereich 3.

Abb. 2.1 und Abb. 2.2 zeigen den Aufbau der Expositionsapparatur:

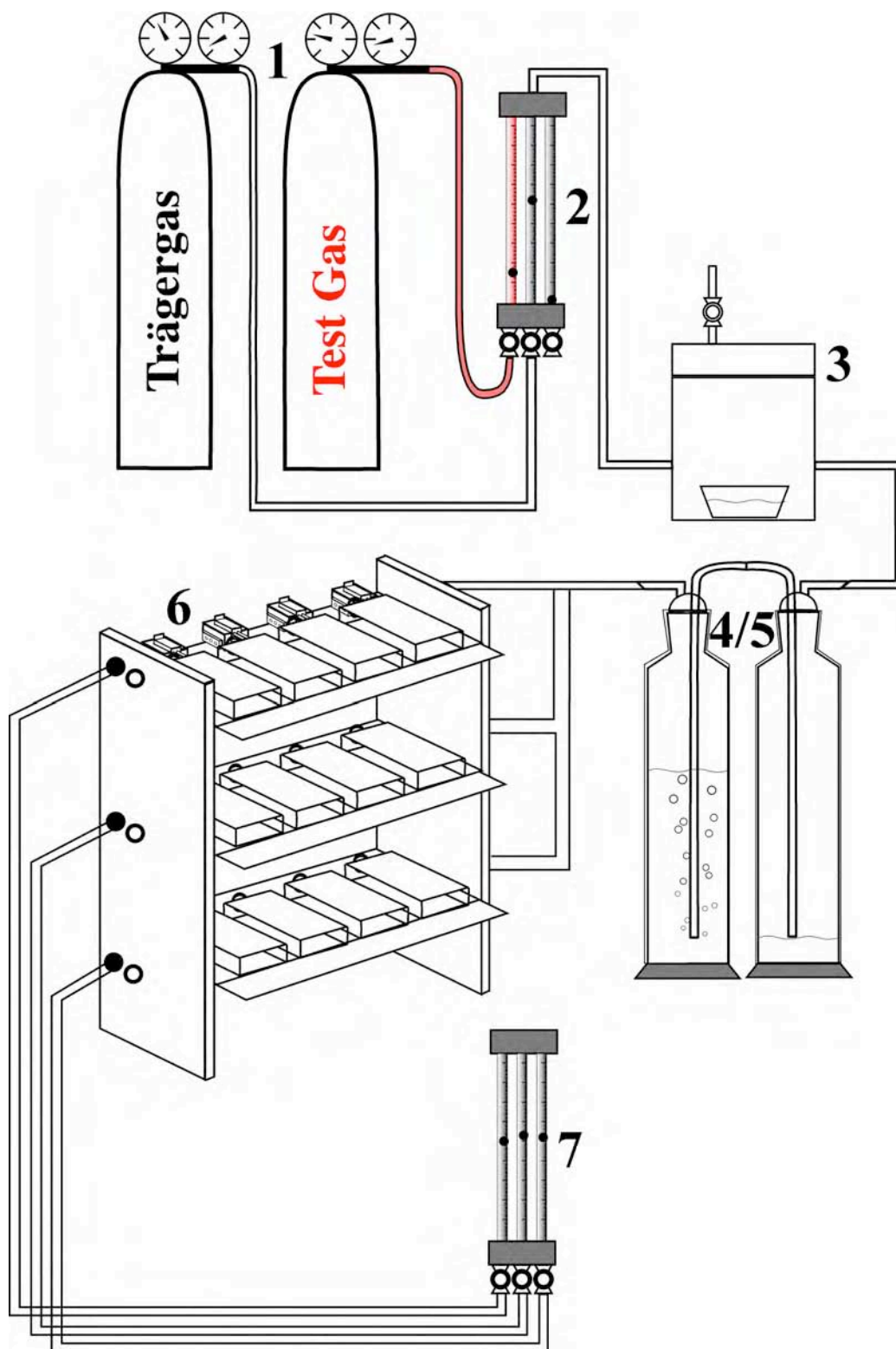


Abb. 2.1: Aufbau der Expositionsapparatur (schematisch)

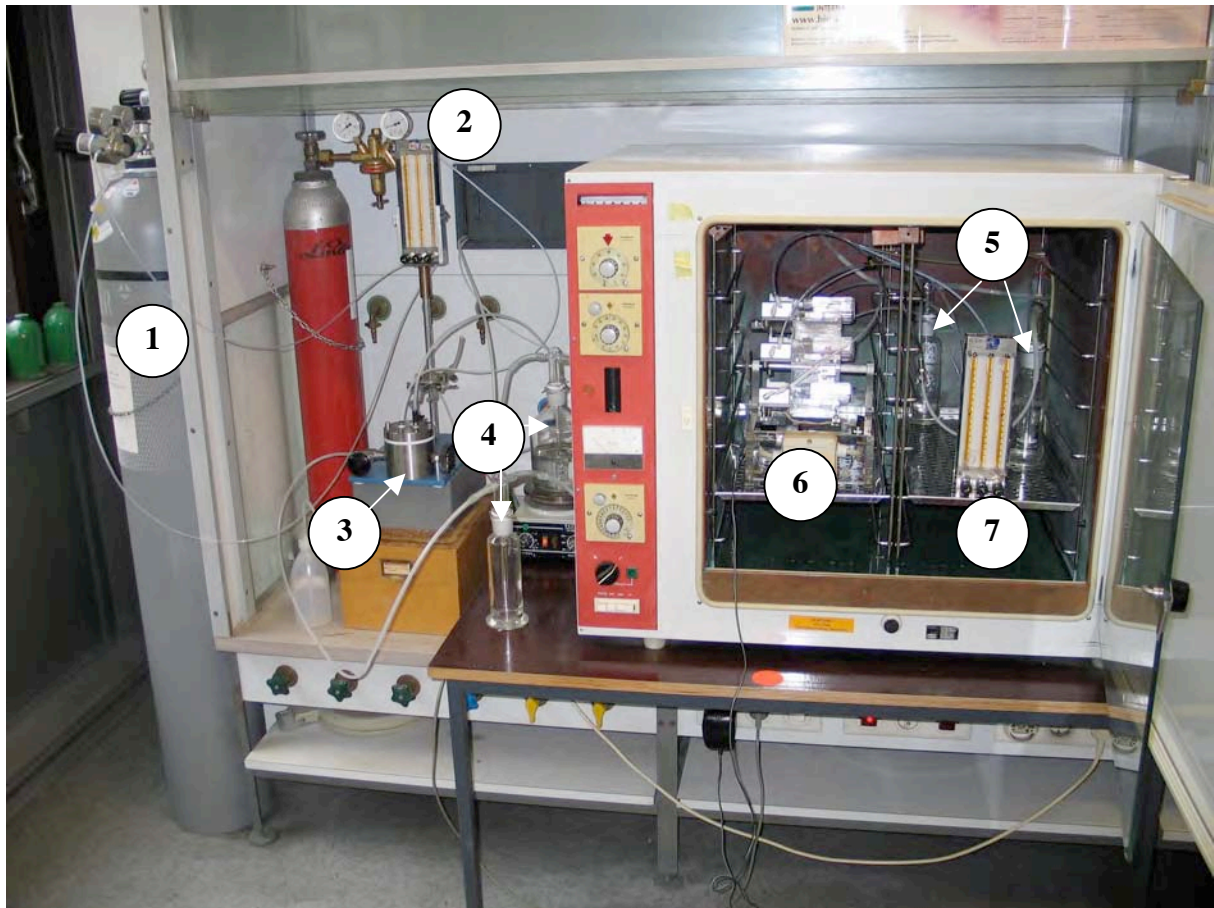


Abb. 2.2: Aufbau der Expositionsapparatur

Bereich 1:

- 1) NO₂- und Carbogen-Gas Vorratsflaschen, jeweils mit angedeutetem Hochdruck- und Niederdruckmanometer

Bereich 2:

- 2) Edelstahl-Mischbatterie mit 3 Rotametern
- 3) Verdampfer
- 4) Waschflaschen zum Anfeuchten des Gasgemisches

Bereich 3:

- 5) Waschflaschen zur Thermostatisierung des Gasgemisches
- 6) Kippschaukel mit Expositionskammer
- 7) Rotameterbatterie

Die angeführten Einzelkomponenten waren dabei in angegebener Reihenfolge durch Schläuche verbunden. Als Material für diese Schlauchverbindungen kam wegen seines inerten Verhaltens PTFE zum Einsatz.

Trägergas und NO₂-Gas wurden separat der Mischbatterie zugeleitet. Dort befanden sich Strömungsmesser (Rotameter) mit unterschiedlichem Kaliber, die mit Hilfe von Nadelventilen eine Einstellung des Mischungsverhältnisses über fast 4 Zehnerpotenzen erlaubten. Nach der Rotameterpassage wurden die einzelnen Gasströme zusammengeführt und gelangten anschließend in einen Verdampfer, der mit einem Manometer zur Aufnahme des Systemdrucks versehen war und ein Ventil besaß, über welches der Gasstrom an der Apparatur vorbei über einen Schlauch in den Abzug entweichen konnte.

Nach dem Verdampfer passierte der Gasstrom zur Anfeuchtung eine Waschflasche mit entionisiertem Wasser. Dies war notwendig, um ein Austrocknen der exponierten Zellkulturen zu vermeiden. Zur Vergrößerung der Austauschoberfläche wurde das Gas über eine Glasfritte in kleine Bläschen zerteilt. Um eine maximale Wasserdampfsättigung zu erreichen, wurde der Gasstrom in der Waschflasche auf 50°C erwärmt. Innerhalb des Inkubators erfuhr das Gasgemisch dann eine Thermostatisierung auf 37°C. Dies wurde wiederum durch die Verwendung einer mit entionisiertem Wasser beschickten Waschflasche erreicht. Eine vorgeschaltete Sicherheitswaschflasche sollte eine Überschwemmung bei (versehentlicher) Flussumkehr verhindern. Von da aus gelangte der Gasstrom in die Expositionskammer (siehe Abb. 2.2).

Die Expositionskammer konnte maximal 12 Standard-Zellkulturflaschen aufnehmen, von denen jede einzelne separat dem Gasstrom ausgesetzt werden konnte ("in-line"), oder daran vorbeigeführt werden konnte ("off-line"). Erreicht wurde dies durch die Verwendung von Schlitten, die es ermöglichten, jede einzelne Flasche auf die "in-line"- oder "off-line"-Position zu verschieben. Die Expositionskammer hatte drei Plattformen (Parallelschaltung), auf denen jeweils bis zu 4 Flaschen Platz fanden (Serienschaltung). Jede Flasche wurde nach Entfernung des Schraubdeckels auf einen PTFE-Konus gesteckt, der zu einem Teflon-Schlitten gehörte, dessen Stellung darüber entschied, ob eine Flasche begast wurde ("in-line") oder mit der Atmosphäre des Inkubators in direktem Kontakt stand ("off-line").

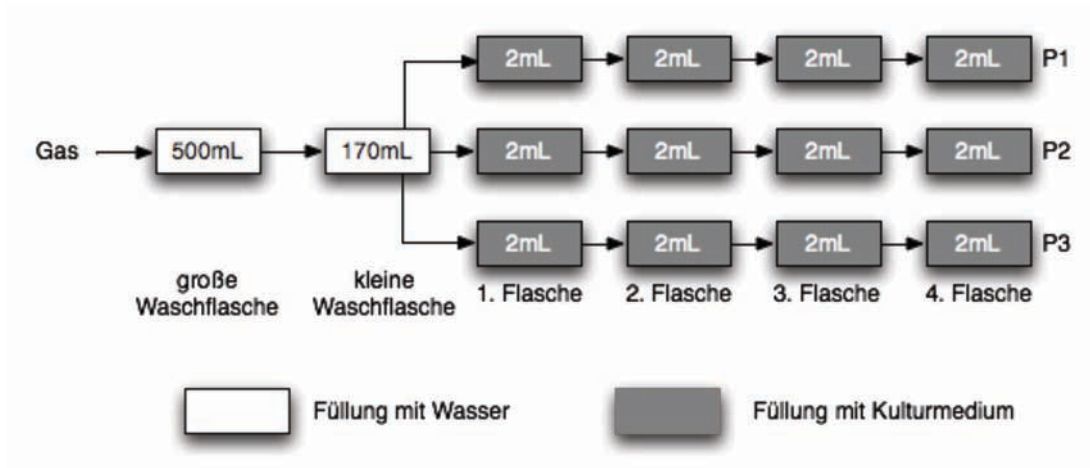


Abb. 2.3: Modell zur Veranschaulichung des Gasweges (Gaseinlass von links)

Für jede Plattform gab es an den Stirnseiten für den Gasstrom jeweils zwei Einlassstutzen, A bzw. B links (Abb. 2.4) oder A' bzw. B' rechts. Zwischen A und A' bzw. B und B' bestand eine durchgehende Verbindung durch die Schlitten, wobei der Gasstrom entweder in die Kulturflasche geleitet wurde oder im Kurzschluss nur den Schlitten passierte. Für die Exposition spielte es keine Rolle, welcher Einlass gewählt wurde. Bei Anschluss des Gasstroms an A wurden nur diejenigen Kulturflaschen begast, deren Schlitten sich ebenfalls in A-Position befand.

Ebenfalls sollte es keine Rolle spielen, von welcher Seite der Apparatur das Gas in die Expositions-kammer hineinströmte. So konnten auch A' oder B' zum Einlass werden, wobei dann A bzw. B die Funktion des Auslasses übernahmen.

Abb. 2.4 soll die unterschiedliche Position der Schlitten veranschaulichen.

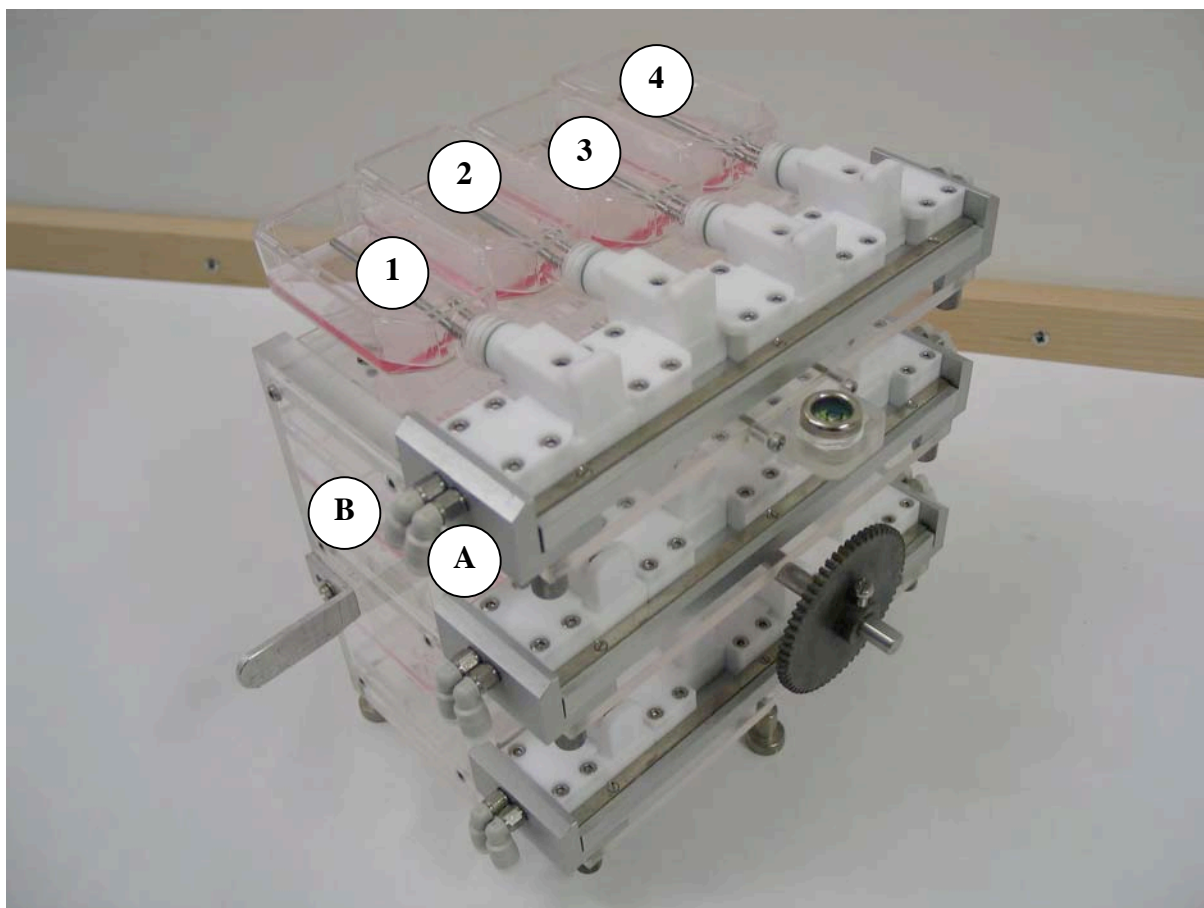


Abb. 2.4: Veranschaulichung der "in-line"- bzw. "off-line"-Stellung der Kulturflaschen; Flasche 1 (1) und Flasche 3 (3) auf "in-line"- Stellung, Flasche 2 (2) und Flasche 4 (4) auf "off-line"-Stellung, , wenn Einlass A (A) gewählt; Flasche 1 und Flasche 3 auf "off-line"-Stellung, Flasche 2 und Flasche 4 auf "in-line"-Stellung, wenn Einlass B (B) gewählt,

Für einen Versuch wurden die Zellen der Standardzellkulturflaschen mit 2mL frischem Nährmedium (ohne Zusatz von fötalem Kälberserum) beschickt. Um einen intensiven Zell-Gas-Kontakt zu gewährleisten, wurde die Expositionskammer auf eine Kippschaukel gesetzt. Eine periodische Auslenkung aus der Ruhelage (± 30 Grad, 0,03Hz) sorgte dafür, dass der Zellrasen abwechselnd aus dem Medium auf- und wieder eintauchte (Abb. 2.5). Da jede Plattform eigene Anschlüsse besaß, war prinzipiell eine unabhängige Begasung (andere Gasart, andere Strömungsgeschwindigkeit, andere Wasserdampfsättigung) möglich.

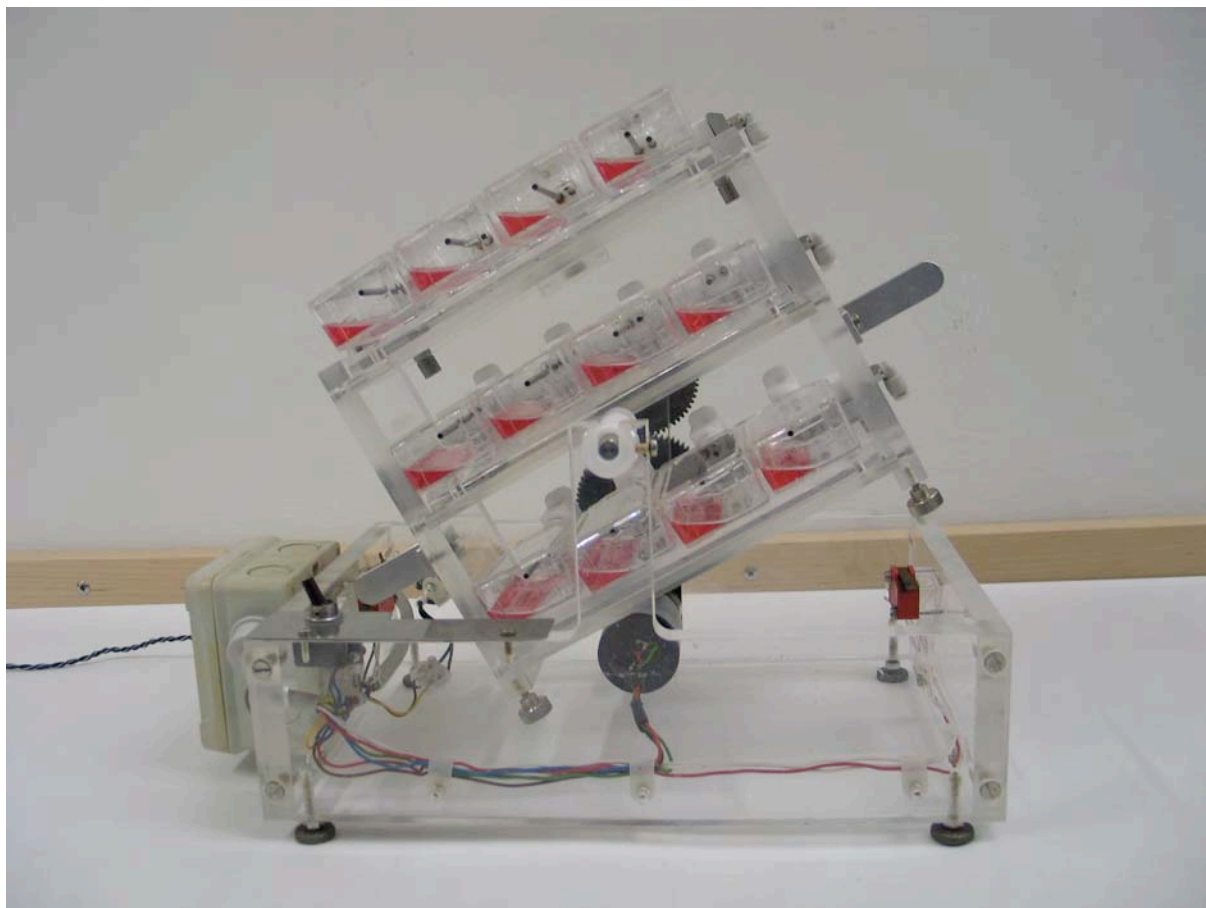


Abb. 2.5: Kippschaukel mit darauf angebrachter Expositions-kammer, die hier die maximale Auslenkung von -30 Grad einnimmt

Aus den 3 Auslässen (ein Konnektor pro Plattform) der Expositions-kammer führte zur Kontrolle des Gasstroms ein Schlauch zu einer nachgeschalteten Rotameter-batterie. Diese war mit identischen Rotametern bestückt, so dass unterschiedliche Positionen der Markerperlen eine inhomogene Verteilung bzw. Führung des Gasstroms anzeigten. Nach der Rotameter-batterie wurde die Ströme der drei Plattformen zusammengeführt und in den Abzug geleitet.

2.5.2 Inbetriebnahme der Apparatur

Vor jedem Versuch wurde die Expositions-kammer zerlegt und ihre temperaturbeständigen Komponenten in gespanntem Wasserdampf (20min, 121°C, 1,2 bar) autoklaviert. Komponenten, die nicht hitzebeständig waren, wurden mit Ethanol oder Isopropanol behandelt.

Rechtzeitig vor Versuchsbeginn wurden die beiden Waschflaschen auf Temperatur gebracht. Die vorgelegte Wassermenge wurde gemessen, um den Eintrag bzw. Austrag von Wasser zu erfassen. Dann wurden die beiden Rotameterbatterien und der Verdampfer angeschlossen, ehe die Expositions-kammer im Inkubator auf die Kippschaukel gesetzt und angeschlossen wurde. Eine Wasserwaage auf der oberen Plattform diente zur waagerechten Ausrichtung.

Nach dem Anschluss der Schläuche an die pneumatischen Steckverbindungen erfolgte zunächst in Ruhe, dann während der Kippbewegung eine Testphase allein mit Trägergas, um Undichtigkeiten aufzuspüren und die Gleichmäßigkeit der Gasverteilung zu prüfen. Als Beginn der Exposition wurde der Zeitpunkt der Einleitung des NO₂-Stroms in die Apparatur gewertet. Die Zeit, die das Gasgemisch benötigt, bis es vom Verdampfer in die Kulturflaschen gelangt, ist, wie folgende Rechnung veranschaulicht, im Vergleich zur Expositionsdauer (4h) zu vernachlässigen:

Transferzeit des NO₂-Stroms in der Apparatur (in Sekunden):

Länge der Zuleitung $s \sim 200\text{cm}$; lichte Weite $2r = 4\text{mm}$

Flussgeschwindigkeit $Q = 100\text{mL}/\text{min} = 100\text{cm}^3/\text{min} = 100000\text{mm}^3/\text{min}$

Schlauchquerschnitt $A = \pi r^2 = \pi(2\text{mm})^2 = \pi 4\text{mm}^2 = 12,57\text{mm}^2$

Flussgeschwindigkeit $v = Q : A = 100000\text{mm}^3/\text{min} : 12,57\text{mm}^2 = 7955,45\text{mm}/\text{min} = 13,3\text{cm}/\text{s}$

Transferzeit $p = s : v = 200\text{cm} : 13,3\text{cm}/\text{s} = \underline{15\text{s}}$

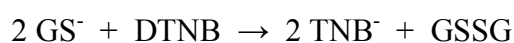
2.6 Biochemische Methoden

2.6.1 Glutathion-Bestimmung

NO₂ wirkt stark oxidierend und erzeugt in Zellen oxidativen Stress, so dass der Gesamtglutathiongehalt der Zellen (berechnet als Summe des reduzierten und oxidierten Glutathions) mit der Zeit absinkt [15]. Die Verringerung des Gesamtglutathiongehalts kann daher als Maß für den oxidativen Stress betrachtet werden. Aufderheide zeigte, dass der Glutathion-Gehalt in Anwesenheit von NO₂ Rückschlüsse auf die Vitalität der A549 Zellen erlaubt [26].

2.6.1.1 Biochemie / Prinzip des Tests

Die Bestimmung des zellulären Glutathions (GSX) erfolgte nach der Methode von Tietze [27]. Dabei reagiert das fast farblose 5,5'-Dithiobis-(2-nitrobenzoat) (DTNB) mit verfügbaren Thiolgruppen, z.B. des reduzierten Glutathions (GSH), stöchiometrisch zum gelben 2-Nitro-5-thiobenzoat (TNB⁻), das bei 412nm eine intensive Absorptionsbande zeigt.



Fügt man dem Ansatz ein definiertes Volumen eines eingestellten Zellextrakts zu, dann zeigt die entstandene Gelbfärbung die Anzahl der enthaltenen SH-Äquivalente an. Wenn man nun

dem Reaktionsgemisch noch Glutathion-Reduktase und NADPH zusetzt, wird vorhandenes GSSG immer wieder zu GSH reduziert, das seinerseits rasch durch noch vorhandenes DTNB wieder oxidiert wird.



Solange das Enzym bei ausreichendem NADPH und DTNB Vorrat weit unterhalb der Sättigung arbeitet, gilt: je mehr Glutathion in der Küvette enthalten ist, desto rascher erfolgt der Verbrauch des vorhandenen DTNB. Andere Thiole reagieren mit der Glutathionreduktase viel langsamer und fallen bei dieser kinetischen Bestimmung daher nicht ins Gewicht.

Wird das System mit verschiedenen GSX-Konzentrationen kalibriert (Eichkurve!), so kann aus der Umsetzungsgeschwindigkeit des entstehenden 2-Nitro-5-thiobenzoats die vorhandene GSX-Konzentration bestimmt werden.

2.6.1.2 Durchführung

Nach erfolgter NO₂-Exposition wurde das Medium vom Zellrasen abgesaugt. Durch Zugabe von 2mL Perchlorsäure (0,33M) wurden die Zellen aufgeschlossen, so dass sich das zelluläre GSX im Überstand befand. Im perchlorsauren Milieu konnten die Extrakte bei Bedarf bei tiefen Temperaturen (< -20°C) gelagert werden.

Alle zur Tietze-Reaktion benötigten Substanzen wurden in folgendem Kaliumphosphatpuffer (KPP) gelöst:

Lösung 1: 6,81 g KH₂PO₄ und 0,186g Na₂EDTA•2H₂O ad 500g aqua bidest

Lösung 2: 11,41 g K₂HPO₄•3H₂O und 0,186g Na₂EDTA•2H₂O ad 500g aqua bidest

Beide Lösungen wurden so gemischt, dass sich an der Glaselektrode ein pH-Wert von 7,0 einstellt

⇒ Kaliumphosphatpuffer 0,5M

Daraus ergaben sich die folgenden Stammlösungen:

(I) 1,5mg DTNB in 1000µL KPP ⇒ DTNB 3,8mM

(II) 4,1mg NADPH in 1000µL KPP ⇒ NADPH 4,8mM

(III) 20µL Glutathion-Reduktase in 1980µL KPP ⇒ Glutathion-Reduktase 6U/mL

Zur Tietze Reaktion wurde ein Gemisch aus 800 μ L KPP, 20 μ L DTNB-Stammlösung und 50 μ L NADPH-Stammlösung benötigt, welches vor der Messung in Halbmikroküvetten auf 25°C thermostatisiert wurde.

Unmittelbar vor der Messung wurden 200 μ L des perchlorsauren Auszugs mit 20 μ L eines 1:1 Gemisches aus Triethanolamin und KPP neutralisiert.

Dem thermostatisierten Reaktionsgemisch wurden 100 μ L des neutralisierten Extraktes zugesetzt. Um die Abreaktion vorhandener Thiolgruppen zu gewährleisten, wurde kurz abgewartet. Dann wurde die Tietze-Reaktion durch Zugabe von 30 μ L Enzymlösung gestartet. Die Messung der Extinktionsänderung bei 412nm erfolgte im UV/VIS Spektrometer über 5 Minuten.

2.6.1.3 Auswertung

Vor jeder Messreihe wurde eine Eichkurve mit perchlorsauren GSSG-Standardlösungen (1 μ M, 3 μ M, 10 μ M, 30 μ M und 100 μ M) aufgenommen. Durch Vergleich mit der daraus ermittelten Eichgerade konnte der GSX-Gehalt der Proben ermittelt werden. Die weiter unten beschriebene Proteinmessung erlaubte den Bezug des GSX-Gehaltes auf den Protein-Gehalt des Zellrasens.

2.6.2 Proteinbestimmung

Als Maß für die Zellmenge des exponierten Zellrasens diente der Proteinwert. Er stellt in der Versuchsauswertung die Bezugsgröße dar, mit der die GSX-Werte verrechnet werden. Endpunkt ist der zelluläre Glutathiongehalt (in nmol GSX/mg Eiweiß).

2.6.2.1 Biochemie / Prinzip des Tests

Die Bestimmung des Eiweiß-Gehaltes erfolgte nach der Biuret-Methode [28]. Das blau gefärbte Biuret-Reagenz erfährt in Anwesenheit von Proteinen eine Farbverdunkelung, deren Intensität von der Proteinmenge abhängt und bei 546nm quantifiziert wurde.

2.6.2.2 Durchführung

Zur Proteinbestimmung wurde überschüssige Perchlorsäure vom denaturierten Zellrasen abgesaugt, und der Zellrasen 24 Stunden luftgetrocknet. Dann erhielt jede Zellkulturflasche 2mL der nachfolgend angeführten Biuret-Lösung:

1,5 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; 4,5g $\text{K,Na-Tartrat} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; 4,0g NaOH und 2,5g KI ad 500g Aqua bidest. \Rightarrow Biuret-Lösung (in Braunglas aufbewahren!)

Nach rund 30 Minuten bei 37°C kann die Farbvertiefung im Photometer bei 546nm abgelesen werden.

2.6.2.3 Auswertung

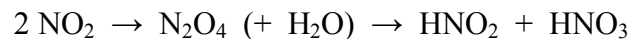
Der Proteingehalt wird durch Vergleich der Farbvertiefung mit einer kalibrierten Albumin-Stammlösung ermittelt bzw. durch einen empirisch bestimmten Faktor berechnet.

2.6.3 Bestimmung der NO_2 -Disproportionierungsprodukte

Die vom Kulturmedium extrahierte NO_2 -Menge hängt von der eingestellten NO_2 -Konzentration, der Flussgeschwindigkeit und der Extraktionsrate ab.

2.6.3.1 Biochemie / Prinzip des Tests

Das in die Expositionsflaschen eingeleitete NO_2 -Gas disproportioniert bei Kontakt mit Wasser zu salpetriger Säure und Salpetersäure:



Die gebildeten Nitrit- und Nitrationen können quantitativ bestimmt werden und erlauben den Rückschluss auf die durchgeleitete NO_2 -Menge. Die Bestimmung des Nitrits erfolgte mithilfe der Griess-Reaktion (Umwandlung in Gegenwart von Sulfanilamid und N-(1-Naphthyl)-ethylendiamin zu einem rötlichen Azofarbstoff), das Nitrat muss ggf in einem zweiten Reaktionsschritt zu Nitrit reduziert und ebenfalls der Griess-Reaktion unterworfen werden. Nitrationen werden dazu im Test mit Nitratreduktase in Anwesenheit von NADPH reduziert. Beide Reaktionen verlaufen unter den Testbedingungen stöchiometrisch.

Aufgrund der Stöchiometrie sollten äquimolare Mengen von Nitrit- und Nitrationen entstanden sein, durch separate Messung der Nitriten kann die Effizienz der Doppelbestimmung kontrolliert werden. Wie im Testkit der Firma Roche angegeben, erreicht man dies durch Weglassen der Nitratreduktase- und NADPH-Zugabe.

2.6.3.2 Durchführung

Die Messung erfolgte aus dem Zellüberstand nach 4-stündiger NO_2 -Exposition.

Folgende Stammlösungen wurden benötigt:

(I) Lösung 1: 28,5g K_2HPO_4 ad 250g aqua bidest.

Lösung 2: 17,0g KH_2PO_4 ad 250g aqua bidest.

Beide Lösungen wurden so gemischt, dass sich an der Glaselektrode ein pH-Wert von 7,6 einstellt

⇒ Kaliumphosphatpuffer 0,5M

1mg NADPH in 6mL Kaliumphosphatpuffer

⇒ NADPH 0,2mM

(II) 20U Nitrat-Reduktase (aus *Aspergillus species*) wurden in 2mL aqua bidest gelöst und in Eppendorfcups bei -20°C zu $200\mu\text{L}$ portioniert aufbewahrt. Kurz vor der Messung wurde die Portionen aufgetaut und mit $800\mu\text{L}$ aqua bidest. verdünnt.

⇒ Nitratreduktase 4U

(III) 1,0g Sufanilamid in 75mL aqua bidest und 25mL Phosphorsäure

⇒ Sulfanilamid 58mM (Farbreagenz 1)

(IV) 20mg N-(1-Naphtyl-)ethylendiamin•2HCl in 100mL aqua bidest

⇒ N-(1-Naphtyl-)ethylendiamin 0,772mM (Farbreagenz 2)

A) Nitrit/Nitrat-Messung:

$50\mu\text{L}$ des Überstandes wurden mit $450\mu\text{L}$ aqua bidest und $250\mu\text{L}$ NADPH-Stammlösung versetzt. Mit der Zugabe von $20\mu\text{L}$ Nitratreduktase-Stammlösung startete die Reduktion des anwesenden Nitrats zum Nitrit. Nach dem Durchmischen wurde die Probe 30 Minuten bei 25°C inkubiert. Nach dieser Zeit bekam das Gemisch jeweils $250\mu\text{L}$ der beiden Farbreagenzien zugesetzt. Wiederum wurde gut durchmischt und 15 Minuten im Dunkeln inkubiert. Die Messung erfolgte im UV/VIS Spektrometer bei 540nm.

B) Nitrit-Messung:

Die Nitrit-Messung erfolgte analog der Nitrit/Nitrat-Messung, jedoch ohne NADPH- und Nitratreduktase-Stammlösung (die fehlende Flüssigkeitsmenge wurde durch aqua bidest. ausgeglichen, um Verdünnungseffekte zu vermeiden).

2.6.3.3 Auswertung

Der Nitrit/Nitrat-Gehalt und Nitrit-Gehalt wurde durch Vergleich mit einer Eichgeraden ermittelt. Dazu wurden Verdünnungsreihen mit eingestellten Nitrit- bzw. Nitratkonzentrationen ($10\mu\text{M}$, $30\mu\text{M}$, $100\mu\text{M}$, $300\mu\text{M}$ und $1000\mu\text{M}$) in aqua bidest hergestellt.

2.7 Morphologie

Zusätzlich zur biochemischen Analyse fand nach jeder Exposition eine morphologische Begutachtung der Zellrasen unter dem Phasenkontrastmikroskop bei 10facher Objektiv-Vergrößerung statt. Das Ausmaß der Schädigung wurde in drei Intensitätsstufen visuell beurteilt und dokumentiert:

0 = keine Veränderung zu Kontrollzellen erkennbar

+ = Zellrasen unruhig, zahlreiche Vakuolen sichtbar, aber Zellverband intakt

++ = Zellrasen großflächig von der Unterlage abgelöst

2.8 Zellvitalität

Im Zweifelsfall wurde die Vitalität der Zellen mit dem Trypanblau-Farbstoffausschluss verifiziert und – wo nötig – quantifiziert. Dazu wurden Zellen ggf zuvor mit Trypsin in Suspension gebracht. Vor der Probenentnahme wurde die Zellsuspension vorsichtig geschwenkt, um eine homogene Verteilung zu erhalten. Anschließend wurden 0,5mL Zellsuspension mit 1mL der auf 37°C erwärmten Trypanblau-Lösung 0,1% versetzt (Mischungsverhältnis 1:2). Nach 1min wurden die lebenden Trypanblau-negativen Zellen (Ausschlussfärbung) und die blau gefärbten toten Zellen in einer Neubauer-Kammer unter dem Mikroskop ausgezählt. Die Vitalität ergab sich aus dem Verhältnis der Anzahl nicht gefärbter Zellen (Farbstoffausschluss) zur Gesamtanzahl von mindestens 200 ausgezählten Zellen.

2.9 Auswertung und Statistik

Für die Darstellung der Resultate wurden Diagramme mit Mittelwerten bevorzugt. Die dazugehörigen Tabellen mit den Einzelwerten sind im Anhang zu finden. Aus diesen Einzeldaten wurden die Mittelwerte inklusive den Standardabweichungen der jeweiligen Gruppe berechnet. Diese sind im Ergebnisteil grafisch dargestellt, wobei auf signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen geprüft wurde. Für paarweise Vergleiche zweier kontinuierlicher Mittelwerte wurde der t-Test für gepaarte Stichproben angewendet, bei mehr als zwei Gruppen wurde eine Varianzanalyse (ANOVA) durchgeführt. Unabhängig davon, ob die Mittelwerte der einzelnen Gruppen das Maß zufälliger Schwankungen signifikant überschritten, wurde post-hoc auf statistische Unterschiede zwischen allen Gruppen mit dem Student-Newman-Keuls (SNK) Test geprüft. Die Angabe modifizierter SNK wurde gewählt, da der ursprüngliche SNK-Test gleich große Stichprobenumfänge der einzelnen Gruppen voraussetzt, für unsere Berechnungen daher eine Anpassung notwendig war. Als Signifikanzgrenze für die Irrtumswahrscheinlichkeit wurde $p \leq 0,05$ festgesetzt. Zur besseren Unterscheidung von knapp oder hoch signifikanten Resultaten wurde der Empfehlung von Sachs gefolgt, der folgende Sternsymbolik bevorzugt:

* $0,05 \geq p > 0,01$, ** $0,01 \geq p > 0,001$, *** $p < 0,001$ [29].

Für die Auswertung wurde die Software InStat v3.0 der Fa. GraphPad, San Diego, USA, benutzt.

3 Ergebnisse

3.1 Funktionsprüfung der Apparatur (zellfreie Versuche)

Die ersten Versuche wurden ohne Zellen durchgeführt um zu erkennen, wie reproduzierbar die Apparatur arbeitet. Ferner war von Interesse, wie gleichförmig der Durchfluss über eine längere Expositionszeit war und ob der NO_2 -Eintrag für alle Flaschen einer Serie vergleichbar war. Dazu wurden jeweils 4 Flaschen pro Plattform mit einem Gasfluss von 100mL/min durchströmt, dem unterschiedliche Testgaskonzentrationen beigemischt waren. Die Wahl der Flussgeschwindigkeit von 100mL/min ergab sich einerseits aus der Forderung, möglichst rasch "steady-state" Bedingungen zu erreichen, andererseits aus der Sorge, zuviel Flüssigkeit (des Nährmediums) durch Konvektion auszutragen.

3.1.1 Nitritbildung unter verschiedenen Expositionsszenarien

3.1.1.1 Apparative Einflüsse auf die NO_2 -Extraktion

12 Standardkulturflaschen (ohne Zellen) wurden mit 2mL frischem Nährmedium DMEM/F12 (ohne Zusatz von fötalem Kälberserum) versetzt. In Vorversuchen hatte sich bereits ergeben, dass eine NO_2 -Konzentration von 10ppm über 4 Stunden eine beträchtliche Zellschädigung bewirken würde. Neben 10ppm wurden zur besseren Orientierung (Steilheit der Konzentrations-/Wirkungs-Kurve) noch die Konzentrationen 1ppm und 50ppm ausprobiert. Abb. 3.1 zeigt die im Nährmedium gefundene Nitritmenge, die offenbar durch Disproportionierung des solvatisierten NO_2 bzw. N_2O_4 im Medium verblieben war. Bei einer nominellen NO_2 -Konzentration von 1ppm war nach 4h in der ersten Flasche 166 ± 5 nmol Nitrit gebildet worden, in der letzten Flasche einer Plattform hingegen nur 97 ± 6 nmol (N=4 unabhängige Versuche). Bei Einstellung einer nominellen NO_2 -Konzentration von 10ppm ergaben sich für die erste Flasche Nitrit-Gehalte von 779 ± 63 nmol, während in der letzten Flasche lediglich 474 ± 31 nmol Nitrit gebildet wurden (N=12 unabhängige Versuche). Bei 50ppm waren dem extrahierten NO_2 entsprechend in der ersten Flasche 2215 ± 69 nmol und in der vierten Flasche lediglich 1382 ± 17 nmol Nitrit zu finden (N=6 unabhängige Versuche).

Nitritbildung zellfrei / 4h / 1ppm, 10ppm, 50ppm

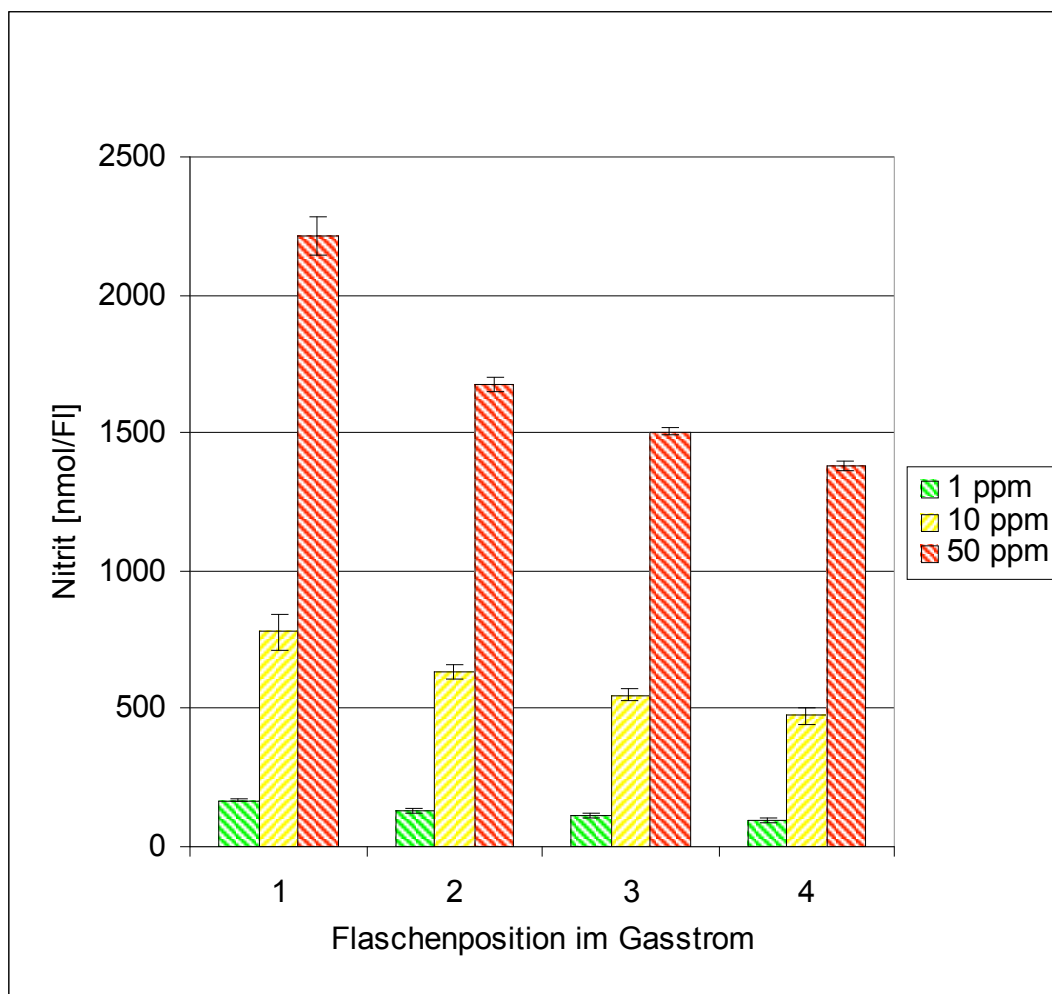


Abb. 3.1: Nitritbildung in Abwesenheit von Zellen nach 4h bei 1ppm, 10ppm und 50ppm, in Abhängigkeit der Flaschenposition

Mit Hilfe der im Nährmedium gefundenen Nitritmenge ließ sich aus der voreingestellten (nominellen) NO_2 -Konzentration, der Flussrate und der Dauer des Versuches die Menge an NO_2 berechnen, die jeweils nach Korrektur des extrahierten Anteils auf die einzelnen Flaschen im Gasstrom eingewirkt hatte. Für diese Berechnung musste außerdem die bereits in den beiden vorgeschalteten Waschflaschen (Abb. 2.1) extrahierte NO_2 -Menge mitberücksichtigt werden. Abb. 3.2 zeigt die real pro Flasche auftretenden NO_2 -Konzentrationen, wiedergegeben als %-Angabe vom Input-Wert für die Versuche mit nominell 10 und 50ppm NO_2 . Die Berücksichtigung der Waschflaschen war aufgrund des großen Wasservolumens (500mL bzw. 150mL im Vergleich zu 2mL in den Kulturflaschen) besonders bei geringer NO_2 -Exposition schwierig, da der photometrische Test hier vergleichsweise unempfindlich war und sich bei der Berechnung der extrahierten NO_2 -Menge stark schwankende Nitrit-Werte ergaben.

Tatsächliche NO₂-Belastung zellfrei / 4h / 10ppm, 50ppm

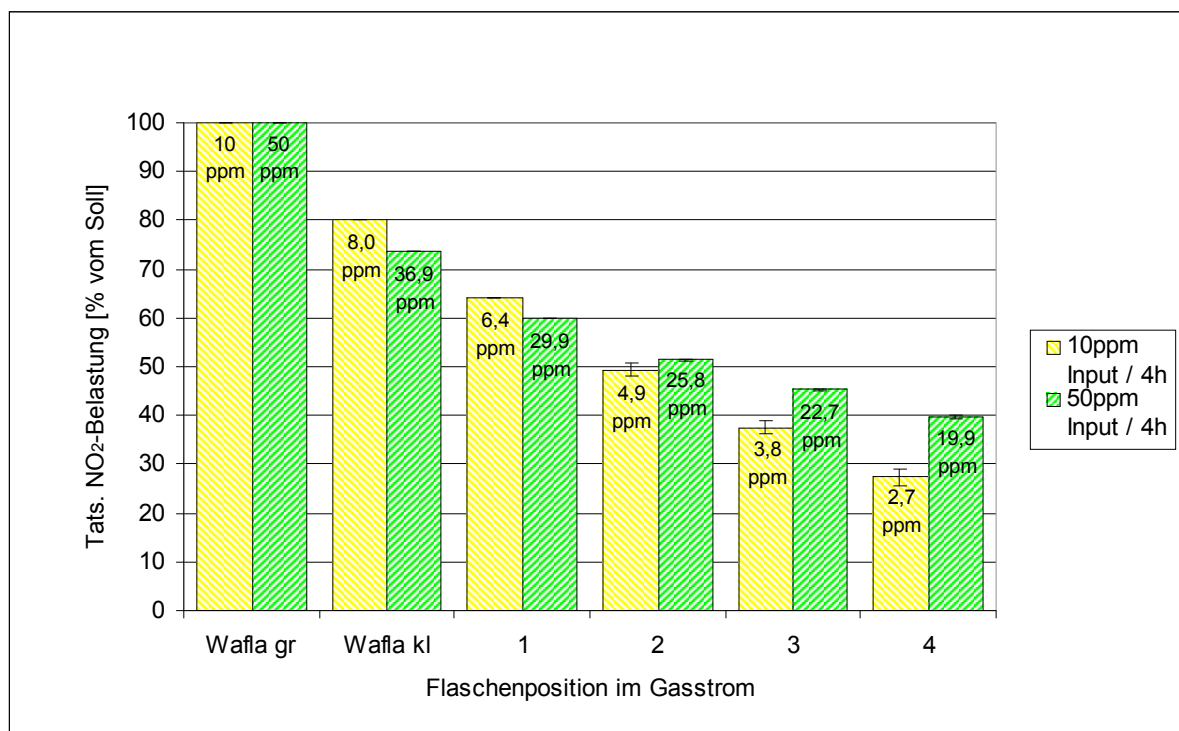
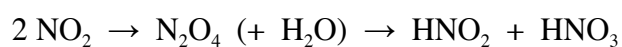


Abb. 3.2: NO₂-Belastung bezogen auf den eingestellten Wert in Abwesenheit von Zellen nach 4h bei 10ppm und 50ppm, in Abhängigkeit der Flaschenposition. In den jeweiligen Balken sind zur besseren Orientierung die korrigierten Belastungen, d.h. nach Abzug der in den jeweils vorausgehenden Stationen extrahierten NO₂-Anteile, in ppm aufgelistet.

Um trotz der nicht direkt zugänglichen NO₂-Konzentration in den Waschflaschen eine Abschätzung der tatsächlichen NO₂-Konzentrationen in der Gasphase der Kulturflaschen vornehmen zu können, wurde versuchsweise eine rechnerische Abschätzung vorgenommen. Den Ausgangspunkt bildeten zwei Annahmen: (1) Jedes solvatisierte N₂O₄-Molekül disproportionierte mit einer Geschwindigkeit, die rasch im Vergleich zur Expositionsdauer von 4h war, zu salpetriger Säure (HNO₂) und Salpetersäure (HNO₃). (2) Es wurde im beobachteten Zeitintervall kein "steady-state" erreicht, in dem die NO₂-Konzentrationen in der Gasphase und in der Flüssigkeit durch das Henry'sche Gesetz beschreibbar sind, sondern die rasche Entfernung des gelösten NO₂ durch die Disproportionierung sorgte für einen konstanten Diffusionsgradienten aus der Gasphase in die Flüssigkeit, ohne dass eine Sättigung zu beobachten war. Für die Berechnung genügt daher gemäß der Reaktionsgleichung



die Bestimmung der Nitritmenge, um Rückschlüsse auf das eingeleitete N₂O₄ zu ziehen.

Geht man nun von einer Expositionsdauer von 4h aus und nimmt an, dass der eingestellte Gasstrom 0,3L/min betrug, d.h. nach der Verzweigung mit 100mL/min jede der drei Plattformen durchströmte, dann betrug die durch die Apparatur einschließlich der Waschflaschen beförderte NO₂-Menge bei einem eingestellten Anteil von **10ppm** ungefähr:

$$N = 0,3\text{L/min} * 240\text{min} * 10\text{ppm} / 22,4\text{L/mol} = 0,00003214\text{mol NO}_2, \text{ entsprechend rund } 16\mu\text{mol N}_2\text{O}_4.$$

In der großen Waschflasche fanden sich nach Ablauf von 4h im Mittel rund 1,9 μ mol, in der kleinen Waschflasche rund 1,2 μ mol Nitrit. Dies bedeutete, dass das NO₂-Defizit gegenüber dem Ausstrom aus der Mischbatterie bereits $(1,9 + 1,2) / 16 \approx 0,2 = 20\%$ betrug und somit am Einlass der ersten Kulturflasche nur noch etwa 80% der Anfangskonzentration vorhanden war. Nach der Teilung des Gasstroms wurden in den Flaschen der Position #1 zusammen weitere 12%, in denen der Position #2 etwa 9,5%, bei der Position #3 rund 8% und in den Flaschen der Position #4 knapp 7% der eingeleiteten Menge extrahiert und als Nitrit im Salzpuffer nachgewiesen. Somit sollten am Auslass der Apparatur nach Abzug der insgesamt extrahierten 55% noch etwa 45% des eingeleiteten NO₂ vorhanden sein. Auf diesem Weg ließen sich auch die entsprechenden Werte bei einer nominellen Exposition gegenüber 1ppm und 50ppm berechnen.

3.1.1.2 Abschätzung der tatsächlichen NO₂-Konzentration

Aus Vorversuchen war bekannt, dass die in den Kulturflaschen angelieferten NO₂-Konzentrationen geringer waren als die nominell in der Mischbatterie eingestellten Werte. Da eine exakte Bestimmung in den Kulturflaschen nicht fortlaufend möglich war, wurde versucht, die Intensität der Exposition (das Konzentrations-/Zeit-Produkt) mathematisch zu erfassen. Aus Abb. 3.1 lässt sich nämlich noch eine weitere wertvolle Information entnehmen, die die Quotienten der Nitrit-Gehalte von einer Kulturflasche zur vorangehenden betrifft. Mit den in Abb. 3.1 gezeigten Werten erhält man nämlich - praktisch unabhängig von der eingeleiteten NO₂-Konzentration - vergleichbare Quotientenwerte für die in einer Kulturflasche gebildete Nitritmenge im Vergleich zur vorangehenden (Tab. 3.1). Bei vier gleichartigen Kulturflaschen mit identischem Flüssigkeitsvolumen erhält man 3 Quotienten, deren Wert sich vom Einlass zum Auslass gesehen, allmählich dem Wert "1" nähert, d.h. die pro Zeiteinheit gebildeten Nitritmengen gleichen sich an. Dies entspricht dem Verhalten einer Kurvenfunktion vom Typ $y = 1 - e^{-x}$, die sich asymptotisch dem Wert "1" nähert.

Nominelle NO₂-Konzentration »	1ppm	10ppm	50ppm
1.Quotient = Flasche #2 / Flasche #1	0.78±0,10	0.78±0,12	0.76±0,15
2.Quotient = Flasche #3 / Flasche #2	0.84±0,16	0.86±0,13	0.90±0,12
3.Quotient = Flasche #4 / Flasche #3	0.87±0,09	0.88±0,18	0.92±0,09
Berechnete NO₂-Konzentration »	1.25ppm	6.3ppm	39.7ppm

Tab. 3.1: Quotienten der Nitritbildung in benachbarten Kulturflaschen, die in Serie vom NO₂-Gasstrom mit den angegebenen Anfangsgehalten (in ppm) durchströmt wurden.

Das Ausmaß der Nitritbildung im Kulturmedium aus NO₂ in der Gasphase umfasst mindestens 4 Teilprozesse:

- (1) Anlieferung des Gases in der Kulturflasche (abhängig von eingestellter NO₂-Konzentration und Strömungsgeschwindigkeit) – konvektionskontrollierter Prozess
- (2) Übertritt von NO₂ aus der Gasphase in die Flüssigphase (abhängig von der Austauschfläche, der (Wasser)Löslichkeit des NO₂ und dem Konzentrationsgradienten zwischen beiden Phasen) – diffusionskontrollierter Prozess
- (3) Disproportionierung von solvatisiertem NO₂ (abhängig von der Geschwindigkeitskonstante der Reaktion und der Konzentration der beteiligten Komponenten NO₂ und H₂O) – reaktionskinetisch kontrollierter Prozess
- (4) Protolyse der beiden gebildeten Säure HNO₃ und HNO₂ zu den konjugierten Basen Nitrat und Nitrit (abhängig vom Gleichgewicht der Reaktion und der Dissoziationsgeschwindigkeit) – reaktionskinetisch kontrollierter Prozess

Für unseren Zweck konnte angenommen werden, dass Disproportionierung des NO₂ und anschließende Protolyse im gepufferten Kulturmedium praktisch sofort, also sehr rasch im Vergleich zu den übrigen Prozessen erfolgen. Der Übertritt aus der Gasphase wird durch die sehr große Austauschfläche (>25cm²; ständig umgewälzt) und den Konzentrationsgradienten zwischen den Phasen bestimmt, der aber wegen der raschen Weiterreaktion praktisch konstant der NO₂-Konzentration in der Gasphase entspricht. Auf diese Prozesse hat der Experimentator nur geringen Einfluss, aber der erste Schritt, die Anlieferung des Gases, kann durch Wahl der Strömungsgeschwindigkeit und der Anfangskonzentration variiert werden. Hier sind im Prinzip 3 Fälle unterscheidbar, die in Abb. 3.3 gezeigt werden.

Da es sich um gleichartige Kulturflaschen handelte, in denen eine Sättigung wegen der raschen Entfernung des solvatisierten NO₂ aus dem Gleichgewicht nicht erwartet wurde, war

davon auszugehen, dass die Konvergenz der Quotienten proportional der Abnahme des NO_2 -Gehaltes im Gasstrom entsprach.

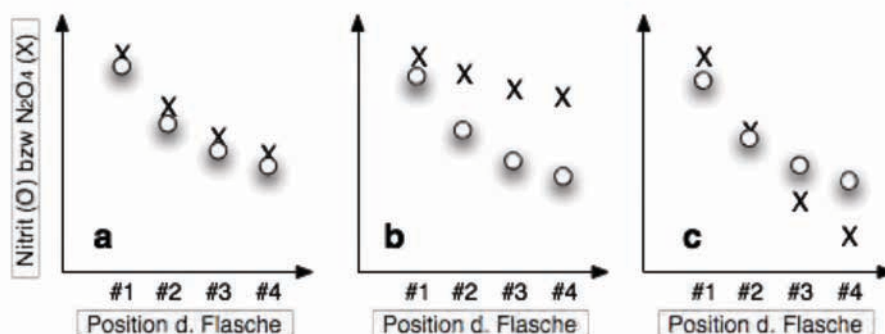


Abb. 3.3: Gemessene Nitritbildung (O – offene Symbole) im Inkubationspuffer und die angenommene NO_2 -Konzentration (X) aus der Gasphase. Im Fall (a) entspricht die (exponentielle) Abnahme der gebildeten Nitrit-Mengen im Inkubationsmedium der Abnahme der N_2O_4 -Konzentration in der Gasphase, d.h. das Henry'sche Gesetz ist uneingeschränkt gültig. Im Fall (b) ist bei derselben Abnahme der Nitritkonzentrationen von einer Flasche zur nächsten eine geringere Änderung der NO_2 -Konzentration in der Gasphase angenommen worden, weil die Verweilzeit (wg hoher Strömungsgeschwindigkeit) kurz im Vergleich zur Diffusionszeit ist. Im Fall (c) ist die Konzentrationsabnahme in der Gasphase stärker als die Zunahme der Nitritbildung im Medium. Der Fall (a) spiegelt am besten die tatsächlichen Verhältnisse wider, bei dem allein ein konzentrationslimitierter Vorgang betrachtet wird.

Fall (a) wäre zu erwarten, solange die Diffusion über die große Austauschfläche und alle folgenden Schritte rasch im Vergleich zur Anlieferung des Gases erfolgen würden. Zu jedem Zeitpunkt und an jeder Position wäre die gebildete Nitritmenge streng proportional zur durchgeleiteten NO_2 -Menge, die bei gegebenem Fluss allein von der NO_2 -Konzentration in der Gasphase abhinge. Abnehmende Konzentrationen in der Gasphase hätten dann den abgebildeten Rückgang der Nitritbildung verursacht. Im Fall (b) müsste man annehmen, dass Durchleitung des Gasstromes durch die Flaschen mit einer sehr hohen Geschwindigkeit erfolgen würde, so dass die Verweilzeit zur Gleichgewichtseinstellung nicht ausreichen würde. Da das Medium während der Exposition aber bewegt wurde und die Solvatisierung ein rascher Vorgang ist, war dies unter den gegebenen Verhältnissen unwahrscheinlich. Im Fall (c) hingegen wäre die Verweilzeit im Vergleich zur Diffusionszeit lang, so dass eine (nahezu) vollständige Extraktion des durchgeleiteten NO_2 erfolgen würde, was durch den in der Bilanz ausgewiesenen (und sporadisch durch Messung verifizierten) Restgehalt am Auslass der Apparatur auszuschließen war. Der Fall (a) entspricht dagegen am besten einem konzentrationsabhängigen Vorgang. Unter dieser Annahme wurden die gemittelten Quotienten in eine Zielwerttabelle des Kalkulationsprogramms "Microsoft Excel" eingegeben. Dann wurden verschiedene Anfangskonzentrationen ausprobiert, bis das "Solver" Modul der Software "Konvergenz" signalisierte. Die Durchführung dieser Rechnung lieferte als "wahre"

NO₂-Konzentration die in Tab. 3.1 gezeigten Werte. Auf der Basis dieser Werte, die im Einklang mit den im Medium gefunden Nitritmengen standen, wurde dann die NO₂-Konzentration am Einlass jeder Kulturflasche bei verschiedenen NO₂-Gehalten im Gasstrom abgeleitet, die dann die Grundlage für die Berechnung der Konzentrations-/Wirkungs-Beziehung und des EC₅₀-Wertes für NO₂ bildete (Abschnitt 3.2.3). Die sog. "wahren" NO₂-Gehalte sind für die 3 nominellen Konzentrationen 1ppm, 10ppm und 50ppm in Abb. 3.4 unter Berücksichtigung der vorgeschalteten Waschflaschen schematisch aufgetragen.

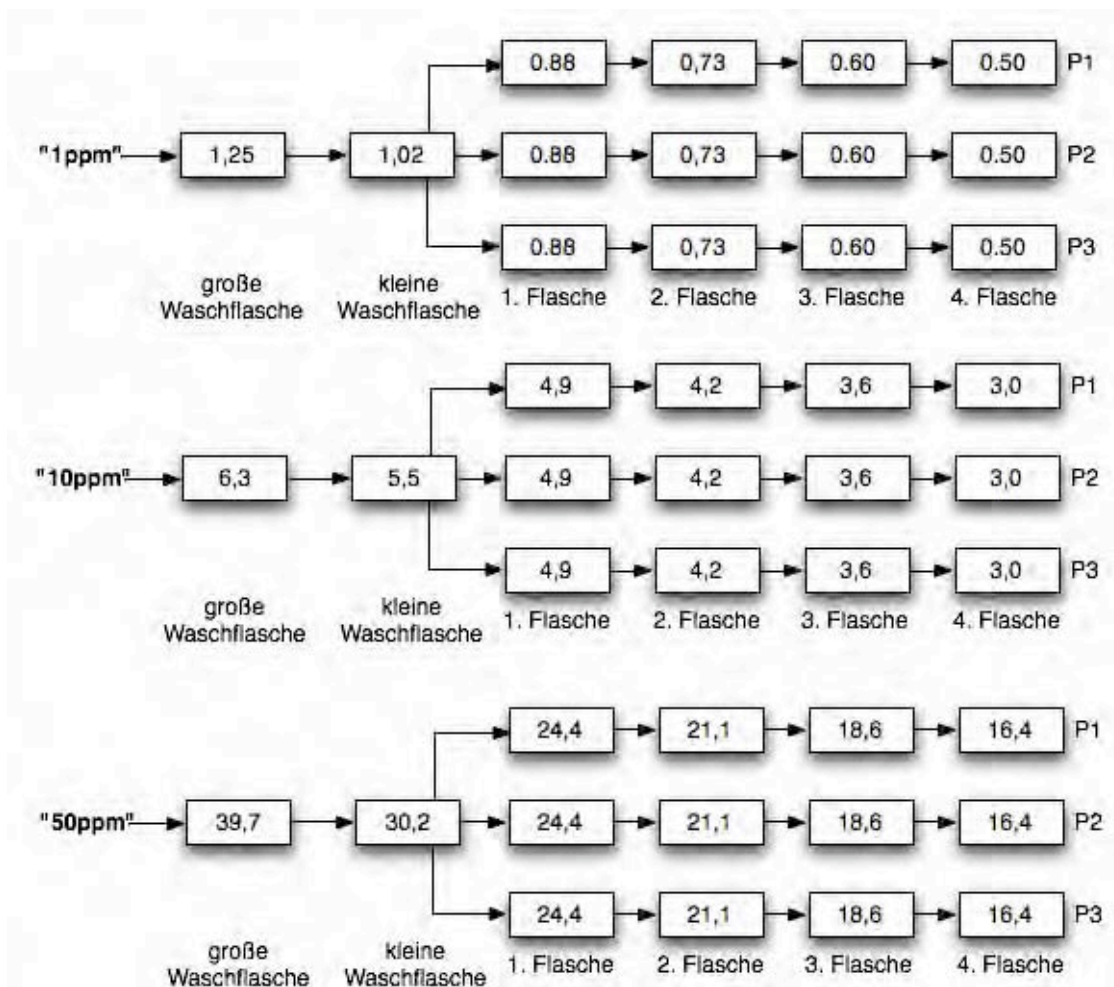


Abb. 3.4: Rechnerisch ermittelte NO₂-Konzentrationen (in ppm), die am Einlass der angegebenen Position herrschten, wenn ein konzentrationsbestimmter Solvatationsprozess des NO₂ vorlag.

Abb. 3.4 zeigt, dass die "wahren" NO₂-Gehalte mit Ausnahme der nominellen Anfangskonzentration "1ppm" niedriger waren, als am Flowmeter abgelesen wurde. Für die weitere Darstellung der Versuche wurde allerdings auf eine Korrektur von eingestellter und "wahrer" Konzentration verzichtet, um den Leser nicht zu verwirren. Abb. 3.4 geht weiterhin davon aus, dass an einzelnen Positionen zwischen den einzelnen Plattformen weitgehende Äquivalenz herrschte, so dass es gleichgültig war, ob sich eine Kulturflasche an Position 2 der

ersten oder dritten Plattform befand. Dass diese Äquivalenz der Plattformen im Rahmen der experimentellen Genauigkeit tatsächlich gegeben war, zeigt der folgende Abschnitt.

3.1.1.3 Äquivalenz der Plattformen

Eine wichtige Frage, die es zu klären galt, war, ob die Expositionen in den Flaschen, die sich auf der gleichen Position, aber auf unterschiedlichen Plattformen befanden, signifikant verschieden waren. Hierzu wurden die Mittelwerte der Nitritbildung [nmol/FI] (4h / 10ppm) einer bestimmten Flaschenposition der einen und der anderen Plattform einem t-Test unterzogen. Für die Irrtumswahrscheinlichkeit α wurde ein Wert von 5% festgelegt. Ausgehend von der Nullhypothese (die Mittelwerte von zwei miteinander verglichenen Plattformen unterscheiden sich nicht signifikant) ergaben sich folgende P-Werte für den zweiseitigen t-Test bei abhängigen Stichproben:

P-Wert für Flaschenposition 1: 0,3834

P-Wert für Flaschenposition 2: 0,2226

P-Wert für Flaschenposition 3: 0,0051

P-Wert für Flaschenposition 4: 0,0599

Die P-Werte für die Positionen 1 und 2 sind beide größer als die geforderte Signifikanzschranke von 5%. Somit unterscheiden sich die Mittelwerte nicht signifikant voneinander und die Nullhypothese ist beizubehalten. Der P-Wert für die Position 3 ist kleiner als 0,05, für die Position 4 gilt die Nullhypothese ($P > 0,05$) wieder. Da die jeweils ankommenden Nitritmengen jedoch von einander abhängen (Flasche 4 kann nur noch den Anteil des eingeleiteten NO_2 "abbekommen", der nicht bereits in den vorausgehenden Flaschen 1-3 extrahiert wurde), ist davon auszugehen, dass die gebildeten Nitritmengen nicht signifikant von einander verschieden sind.

3.1.1.4 Nicht-Äquivalenz der Flaschenpositionen

Statistisch lässt sich zeigen, dass die einzelnen Flaschenpositionen auf einer Plattform – streng genommen – nicht äquivalent sind. Vergleicht man die Mittelwerte der Nitritbildung [nmol/FI] (4h / 10ppm) aller Flaschen, die sich auf unterschiedlicher Position der gleichen Plattform befanden, miteinander, erhielt man folgende P-Werte für den zweiseitigen t-Test bei abhängigen Stichproben:

P-Wert für Flaschenposition 1 / Flaschenposition 2: $2,2127 \cdot 10^{-5}$

P-Wert für Flaschenposition 2 / Flaschenposition 3: $3,8873 \cdot 10^{-5}$

P-Wert für Flaschenposition 3 / Flaschenposition 4: $4,2551 \cdot 10^{-5}$

Da der P-Wert in allen drei Fällen weit unterhalb des für α festgelegten Wertes von 0,05 liegt, kann in allen drei Fällen behauptet werden, dass sich die Mittelwerte signifikant voneinander unterscheiden. Somit ist die Extraktion von Flasche zu Flasche innerhalb einer Plattform signifikant verschieden. Dieser Unterschied blieb jedoch bei den weiteren Darstellungen unberücksichtigt, da die "biologischen Konsequenzen" vernachlässigbar waren.

3.1.2 Zeitlicher Verlauf der Nitritbildung aus NO₂

Um die Nitritbildung über einen längeren Zeitraum zu messen und damit Rückschlüsse auf Konstanz der NO₂-Begasung zu ziehen, wurde die Dauer der Begasung im zellfreien System auf 24h ausgedehnt. Die Flaschen der obersten Plattform wurden erst nach 4 Stunden auf die "off-line"-Position geschoben, die Flaschen der mittleren Plattform erst nach 12 Stunden. Die Flaschen der untersten Plattform waren letztlich 24 Stunden lang dem NO₂-Gas ausgesetzt.

Abb. 3.5 zeigt den zeitlichen Verlauf der gebildeten Nitrit-Mengen an. Kulturflaschen auf der Position 1 zeigt über 24h einen ziemlich linearen Verlauf der gebildeten Nitritmenge. Erwartungsgemäß fiel die Nitritbildung in den nachgeschalteten Flaschen geringer aus, allerdings zeigten sich auf den Positionen 2, 3 und 4 Abweichungen von der Linearität. Die Ursachen dafür konnten bisher nicht restlos geklärt werden.

Dennoch entsprach die NO₂-Extraktion den Erwartungen für ein Gas, das mit Wasser ausgiebig reagiert, - insbesondere im Zeitrahmen einer 4-stündigen Begasung.

Nitritbildung zellfrei / 1h, 2h, 4h, 12h, 24h / 10ppm

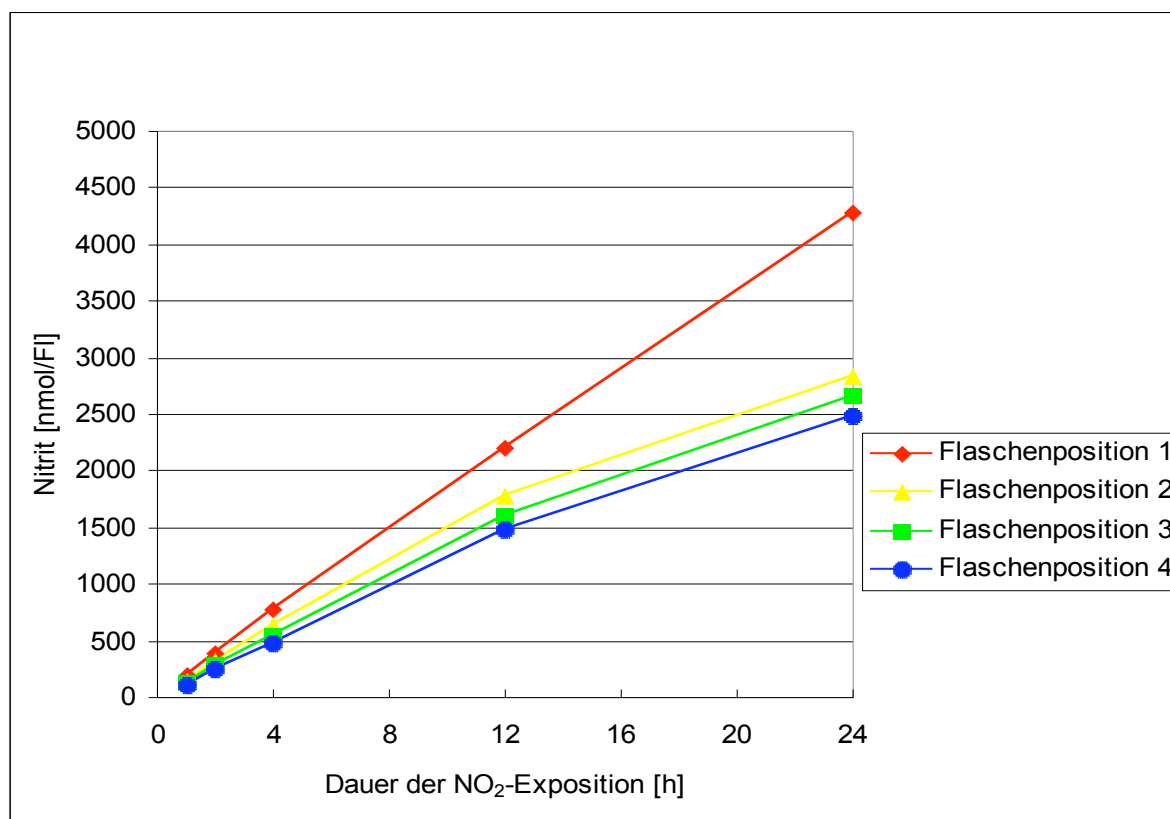


Abb. 3.5: Nitritbildung aus NO₂ (10ppm) im zellfreien System in Abhängigkeit der Dauer [h] der Begasung

3.1.3 NO₂-Extraktion bei unterschiedlicher Strömungsrichtung

Wie im Abschnitt 2.5.1 bereits erwähnt, ist es möglich, das Trägergas / Testgas-Gemisch von beiden Seiten her einzulassen. Um die Gleichmäßigkeit der Begasung zu überprüfen, wurden für die 4-stündige Exposition (siehe Abschnitt 3.1.2) bei der Hälfte der Versuche das Gas von der linken Seite, bei der anderen Hälfte der Versuche das Gas von der rechten Seite her eingeblasen.

Abb. 3.6 zeigt für jede der 4 Flaschenpositionen bei 1h und 4h die erfolgte Nitritbildung. Da dieser Versuch pro Seite nur einmal wiederholt wurde, machte sich der einmalige Ausreißerversuch von der linken Seite stark bemerkbar. Berücksichtigt man aber die Standardabweichungen, so waren Unterschiede bei Umkehr der Strömungsrichtung im Rahmen der experimentellen Genauigkeit vernachlässigbar. Auf eine statistische Behandlung wurde aufgrund der geringen Anzahl unabhängiger Versuche verzichtet. Dennoch wurden die biologischen Experimente immer mit derselben Anordnung durchgeführt.

Nitritbildung zellfrei / 1h, 4h / 10ppm / Einlass links, rechts

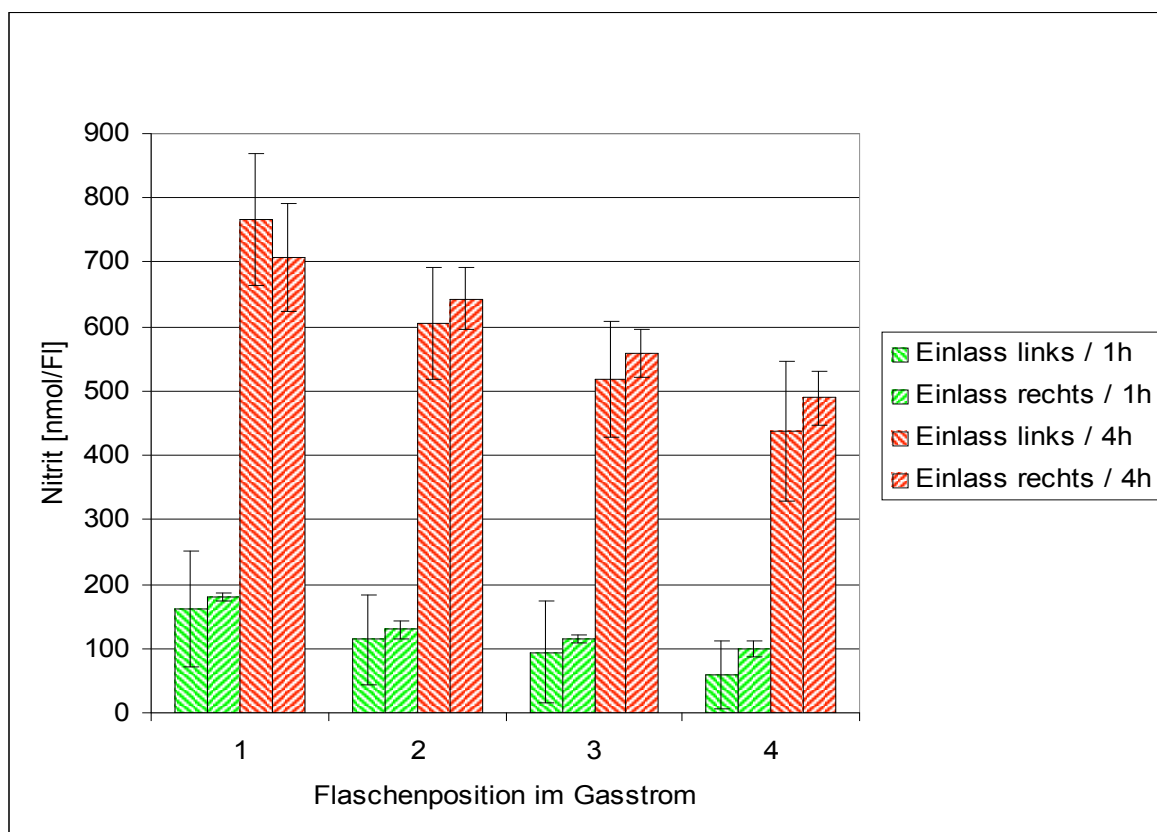


Abb. 3.6: Nitritbildung in Abwesenheit von Zellen nach 1h und 4h bei unterschiedlicher Seite des Gaseinlasses, in Abhängigkeit der Flaschenposition

3.2 Expositionsversuche mit Zellen

3.2.1 Einfluss der Verweilzeit des Mediums auf den GSX-Gehalt

Nachdem NO_2 vor allem als oxidierende Substanz, die in biologischen Systemen oxidativen Stress induziert, in Erscheinung getreten war, fiel die Wahl eines geeigneten Indikatorparameters ("Endpunkt") für die biologischen Wirkungen auf Glutathion. Es wurde zunächst geprüft, ob sich der zelluläre Glutathion-Gehalt (ausgedrückt in nmol GSX pro mg Eiweiß) über die beabsichtigten Inkubationszeiten konstant verhielt. Abb. 3.7 zeigt eine Abnahme des zellulären Glutathion-Gehalts, wenn das Medium länger nicht gewechselt wurde. In einem Zeitfenster von bis zu 12h konnten diese GSX-Verluste allerdings vernachlässigt werden. Nach 12h ergab sich ein Verlust von 7,1%, nach 16h ein Verlust von 13,7%, verglichen mit dem GSX-Wert nach 4h. Wurde das Medium hingegen 20 oder gar 24 Stunden auf den Zellen belassen, hatte dies stärkere Einflüsse auf den GSX-Gehalt als angenommen. Nach 20h ergaben sich Verluste von 27,8%, nach 24h von rund 47% des GSX-Gehaltes. Wurde

anschließend das Medium gewechselt, dann dauerte es knapp 4h, bis sich der GSX-Gehalt der Zellen wieder erholt hatte (ohne Abb.).

Einfluss der Verweilzeit des Mediums auf den GSX-Gehalt der Zellen

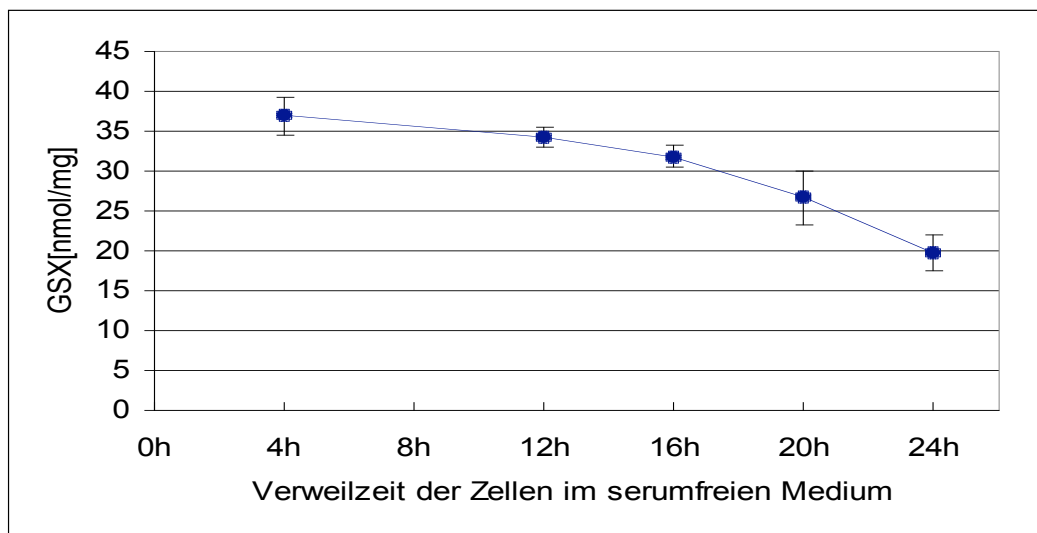


Abb. 3.7: Zellulärer GSX-Gehalt, gemessen nach 4h, 12h, 16h, 20h und 24h Verweilzeit des Medium auf den Zellkulturen

3.2.2 Wahl der NO₂-Konzentration

Wie bereits im Abschnitt 3.1.1.1 erwähnt hatten Vorversuche ergeben, dass eine Begasung der Zellen über 4 Stunden bei einer eingestellten Konzentration von 10ppm einen brauchbaren Kompromiss zwischen Erhaltung der Lebensfähigkeit auf der einen Seite und Abnahme der Vitalität der Zellen auf der anderen Seite darstellte. Um eine genauere Aussage über die Konzentrations-/Wirkungs-Beziehung machen zu können (Dosis-Wirkungskurve) wurde auch das Verhalten der Zellen auf 1ppm und 50ppm NO₂-Konzentration untersucht.

12 Standardkulturflaschen (mit Zellen) wurden vor dem Versuch mit 2mL frischem Nährmedium DMEM/F12 (ohne Serumzusatz) versetzt. Jeweils alle 4 Flaschen der obersten und der untersten Plattform wurden zu Beginn der Begasung auf die "in-line"-Position geschoben. Die Zellen der mittleren Plattform blieben als Kontrollen in der "off-line"-Position und daher unbegast. Abb. 3.8 und Abb. 3.9 zeigen den zellulären GSX-Gehalt, der bei verschiedenen NO₂-Konzentrationen nach 4h und nach 24h gemessen wurde.

Bei 4-stündiger Exposition (Abb. 3.8) bestätigte sich die in Vorversuchen gewonnene Erkenntnis, dass 1ppm NO₂ keine erkennbare Änderung des GSX-Gehaltes bewirkt. Bei 50ppm erfuhren die Zellen eine starke Abnahme des GSX-Gehaltes auf 20,2% bis 44,2% des Kontrollwertes (je nach Position). Dies zeigte sich auch unter dem Mikroskop, denn Zellen

bei 1ppm über 4h unterschieden sich praktisch nicht von solchen, die in der gleichen Zeit allein dem Trägergas ausgesetzt waren (Schaden "0"). Bei 50ppm beobachtete man eine weitgehende Ablösung des Zellrasens von der Unterlage. Die Zellen waren geschwollen und nicht mehr subkultivierbar. Insgesamt war eine schwere Schädigung erkennbar (Schaden "++"). Eine Begasung mit 10ppm zeigte dagegen einen intakten Zellrasen, in dem große Bezirke mit deutlich sichtbaren (aufgeweiteten) Zellgrenzen vorherrschten. Biochemisch fiel eine deutliche Abnahme des GSX-Gehaltes nach 4h auf, die allerdings nicht von massivem Zelluntergang begleitet war. Eine GSX-Abnahme auf bis zu 52,9% ließ eine Erholung möglich erscheinen, wohingegen die Zellen nach 50ppm NO₂ über 4h irreversibel geschädigt waren.

Einfluss von NO₂ auf den GSX-Gehalt / 4h /1ppm, 10ppm, 50ppm

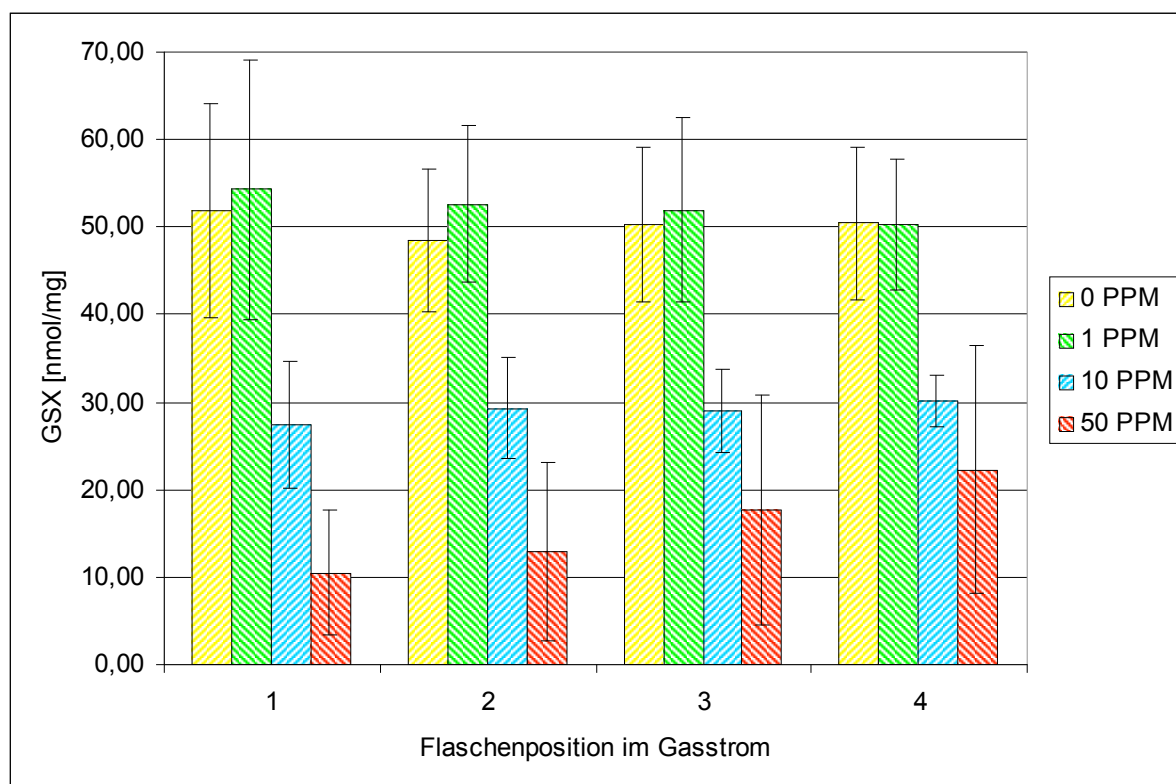


Abb. 3.8: Belastung NO₂-exponierter A549 Zellen, gemessen am zellulären GSX-Gehalt nach 4h bei nominell 0ppm (Kontrolle), 1ppm, 10ppm und 50ppm NO₂, in Abhängigkeit der Flaschenposition

Abb. 3.9 veranschaulicht den Effekt einer 24-stündigen Begasung. Bei 50ppm erfuhren die Zellen mit 7,3% (Position 1), 6,2% (Position 2), 5,5% (Position 3) und 6,3% (Position 4) des Kontrollwertes einen massiven Abfall des GSX-Gehaltes, der die Zellvitalität massiv beeinträchtigte (Morphologie: Schaden ++). Auch bei 10ppm erschien eine 24-stündige Begasung angesichts der GSX-Verluste als zu lange. Vor allem in Position 1 wurden die Zellen mit

einem GSX-Abfall auf 16,9% des Ausgangswertes stark dezimiert (Schaden ++). Der GSX-Gehalt der Positionen 2, 3, und 4 fiel mit 41,2% bis 64,9% des Kontrollwertes (je nach Position) moderater aus. Der GSX-Gehalt der Zellen, die mit 1ppm begast wurden, entsprach in etwa dem Wert der nicht begasten Zellen.

Einfluss von NO₂ auf den GSX-Gehalt / 24h /1ppm, 10ppm, 50ppm

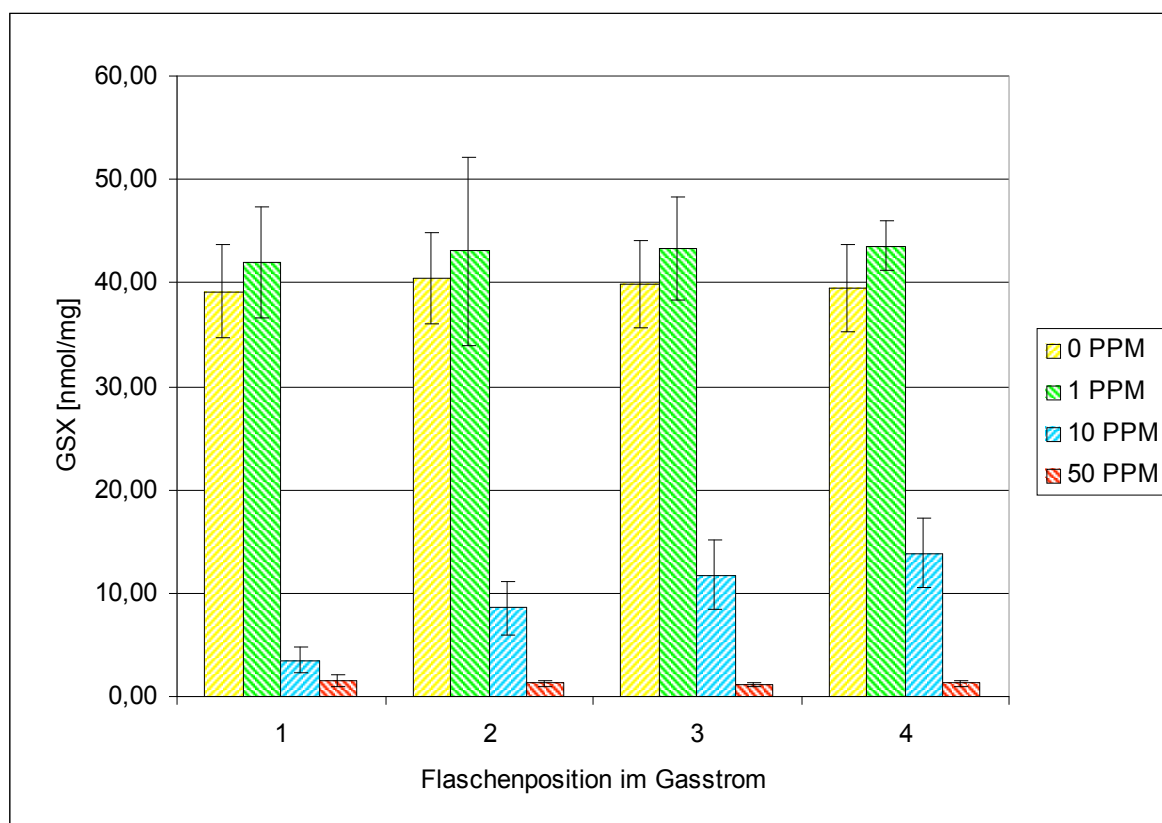


Abb. 3.9: GSX-Gehalte [nmol/mg] NO₂-exponierter A549 Zellen nach 24h Belastung bei nominell 0ppm (Kontrolle), 1ppm, 10ppm und 50ppm NO₂, in Abhängigkeit der Flaschenposition

3.2.3 Konzentrations-/Wirkungs-Kurve

Um den EC₅₀-Wert für den Endpunkt "Zellulärer GSX-Gehalt" nach einer Expositionsdauer von 4h abzuschätzen, wurde eine 4-parametrische, sigmoide Funktion an die GSX-Daten angepasst.

$$W = f(c) = W_{NOEL} + \frac{W_{max} - W_{NOEL}}{\left(1 + \frac{c}{EC_{50}}\right)^n} \quad F1$$

In dieser Funktion tritt die Wirkung W (abgeschätzt über den GSX-Gehalt der Zellen) als Funktion der Nitrit-Konzentration c auf, wobei W_{NOEL} die Wirkung in Abwesenheit der Noxe (spontane Veränderung bzw. Kontrolle) und W_{max} die maximal erzielbare Wirkung bedeutet. EC_{50} ist die Konzentration mit halbmaximaler Wirkintensität und n der sog. Hill-Koeffizient, der die Steilheit des Übergangs von W_{NOEL} zu W_{max} beschreibt. Zusätzlich wurde angenommen, dass W_{NOEL} praktisch dem Messwert der (unbehandelten) Kontrollen entsprach, während W_{max} auf den niedrigsten GSX-Gehalt "geklemmt" wurde, der bei allen mit der Expositionskammer und NO_2 als Testsubstanz an A549 Zellen durchgeführten Untersuchungen jemals beobachtet wurde (6,5nmol GSX/Flasche). Das Ergebnis ist die Konzentrations-/Wirkungs-Kurve, deren Verlauf in Abb. 3.10 wiedergegeben ist. Dort ist die Menge der aus dem extrahierten NO_2 gebildeten Nitrit in der Einheit "nmol pro Flasche" und die aus den Zellen extrahierbare Glutathionmenge - ebenfalls in der Einheit "nmol pro Flasche" - aufgetragen. Auf eine Normierung des GSX-Gehaltes auf mg (Protein) wurde verzichtet, um nicht die eventuellen Fehler durch die Miteinbeziehung eines zusätzlichen gemessenen Faktors zu vergrößern. Für die Konzentration, die innerhalb von 4h zur Halbierung des zellulären GSX-Gehaltes (im Vergleich zum Ausgangswert) führte (sog. EC_{50}) ergab sich ein Mittelwert von 2010 ± 119 nmol/Flasche. Dies entspräche bei vollständiger Absorption des eingeleiteten NO_2 einer Konzentration von etwa 3,75ppm NO_2 in einem Gasstrom von 100mL/min. Der EC_{50} -Wert, d.h. diejenige Nitritmenge, die innerhalb von 4h eine Abnahme des GSX-Gehaltes auf 50% des Ausgangswertes bewirkte, lag bei 2010 ± 120 nmol/Flasche. Diese Aussage lässt sich anders formulieren: eine Abnahme des GSX-Gehaltes auf 50% des Ausgangswertes war erreicht, wenn die Nitritkonzentration im Medium innerhalb von 4h auf $1,0 \pm 0,06$ mM angestiegen war. Da der absichtliche Zusatz von Nitrit (als $NaNO_2$) ins Medium bis 50mM keinerlei Auswirkungen auf den GSX-Gehalt der A549 Zellen zeigte, konnte die Abnahme des GSX-Gehaltes am ehesten der oxidierenden Wirkung des NO_2 zugeschrieben werden. Um einen Bezug zur voreingestellten NO_2 -Konzentration herzustellen, mussten die Nitritwerte auf die erforderliche NO_2 -Menge umgerechnet werden: bei einem Gasstrom von 100mL/min und vollständiger Absorption des eingeleiteten NO_2 hätte der NO_2 -Gehalt bei rund 3,75ppm liegen müssen, denn 2μ mol Nitrit entstehen bei der Disproportionierung von 4μ mol NO_2 , z.B. bei einem Fluss von 16nmol/min oder 3,75nL NO_2 pro mL und min während der Expositionszeit von 4h.

Konzentrations-/Wirkungs-Beziehung Nitritbildung / GSX-Gehalt der Zellen

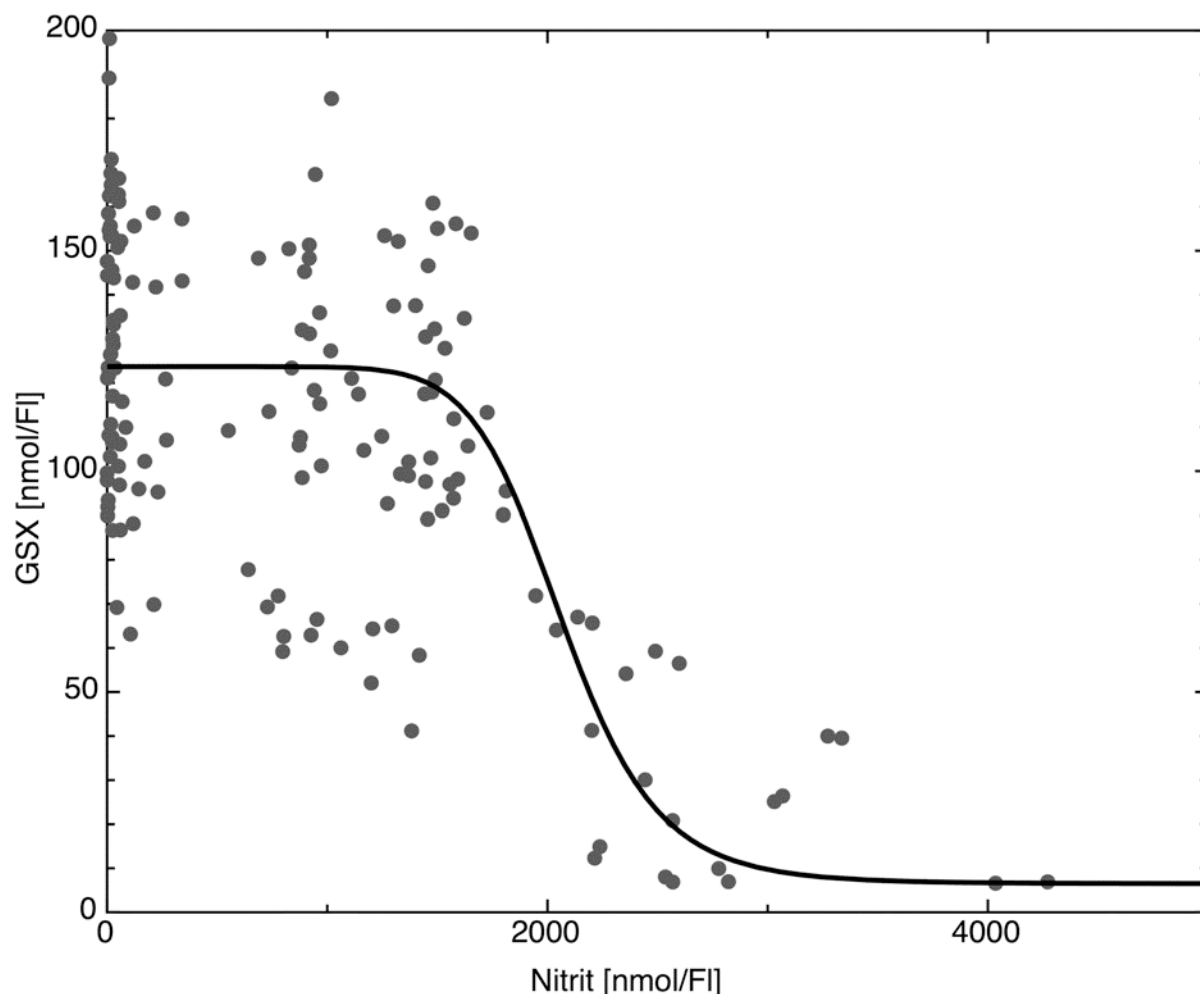


Abb. 3.10: Konzentrations-/Wirkungs-Beziehung zwischen der Nitritbildung [nmol/Flasche] aus absorbiertem NO_2 -Gas und dem zellulären GSX-Gehalt der Zellen [nmol/Flasche]. Die beträchtliche Schwankung der Ausgangswerte der zellulären GSX-Gehalte sind vor allem durch unterschiedliches Alter der A549 Kulturen und unterschiedliche Zelldichte zu Versuchsbeginn bedingt.

3.2.4 Erholungsversuche: Wahl der Glucocorticoidkonzentration

Nachdem Glucocorticoide bei der Therapie des toxischen Lungenödems immer noch Anwendung finden, sollte der Einfluss von ausgewählten synthetischen Steroiden auf die Erholbarkeit NO_2 -exponierter Zellen (sog. "therapeutischer Ansatz") geprüft werden. Es war aus der Literatur bekannt, dass Corticoide in hohen Konzentrationen die Vitalität von Zellen beeinträchtigen können [30]. Deshalb wurde zunächst untersucht, wie sich verschiedene Konzentrationen von Beclomethason und Budesonid auf das Wachstum der Zellen auswirkten. Da bei den Expositionsversuchen die Erholungsphase auf 20 Stunden beschränkt war, wurden die beiden untersuchten Corticoide in verschiedenen Konzentrationen ebenfalls 20 Stunden lang auf den Zellen belassen. Die Corticoide wurden in Nährmedium verdünnt

und zu Beginn des Versuches gegen das Kulturmedium (2mL) ausgetauscht. Wie im Abschnitt 3.2.1 erklärt, waren auch hier die absoluten GSX-Werte einzelner Versuche vom Kulturalter und der Zelldichte beeinflusst. Deshalb wurde zur graphischen Auftragung auf die jeweiligen Kontrollansätze bezogen.

Zur Abschätzung eines EC_{50} -Wertes für den Endpunkt "zellulärer GSX-Gehalt" (nach einer 20-stündigen Verweilzeit der Steroide auf den Zellen) wurde für Beclomethason und für Budesonid auch wiederum eine Kurvenanpassung einer 4-parametrischen sigmoiden Funktion an die GSX-Daten vorgenommen. Das Ergebnis sind Konzentrations-/Wirkungs-Kurven, deren Verläufe in Abb. 3.11 (Beclomethason) und Abb. 3.12. (Budesonid) wiedergegeben sind.

Konzentrations-/Wirkungs-Beziehung Beclomethasonkonz. / GSX-Gehalt der Zellen

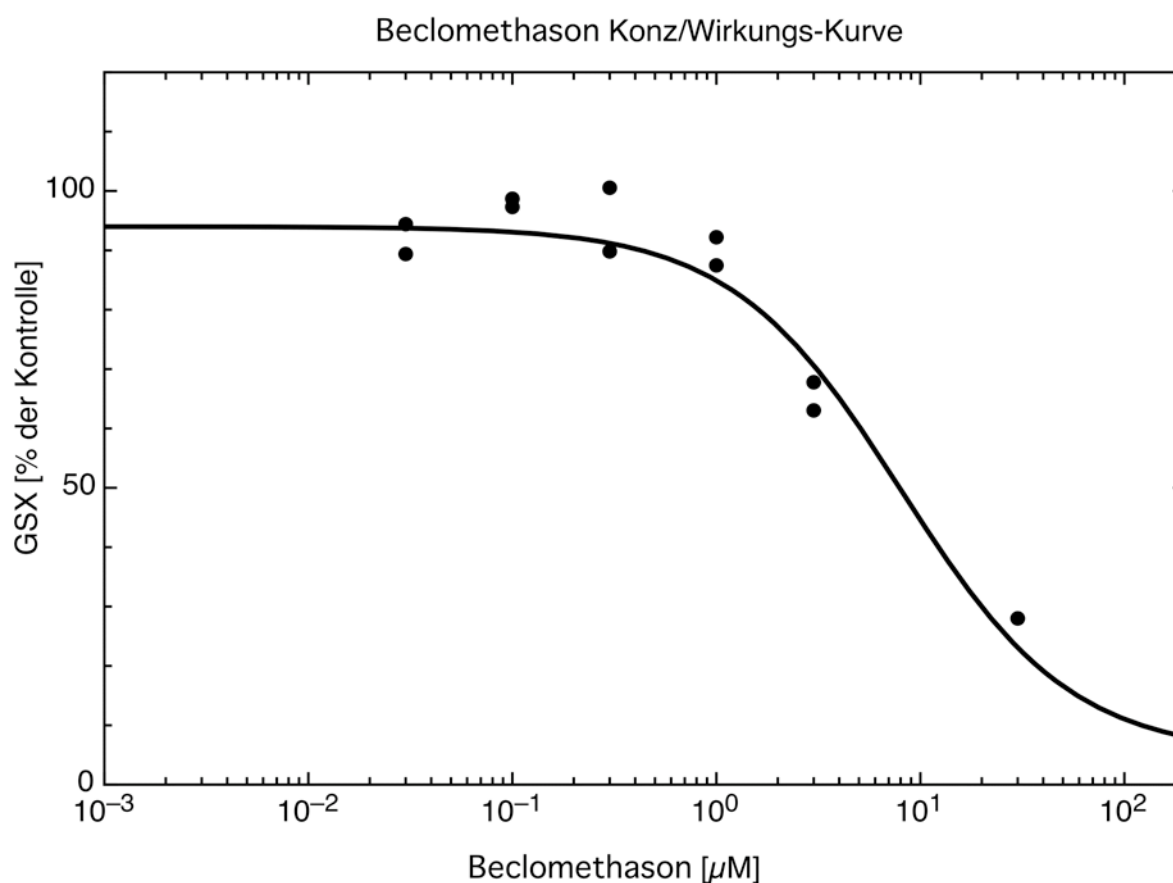


Abb. 3.11: Konzentrations-/Wirkungs-Beziehung zwischen der Konzentration von Beclomethason und dem relativen zellulären GSX-Gehalt (ausgedrückt als % der Kontrolle) der A549 Zellen nach 20-stündiger Einwirkzeit.

Konzentrations-/Wirkungs-Beziehung Budesonidkonz. / GSX-Gehalt der Zellen

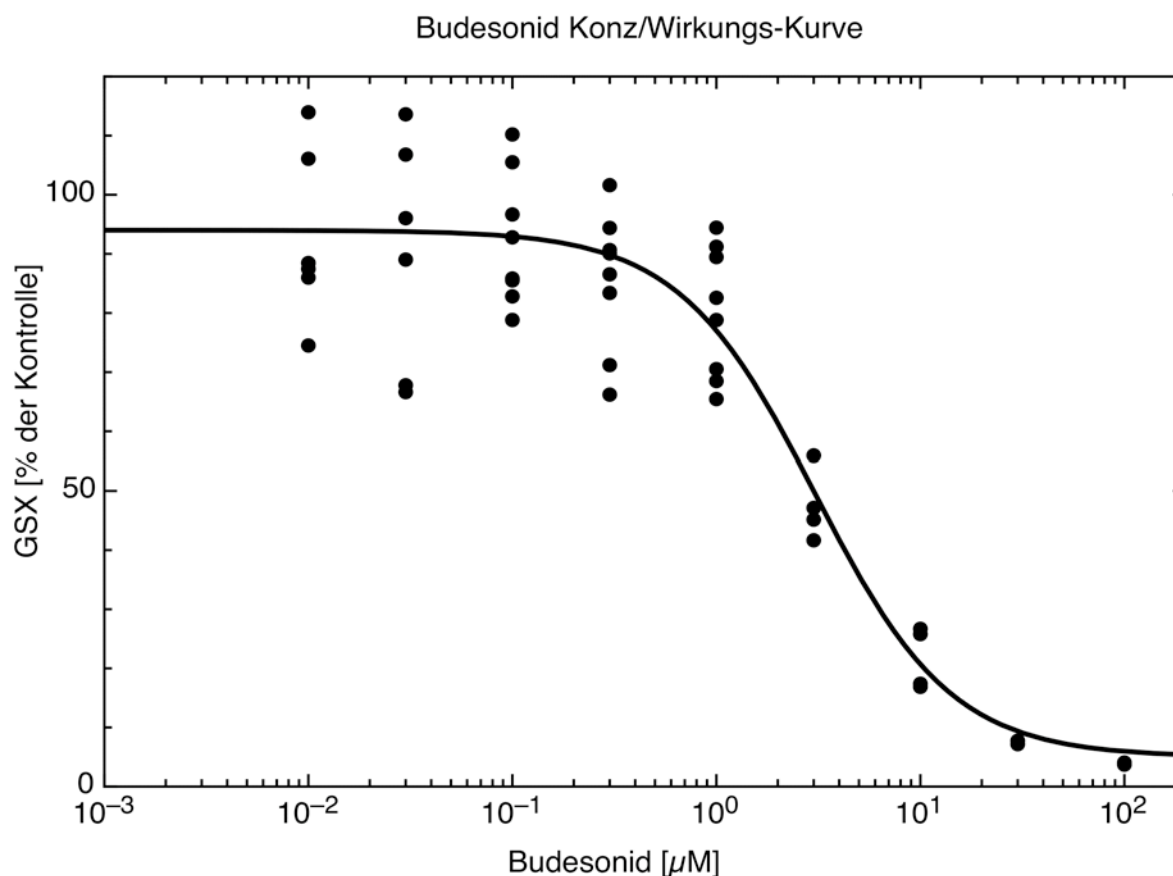


Abb. 3.12: Konzentrations-/Wirkungs-Beziehung zwischen der Konzentration von Budesonid und dem relativen zellulären GSX-Gehalt (ausgedrückt als % der Kontrolle) der A549 Zellen nach 20-stündiger Einwirkzeit

3.2.5 Wirkungen von Glucocorticoiden auf NO₂-exponierte Zellen

Eine interessante Fragestellung dieser Arbeit war, ob Glucocorticoide wie Beclomethason und Budesonid in dem hier untersuchten in-vitro-System eine "therapeutische" Wirkung zeigen würden. Als typisches Szenario wurde wiederum eine 4h Exposition mit NO₂ (nominell 10ppm) gewählt. Anschließend wurden 2 Flaschen geopfert, um die stattgefundenene Exposition und die zu erwartende GSX-Abnahme zu verifizieren. Die anderen Flaschen erhielten neues Medium, dem ggf Beclomethason oder Budesonid in den Konzentrationen 0,1 oder 1,0µM zugesetzt worden waren. Obwohl die beiden Glucocorticoide deutlich potenter als das schon früher getestete Dexamethason oder Hydrocortison war, wurde auf eine Reduktion der Konzentration (zur Einstellung äquieffektiver Konzentrationen) verzichtet, solange keine toxische Wirkung auf den Parameter GSX zu erwarten war. Abb. 3.11 bzw. 3.12 hatten gezeigt, dass dies erst oberhalb von 1µM zu erwarten war. Die Nachinkubation unter dem Einfluss der Steroide wurde 20h lang durchgeführt, anschließend wurden alle verbliebenen

Kulturen aufgearbeitet, um Veränderungen des GSX-Gehaltes zu messen. Zwei Flaschen wurden ohne den Zusatz der Steroide nachinkubiert. Mit ihnen sollte die "Spontanerholung" erfasst werden.

Abb. 3.13a und Abb. 3.14a zeigen als Ergebnis dieser Versuche die relativen GSX-Werte in % in Bezug zu den jeweiligen Kontrollkulturen, wobei Abb. 3.13 die Werte für die Behandlungsphase mit Beclomethason und Abb. 3.14 die Werte für die Behandlungsphase mit Budesonid beinhaltet.

Die Flaschen der ersten Plattform der Apparatur tragen die Nummern 1 bis 4, die der zweiten Plattform die Nummern 5 bis 8 und die der dritten Plattform die Nummern 9 bis 12. Die Flaschen der zweiten Plattform blieben unbegast und dienten somit als Bezugswert sowohl für die 4-stündigen als auch für die 24-stündigen Werte. Die Expositionsflaschen, die mit Beclomethason oder Budesonid nachinkubiert wurden (9–12), tragen den Zusatz "a", wenn die Konzentration des Steroids $0,1\mu\text{M}$ betrug, oder "b", wenn die Konzentration des Steroids $1,0\mu\text{M}$ betrug. Die abgebildeten Balken sind Mittelwerte \pm SD aus mindestens 3 unabhängigen Ansätzen. Da die absoluten Werte in Abhängigkeit von Zelldichte und Kulturalter wieder deutlich schwankten, wurde wiederum eine prozentuale Darstellung gewählt, bei der als Bezugswert unbehandelte Kulturen dienten, die während des Versuchs 4h oder 4+20h lang ohne Begasung gehalten worden waren. Man erkennt deutlich, dass in den Flaschen #1 und #3 (aufgearbeitet nach 4h) der GSX-Gehalt abgenommen hatte, während die Flaschen #2 und #4 nach Ablauf von 24h beinahe eine Normalisierung (100%) ihres GSX-Gehaltes erfahren hatten.

Einfluss von Beclomethason auf NO₂-exponierte Zellkulturen

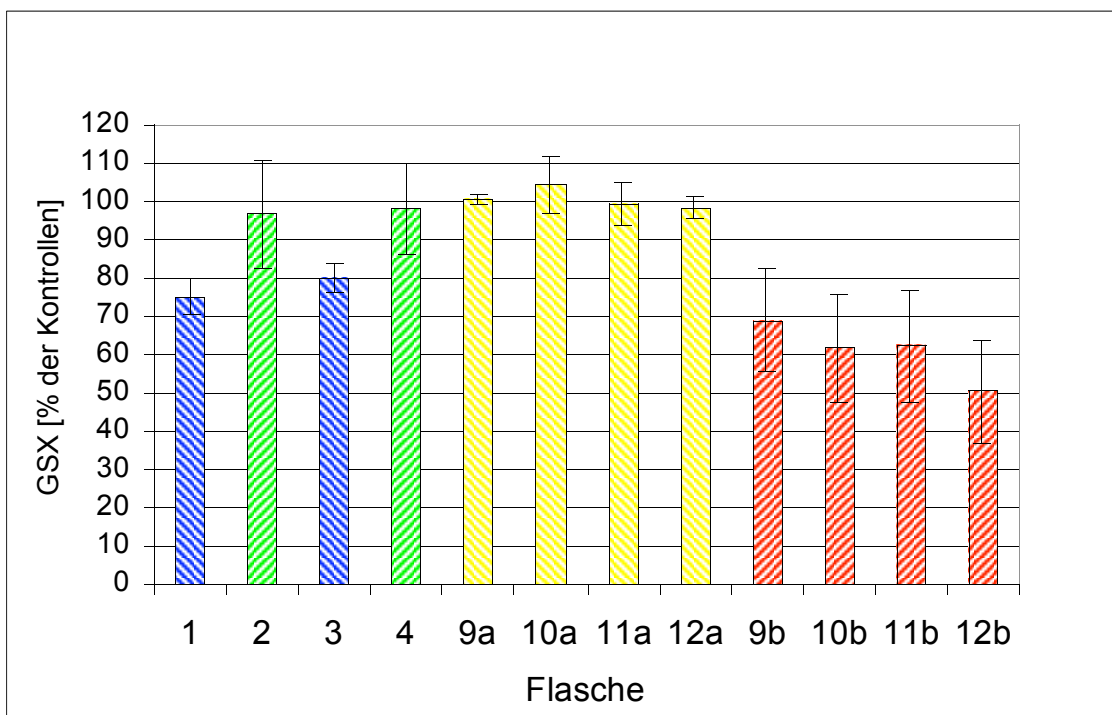


Abb. 3.13a: Zellulärer GSX-Gehalt der NO₂-exponierten Zellkulturen (in % un behandelter Kontrollen) nach 4h NO₂ (10ppm) (Flaschen 1 und 3) sowie nach anschließender Nachinkubation mit frischem DMEM/F12 über 20h (Flaschen 2 und 4) bzw. nach 20-stündiger Behandlung mit 0.1µM (Flaschen 9a-12a) oder 1.0µM Beclomethason (Flaschen 9b-12b).

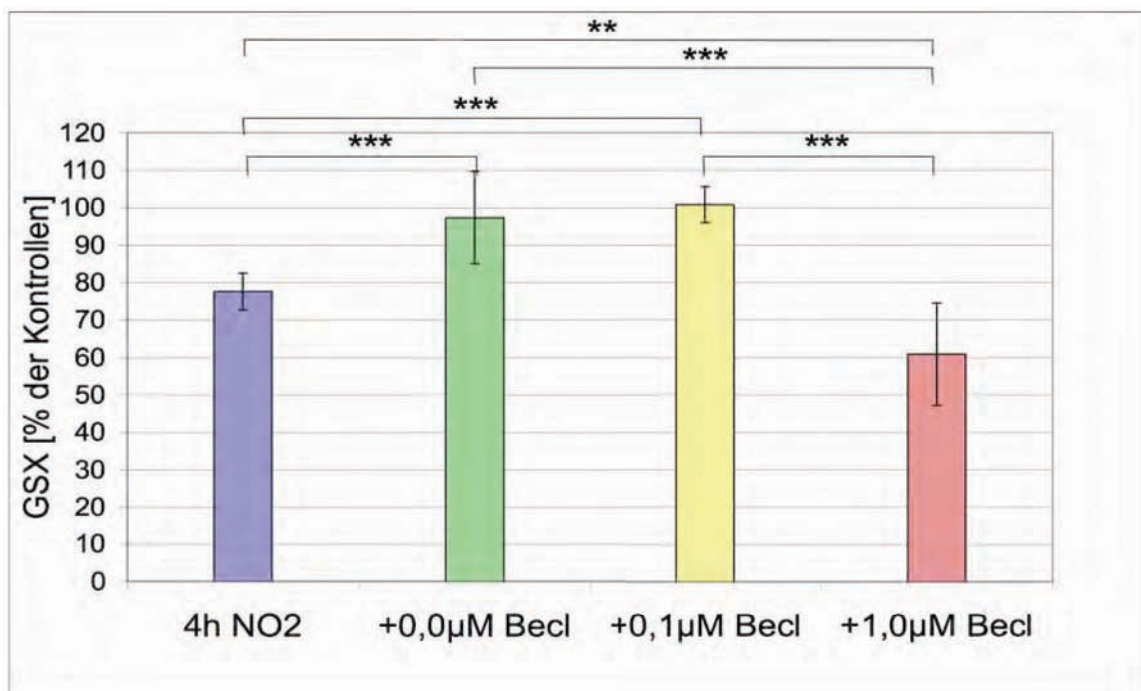


Abb. 3.13b: GSX-Gehalt (in % un behandelter Kontrollen) von A549 Zellen am Ende einer Nachbehandlung mit unterschiedlichen Beclomethason-Konzentrationen im Anschluss an eine 4h Exposition mit NO₂ (10ppm). Auf statistische Unterschiede wurde mit dem SNK-Test geprüft. (** p < 0,01; *** p < 0,001)

Trotz der Unterschiede, die möglicherweise auf die verschiedenen Positionen der Kulturflaschen im Gasstrom zurückzuführen waren, wurden die Daten aus Abb. 3.13a gruppenweise zusammengefasst. Die Unterscheidung der GSX-Gehalte am Ende der 4h Exposition sowie die Änderung im Verlauf der Nachinkubation (mit und ohne Steroidzusatz) ist in Abb. 3.13b dargestellt. Eine statistische Analyse der multiplen Resultate (Student-Newman-Keuls-Test) ergab, dass die exponierten und die nachinkubierten Zellen mit einer mittleren Differenz von rund 21nmol/mg GSX hochsignifikant verschieden waren ($p < 0.001$). Der Zusatz von Beclomethason ($0,1\mu\text{M}$) in der Nachinkubationszeit verbesserte das Ergebnis nicht. Zwischen den beiden Gruppen bestand kein signifikanter Unterschied. Wurde die Konzentration von Beclomethason auf $1,0\mu\text{M}$ erhöht, so fiel die Erholung deutlich schlechter aus als mit $0,1\mu\text{M}$ oder ohne Beclomethason. Die GSX-Defizite der Gruppe mit $1,0\mu\text{M}$ Beclomethason waren gegenüber beiden anderen signifikant ($p < 0,001$) verschieden. Bemerkenswerterweise unterschied sich die Gruppe, die mit $1,0\mu\text{M}$ Beclomethason behandelt worden war, gar nicht von der Expositionsgruppe, die nach 4h am Ende der NO_2 -Exposition analysiert worden war, so dass behauptet werden darf, dass unter dem Einfluss von $1\mu\text{M}$ Beclomethason überhaupt keine Erholung stattgefunden hatte.

Einfluss von Budesonid auf NO_2 -exponierte Zellkulturen

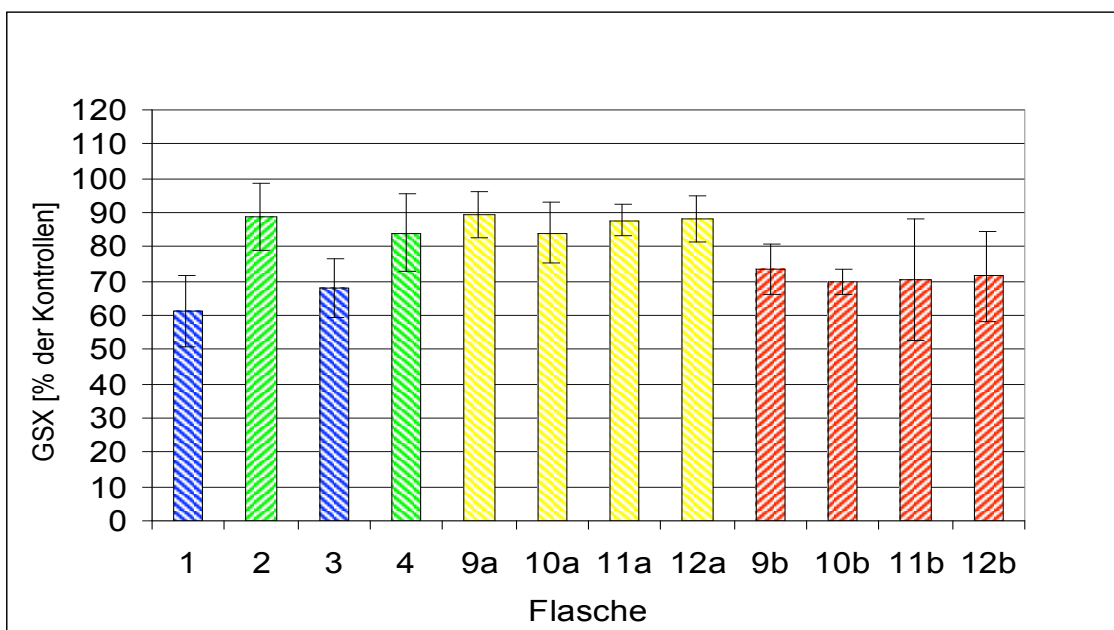


Abb. 3.14a: Zellulärer GSX-Gehalt der NO_2 -exponierten Zellkulturen (in % unbehandelter Kontrollen) nach 4h NO_2 (10ppm) (Flaschen 1 und 3) sowie nach anschließender Nachinkubation mit frischem DMEM/F12 über 20h (Flaschen 2 und 4) bzw. nach 20-stündiger Behandlung mit $0,1\mu\text{M}$ (Flaschen 9a-12a) oder $1,0\mu\text{M}$ Budesonid (Flaschen 9b-12b).

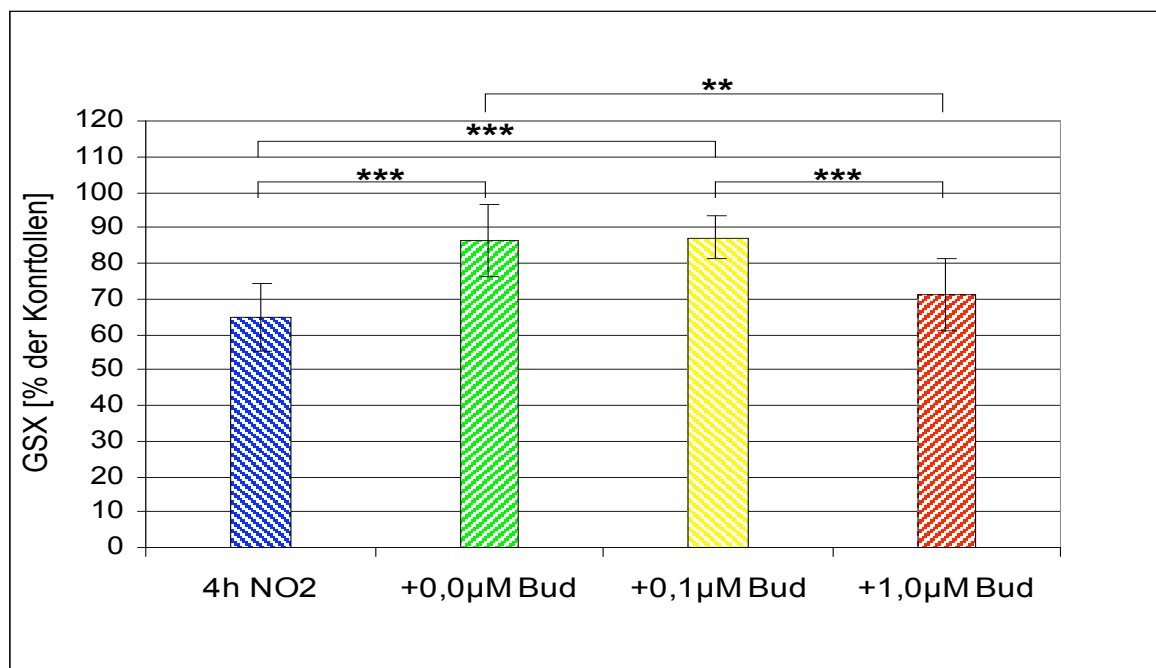


Abb. 3.14b: GSX-Gehalt (in % un behandelter Kontrollen) von A549 Zellen am Ende einer Nachbehandlung mit unterschiedlichen Budesonid-Konzentrationen im Anschluss an eine 4h Exposition mit NO₂ (10ppm). Auf statistische Unterschiede wurde mit dem SNK-Test geprüft. (p < 0,01; *** p < 0,001)**

Ähnlich lagen die Verhältnisse, wenn anstelle von Beclomethason Budesonid eingesetzt wurde (Abb. 3.14a). Wiederum wurden die Daten ohne Rücksicht auf die Flaschenposition im Gasstrom gruppenweise zusammengefasst (Abb. 3.14b). Der Student-Newman-Keuls-Test ergab auch hier, dass nach 4h NO₂-Exposition die GSX-Gehalte signifikant abgesunken waren ($p < 0,001$). Ein Wechsel des Mediums führte innerhalb von weiteren 20h zu einer signifikanten Erholung, so dass die GSX-Werte sich von den entsprechenden Gehalten unbegaster Kulturen nicht mehr signifikant unterschieden. Auch die Gruppe mit 0,1µM Budesonid zeigte nach Ablauf von 24h eine signifikante Verbesserung ihres GSX-Gehaltes ($p < 0,001$), die sich ebenfalls von der Spontanerholung nicht signifikant unterschied. Die Gruppe, die Budesonid in der Konzentration 1,0µM erhalten hatte, konnte sich hingegen nicht erholen, sondern zeigte im Vergleich zur Spontanerholung und zu den Kulturen, die mit 0,1µM Budesonid behandelt worden waren, signifikante GSX-Defizite (beide $p < 0,001$).

Fazit dieser Untersuchungen war, dass beide Glucocorticoide in den hier untersuchten Konzentrationen im Vergleich zur Spontanerholung der Kulturen keine Verbesserung herbeiführen konnten. Im Gegenteil: eine Erhöhung der Steroidkonzentration in Bereiche, in denen aufgrund der oben geschilderten Konzentrations-/Wirkungs-Untersuchungen eine Eigenwirkung zu erwarten war, verhinderte in A549 Zellen eine Erholung des erniedrigten GSX-Gehaltes praktisch vollständig.

4 Diskussion

Die Untersuchung von volatilen toxischen Stoffen an Zellkulturen war schon immer eine Herausforderung - sowohl für den Experimentator als auch für die eingesetzte Apparatur. Die hier verwendete Anlage hatte sich in früheren Untersuchungen zur Wirkung von Narkosegasen bewährt, ihr Einsatz zur Untersuchung von Reizgasen war erst nach zahlreichen Design-Änderungen möglich geworden. Die hier geschilderten Untersuchungen beschäftigen sich zwar vor allem mit der Wirkung von NO₂ in kultivierten Zellen eines humanen Adenokarzinoms der Lunge und ihrer Beeinflussung durch zwei prominente Vertreter der inhalativen Glucocorticoide, aber das Studium der Apparatur mit dem Ziel weiterer technischer Verbesserungen nahm bei jedem durchgeführten Experiment einen wichtigen Platz ein. Bevor die Ergebnisse im Einzelnen diskutiert werden, soll in einer Kurzübersicht die Quintessenz der Versuche dargestellt werden.

4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

In dieser Arbeit sollten durch Experimente folgende Fragen geklärt werden:

- 1) Welche Probleme ergaben sich beim Arbeiten mit NO₂ in der Expositionsapparatur?
- 2) Welche Wirkungen entfaltete das Reizgas NO₂ in Kulturen von A549 Zellen?
- 3) Welche Wirkungen zeigten Beclomethason und Budesonid auf NO₂-exponierte A549 Zellen (im Vergleich zur Spontanerholung)?

In Tabelle 4.1 fasst die Botschaft der einzelnen Versuche zusammen:

Aufgabe	Versuchsbedingungen:	Abbildungen:	Fazit
Prüfung der Apparatur	Zellfrei: 1.) 1ppm NO ₂ : 4h 2.) 10ppm NO ₂ : 2.1) Einlass links: 1h - 2h - 4h - 12h - 24h 2.2) Einlass rechts: 1h - 2h - 4h 3.) 50ppm NO ₂ : 4h	Abb. 3.1 Abb. 3.2 Abb. 3.3 Abb. 3.4 Abb. 3.5 Abb. 3.6	- Konzentrations- und zeitabhängige Zunahme der Nitritmenge; - Tatsächliche NO ₂ -Belastung von nominell eingestellter NO ₂ -Konzentration verschieden und von Flaschenposition auf einer Plattform abhängig; - Tatsächliche NO ₂ -Belastung auf gleichen

Aufgabe	Versuchsbedingungen:	Abbildungen:	Fazit
			Flaschenpositionen unterschiedlicher Plattformen vergleichbar; - Kein Einfluss der Gaseinlassseite; - gute Reproduzierbarkeit
Prüfung der Wirkung von NO ₂	Mit A549 Zellen: 1.) 1ppm NO ₂ : 4h - 24h 2.) 10ppm NO ₂ : 4h - 24h 3.) 50ppm NO ₂ : 4h - 24h	Abb. 3.8 Abb. 3.9 Abb. 3.10	- Zunehmende Zellschädigung bei Steigerung der NO ₂ -Konzentration und Dauer der Exposition EC ₅₀ für NO ₂ : ca. 3,75ppm
Prüfung des Einflusses von Budesonid und Beclomethason im Vergleich zur Spontanerholung	Mit A549 Zellen: 10ppm NO ₂ : 4h + Nachinkubationsphase: 20h 1.) ohne Zusatz 2.) Budesonidzusatz: 0,1μM - 1,0μM 3.) Beclomethasonzusatz: 0,1μM - 1,0μM	Abb. 3.13 Abb. 3.14	- Gute Spontanerholung - Kein positiver Effekt auf die Erholungsphasen bei Steroidzusätzen von 0,1μM - negativer Effekt auf die Erholungsphasen bei Steroidzusätzen von 1,0μM

Abb. 4.1: Synopsis wesentlicher Befunde bei der NO₂-Exposition von A549 Zellen

4.2 Apparatur

Die Erprobung volatiler toxischer Stoffe an Zellkulturen birgt eine Reihe von technischen Schwierigkeiten. Oberstes Gebot war der Personenschutz, der vor allem dann gewährleistet war, wenn es gelang, ein unkontrolliertes Entweichen des Testgases aus der Apparatur zu verhindern. Zur Prüfung der Dichtigkeit des Systems wurde bei den hier geschilderten Experimenten in zahlreichen Vorversuchen mit Hilfe von Gasspürröhrchen der Austritt von NO₂ geprüft. Erst nach dem Ersatz der früher verwendeten Silikon-Dichtringe durch Viton-PEM-Dichtringe konnte der NO₂-Gehalt im Innenraum des Brutschranks unter 0,01ppm gehalten werden

Erstaunlicherweise spielt die Sicherheit des Experimentators in der Literatur eine vernachlässigbare Rolle. Das mag zum einen daran liegen, dass einige publizierte Apparaturen in hermetisch abgeschlossenen Inkubatoren untergebracht waren, z. B. [2]. Zum anderen könnte auch die geringe Sensibilität der Wissenschaftler gegenüber Arbeitsschutz-technischen Belangen eine Rolle gespielt haben, auf die Erörterung diesbezüglicher Probleme zu verzichten. Unsere eigene Apparatur weist gegenüber anderen Systemen ein Reihe konzeptioneller Vorteile auf. So ist die Verwendung handelsüblicher Zellkulturflaschen möglich, die am Flaschenhals luftdicht an die Expositions-kammer angeschlossen werden. Somit war die Gefahr des Gasaustrittes in die Atmosphäre an dieser kritischen Stelle der

Apparatur auf ein Minimum reduziert. Die Unterbringung der Kammer in einem Standardinkubator verringert durch das darin enthaltene Wasserreservoir zusätzlich die Gefahr einer Schädigung des Experimentators durch ausgetretenes NO_2 -Gas (Zersetzung durch Disproportionierung und Entfernung aus der Gasphase!)

Das zweite Augenmerk galt der Reproduzierbarkeit der angestrebten Expositionsbedingungen. Um die Zellen vor einer Austrocknung zu bewahren, war eine Anfeuchtung des Gasstroms sowie ein ständiger Kontakt zum Medium nötig. Die hierzu erforderliche Feuchtigkeit verringerte aber den NO_2 -Gehalt wegen der o.g. Disproportionierungsreaktion. Aus diesem Grund war es notwendig, die tatsächliche Einwirkkonzentration von NO_2 indirekt über das gebildete Nitrit zu erfassen.

Dabei brachte die Anordnung der Flaschen innerhalb einer Plattform in Serie den Nachteil, dass die tatsächlich herrschenden Gaskonzentrationen durch die Extraktion ins Medium von Flasche zu Flasche abnahmen und somit auch die Reaktionen der Zellkulturen unterschiedlich stark waren. So ergab eine bestimmte Voreinstellung der Gaskonzentration auf einer Plattform eine Serie an 4 unterschiedlich tatsächlich herrschenden Gaskonzentrationen. Andererseits bot diese Eigenart bei der Erstellung der Konzentrations-/Wirkungs-Beziehung den Vorteil, dass immer gleichzeitig mehrere Konzentrationen erfasst wurden. Dass selbst in der ersten Flasche die tatsächlich herrschende Konzentration nicht der nominell eingestellten entsprach, lag an den beiden vorgeschalteten Waschflaschen, die für die Gasanfeuchtung im Inkubator sorgten. Da der Austrag des Gases in diese Flaschen nicht verhindert werden konnte, entsprach die in der ersten Flasche herrschende Gaskonzentration rund 60% der nominellen Konzentration. Die Möglichkeit, einzelne Flaschen oder gar eine ganze Plattform zu jedem Zeitpunkt der Exposition dem Gasstrom zu entziehen, erlaubte die Abwicklung auch komplexer Expositionsprofile bei gleichzeitiger guter Reproduzierbarkeit. Erwähnt sei auch, dass die Zellen auf allen drei Plattformen gleichmäßig exponiert waren. So hatte man bei einem Versuch immer die Möglichkeit, die Ergebnisse der einen Plattform mit denen der anderen Plattform zu vergleichen. Eine Umkehr der Strömungsrichtung in der Kammer lieferte dabei ähnliche Ergebnisse, die aufgrund der Symmetrie der Anordnung auch zu erwarten waren.

Der in den älteren Publikationen oft zitierte [2], intensive Zell-Gas-Kontakt wird in unserer Apparatur durch eine Kippschaukel ermöglicht. Diese Kippschaukel stellte eine einfache praktikable Lösung dar, gleichzeitig wird für eine intensive Durchmischung der Flüssigkeitsschicht gesorgt. Ein wichtiger Nachteil muss allerdings im Zusammenhang mit der Kippvorrichtung erwähnt werden. Die elektrischen Bauteile der Kippschaukel entpuppten sich in der

feuchten Atmosphäre des Inkubators als recht korrosionsanfällig. So musste der elektrische Umschalter von Zeit zu Zeit erneuert werden. Hier wäre eine alternative Lösung mit einem abgeschlossenen Schalterbauteil wünschenswert.

4.3 NO₂-Exposition

Bei NO₂ handelt es sich um eine äußerst reaktive, stark oxidierende Substanz, die beim Kontakt mit Feuchtigkeit oder Wasser rasch in Mineralsäuren disproportioniert. Zwar wurde zu Beginn eines Versuches jedes Mal auf Dichtigkeit des Systems überprüft, aber gerade bei niedrigen Konzentrationen im ppm-Bereich musste trotz einer fest eingestellten nominellen NO₂-Konzentration (äußere Exposition) die in den jeweiligen Zellkulturflaschen herrschende Testgaskonzentration (innere Exposition) überprüft werden. Zahlreiche Konnektoren erhöhten die Wahrscheinlichkeit von Verlusten. Außerdem trugen andere Faktoren (z.B. unterschiedliche Flüssigkeitsvolumina in den Flaschen) zu minimalen Unterschieden von Tag zu Tag bei. Die tatsächlich entstandenen Nitrit-/Nitratmengen waren daher von Versuch zu Versuch neu zu bestimmen.

Ein weiterer interessanter Aspekt ergab sich im Rahmen der gemessenen Nitritwerte. Betrachtet man die gemessenen Nitritwerte der Versuche mit A549 Zellen genauer, so fällt auf, dass diese kontinuierlich wesentlich größer waren, als bei den Versuchen, die ohne Zellen abliefen. Diese Beobachtung wurde nicht weiter verfolgt, sollte aber in zukünftigen Untersuchungen berücksichtigt werden.

Ein guter Kompromiss zwischen Erhaltung der Zellvitalität auf der einen Seite und Abnahme des GSX-Gehalts auf der anderen Seite ergab sich in Vorversuchen bei einer nominellen NO₂-Konzentration von 10ppm und einem Begasungszeitraum von 4 Stunden. Der GSX-Gehalt der Zellen als Parameter für die Vitalität der Zellen ist schon von anderen Autoren, die die oxidierende Wirkung von NO₂ untersuchten, benutzt worden [31]. Tatsächlich zeigten die A549-Zellen nach einer 4-stündigen Begasung bei 10ppm eine reversible Abnahme ihres GSX-Gehaltes, wie es für die Erprobung therapeutischer Ansätze wichtig war. Eine Begasung bei 50ppm über 4 Stunden ließ hingegen keine Erholungsmöglichkeit mehr zu, während die Wirkung auf das Glutathion bei 1ppm NO₂ vernachlässigbar war. Wurde die Expositionszeit auf 24 Stunden ausgedehnt, trugen die Zellkulturen, die mit 10ppm oder 50ppm begast wurden, massive Zellschädigungen davon. Diese Eindrücke wurden durch die morphologische Betrachtung der exponierten Zellen bestätigt: allein bei der Einwirkung von 50ppm NO₂ zeigten sich ausgedehnte Schäden, erkennbar an der massiven Ablösung der

adhärenten Zellen von der Unterlage. Interessanterweise übertrafen bei 1ppm die GSX-Gehalte der Zellen, die über 24 Stunden begast wurden, die Kontrollwerte, so dass die Vermutung nahe liegt, dass eine Begasung mit 1ppm NO₂ die GSX-Produktion stimulierte im Vergleich zu Zellen, die nicht begast wurden. Die mögliche Ursache könnte in der O₂-Begasung (aus dem Trägergas) liegen, die den nicht begasten Zellen gefehlt hatte. Dieser Aspekt sollte in weiteren Versuchen überprüft werden.

Die Konzentrations-/Wirkungs-Kurve für die Wirkung von NO₂ in A549-Zellen zeichnete sich durch einen steilen Verlauf aus. Bis zu einer gewissen NO₂-Konzentration konnten die Zellen der Belastung also gut standhalten, ehe es bei einer weiteren Erhöhung der NO₂-Konzentration zu einem rapiden Zelluntergang kam. Die halbmaximale Wirkung von NO₂ (EC₅₀) auf den GSX-Gehalt wurde in unserem System bei einer Nitritbildung von rund 2000nmol in 2mL und über 4h festgestellt, entsprechend einer NO₂-Konzentration in der Gasphase von rund 3,75ppm. Bemerkenswerterweise haben andere Untersucher sich nicht der Mühe unterzogen, in ihren Systemen einen EC₅₀-Wert zu bestimmen.

4.4 Spontanerholung

A549 Zellen, die NO₂-Konzentrationen knapp oberhalb der EC₅₀ über 4h ausgesetzt waren, zeigten unter Standardkulturbedingungen eine nahezu vollständige Reversibilität ihrer Schäden. Die Glutathionspiegel erholten sich innerhalb von 20h nach einer 4h NO₂-Exposition praktisch vollständig, wenn am Ende der NO₂-Begasung das Kulturmedium gewechselt wurde, und auch die Subkultivierbarkeit erholter Zellen war völlig unauffällig. Der Zusatz von Serum war in der Erholungsphase nicht erforderlich, die Reparatur des Schadens konnte von den Zellen offenbar aus eigener Kraft geleistet werden. Dieser Punkt war dann auch der Ausgangspunkt für therapeutische Versuche mit zwei bekannten Glucocorticoiden, die häufig bei Lungenschäden und -erkrankungen verwendet werden.

4.5 Wirkungen von Beclomethason und Budesonid

Bevor die beiden Glucocorticoide Beclomethason und Budesonid zum Einsatz kamen, war in Vorversuchen ermittelt worden, bis zu welcher Endkonzentration im Medium keine Beeinträchtigung der Zellvitalität, insbesondere des Parameters "GSX-Gehalt", zu beobachten war. Die entsprechenden Konzentrations-/Wirkungs-Beziehungen ergaben für beide Corticoide, dass bis zu einer Konzentration von 100nM keine Wirkung auf den "GSX-Gehalt" auftrat (siehe 3.2.4). Zur besseren Beurteilung wurden die Erholungsversuche jedoch auch mit 1μM

durchgeführt. Diese Konzentration markierte in beiden Konzentrations-/Wirkungs-Beziehungen in etwa den kritischen Punkt, von dem ab die Zellvitalität abzusinken begann.

In beiden Versuchsreihen zur Erholung erwies sich ein Steroid-Zusatz von $0,1\mu\text{M}$ zum Medium als unwirksam. Weder Beclomethason noch Budesonid waren in dieser Konzentration in der Lage, die Situation der A549-Zellen im Vergleich zur Spontanerholung zu verbessern. Der GSX-Gehalt unterschied sich nicht signifikant. Wurde die Konzentration der Steroide in der Nachinkubationsphase auf $1,0\mu\text{M}$ erhöht, sankt der GSX-Gehalt auf ein Maß, das in beiden Fällen signifikant schlechter war als das der Spontanerholung.

Die in unseren Versuchsreihen gewonnene Erkenntnis passt zu dem in den letzten Jahren verstärkt aufgekommenen Zweifel am Nutzen einer Corticoidgabe nach einer Reizgasvergiftung. Über das Für und Wider dieser Therapie finden sich zahlreiche Artikel und Diskussionen in einschlägiger Literatur, z.B. [32]. Die Frage, ob bei dieser Therapie nicht die Nebenwirkungen überwiegen, gewinnt insbesondere dort an Brisanz, wo die Verabreichung bisher "routinemäßig" erfolgte [14]. Hier müssen (retrospektive) klinische Studien die bisherigen Kasuistiken ergänzen [14]. Solche Studien werden aber, obwohl immer wieder gefordert, auch in absehbarer Zeit nicht verfügbar sein [32].

4.6 Ausblick

Die hier geschilderten Untersuchungen zeigen, dass das in-vitro-Studium toxischer Effekte und möglicher therapeutischer Interventionen immer noch an zahlreichen methodischen Unzulänglichkeiten scheitert. Die komplexe Zytoarchitektur des Respirationstrakts kann in einer simplen Zellkultur nur rudimentär nachgestellt werden. Dennoch können solche Versuche einen Anhaltspunkt liefern, welche Konzentrationsbereiche für eine Schädigung und möglicherweise auch für eine Reparatur solcher Schäden interessant sind. Neben der einfachen Zytotoxizität sind dabei natürlich auch andere Formen einer toxischen Schädigung von Interesse, z.B. Genotoxizität oder Immuntoxizität. Ob dies mit der hier vorgestellten Apparatur zu bewerkstelligen ist, kann derzeit nicht abschließend beurteilt werden.

5 Zusammenfassung

In der toxikologischen Literatur finden sich zahlreiche Beschreibungen über die Vergiftung mit NO₂-Gas. Bei der Inhalation von NO₂-haltigen Dämpfen treten nach entsprechender Exposition schwere, irreversible Lungenschäden auf, die oft durch akutes Lungenversagen (ARDS) zum Tod führen. Die pathophysiologischen Mechanismen einer toxischen Wirkung von NO₂ sind im Detail weitgehend ungeklärt, kausale therapeutische Konzepte existieren trotz intensiver Forschung bis heute nicht. Die Behandlung der Vergifteten erfolgt daher rein symptomatisch. Der Einsatz von stark wirksamen Glucocorticoiden in hochdosierter Form gehörte bisher zum Standardregime der Behandlung, obwohl gerade für die NO₂-Vergiftung keine überzeugenden Studien zum therapeutischen Nutzen existieren. Seit 1995 steht daher die routinemäßige inhalative Gabe von Glucocorticoiden in der Postexpositionsphase zur Debatte.

Auch tierexperimentelle Untersuchungen haben Zweifel an der "routinemäßigen" Indikation der Glucocorticoide geweckt, da ein Nutzen nur bei gut erhaltenen histiotypischen Leitstrukturen gezeigt werden konnte, während nach einer schweren Schädigung der Lungenarchitektur eine "restitutio ad integrum" in Anwesenheit der Steroide eher behindert wurde. Leider sind auch die verfügbaren In-vitro-Systeme, die eine gezielte Schädigung kultivierter Zellen durch volatile toxische Stoffe zulassen, nicht ausgereift; ganz besonders ist hier die fehlende Komplexität im Vergleich zur In-vivo-Situation kritisiert worden.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine speziell für die Untersuchung volatiler Stoffe entwickelte Apparatur auf eine Begasung von kultivierten Lungenzellen mit dem (Gift)Gas NO₂ untersucht.

Die Apparatur erlaubte eine gleichzeitige Exposition von 12 kommerziellen Standardkulturflaschen. Die 12 Flaschen sind auf 3 Plattformen verteilt, so dass jeweils 4 Flaschen auf einer Plattform in Serie geschaltet sind. Eine Schaukelvorrichtung schwenkt die gesamte Apparatur periodisch aus der Ruhelage, sorgt für eine fortwährende Umwälzung des Kulturmediums und erlaubt durch das periodische Auftauchen der Zellschicht aus dem Medium einen intensiven Zell-Gas-Kontakt, während gleichzeitig die Gefahr einer Austrocknung der Zellen auf ein Minimum reduziert wird. Die Unterbringung der Apparatur in einem thermostatisierten Brutschrank verbessert gleichzeitig den Personenschutz.

Nachdem die an der Gasmischbatterie eingestellte NO_2 -Konzentration nur wenig über die tatsächlich auf den Zellrasen einer jeden Kulturflasche einwirkende Gaskonzentration aussagte, wurde versucht, die sog. innere Exposition der Zellen aus der gebildeten Nitritmenge abzuschätzen, die beim Kontakt von NO_2 mit Wasser entsteht. Auf einer Plattform nahmen die gebildeten Nitritmengen von einer Flasche zur nächsten ab. Die Extraktionsverhältnisse der an gleicher Position liegenden Expositionsflaschen stimmten infolge der parallelen Anordnung der drei Plattformen jedoch gut überein.

Nachdem die Expositionsverhältnisse geklärt waren, wurden A549-Zellen (eine humane Zelllinie pulmonalen Ursprungs) auf die schädigende Wirkung von NO_2 -Gas getestet. Dabei wurden NO_2 -Konzentration und Expositionsdauer variiert. Als Parameter der toxischen Wirkung des NO_2 -Gases in den Zellen diente die Abnahme des zellulären Glutathion (GSX)-Gehaltes (als Summe des reduzierten und oxidierten Glutathions).

Da die NO_2 -Konzentrationen innerhalb einer Plattform der Apparatur von Flasche zu Flasche abnahmen, reichten Versuche bei einer nominellen Voreinstellung von 1ppm, 10ppm und 50ppm aus, eine Konzentrations-/Wirkungs-Beziehung zwischen NO_2 -Konzentration und Abnahme des GSX-Gehaltes aufzustellen. Eine Exposition über 4h lieferte einen EC_{50} -Wert, der einer inneren Exposition entsprach, wie sie bei einer Nitritbildung von 2010nmol/Flasche und einer Expositionszeit von 4h auftrat. Bezogen auf die NO_2 -Konzentration im Gasstrom und vollständiger Absorption wären dies 3,75ppm NO_2 bei einer Einwirkzeit von 4h ($\text{ECt} = 15\text{ppm}\cdot\text{h}$). Länger dauernde Expositionen bei 10ppm oder bei höheren Konzentrationen waren mit einem starken, letztendlich irreversiblen Vitalitätsverlust verbunden. Interessanterweise nahm der GSX-Gehalt der Zellen bei einer Begasung über 24h bei 1ppm leicht zu.

Schließlich sollte die Glucocorticoide Budesonid und Beclomethason auf eine (therapeutische) Wirksamkeit bei NO_2 -exponierten A549 Zellen geprüft werden.

Einer 4-stündigen Begasung der Zellen mit 10ppm folgte dazu eine 20-stündige Nachinkubationsphase im Brutschrank. Dabei bekamen die Zellen frisches Medium mit und ohne Zusatz der Corticosteroide verabreicht. Die gleichzeitige Untersuchung exponierter A549 Zellen ohne Steroidgabe diente nicht nur als Kontrollgruppe, sondern erlaubte auch die Beurteilung einer Spontanheilung der Zellen. Die Gabe der Steroide erfolgte in den Konzentrationen 0,1 und $1,0\mu\text{M}$. Höhere Konzentrationen hatten sich in Vorversuchen als schädlich erwiesen.

Die Nachinkubationsphase ohne Steroidzusatz zeigte, dass die Zellen tatsächlich in der Lage waren, sich in gewissem Ausmaß spontan von der erlittenen Schädigung zu erholen. Wurde den Zellen nach der Exposition Budesonid oder Beclomethason in einer Konzentration von $0,1\mu\text{M}$ verabreicht, zeigten die Zellen eine vergleichbare Erholung ihrer GSX-Gehalte wie die

unbehandelten Kontrollzellen, die sich spontan von der NO₂-Schädigung erholt hatten. Eine Zugabe von 1,0 μM an Budesonid oder Beclomethason führte hingegen zu einer deutlichen Verringerung der Zellvitalität.

Fazit der durchgeführten Untersuchungen war, dass kein positiver Einfluss der beiden Steroide auf die Erholung von einer toxischen NO₂-Exposition nachweisbar war. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit anderen Befunden aus Literaturberichten, in denen ebenfalls kein Nutzen einer Gabe von Glucocorticoiden bei Reizgasvergiftung gezeigt werden konnte.

6 Anhang

Tabelle 6.1: Anhang zu Abb. 3.1
NO₂-Extraktion zellfrei / 4h / 1ppm, 10ppm, 50ppm

Nom. NO ₂ -Konz.:	Position:	Flaschen Nr:	Nitrit [nmol/Fl]:	MW Nitrit [nmol/Fl]±SD:		
1ppm	Position 1	20030917.041-11	163,68	166,08±4,65		
		20030917.041-31	161,54			
		20030918.042-11	172,22			
		20030918.042-31	166,88			
	Position 2	20030917.041-12	124,16	130,21±5,27		
		20030918.042-12	133,77			
		20030918.042-32	132,71			
	Position 3	20030917.041-13	114,55	111,34±6,64		
		20030917.041-33	101,73			
		20030918.042-13	112,41			
		20030918.042-33	116,68			
	Position 4	20030917.041-14	88,92	96,93±5,82		
		20030917.041-34	97,46			
		20030918.042-14	102,80			
		20030918.042-34	98,53			
	10ppm	Position 1	20030312.002-31	699,23	778,66±63,23	
20030313.003-34			647,46			
20030317.004-34			766,25			
20031013.047-11			810,50			
20031013.047-31			791,06			
20040219.066-11			860,06			
20040219.067-11			729,24			
20040224.068-11			809,92			
20040224.068-31			796,84			
20040225.069-11			824,09			
20040225.069-31			830,63			
Position 2			20030312.002-32	627,17		633,29±26,01
			20030313.003-33	608,90		
			20030317.004-33	676,53		
		20031013.047-12	643,09			
		20031013.047-32	638,77			
		20040219.066-12	660,09			
		20040219.067-12	605,61			
		20040224.068-12	598,45			
		20040224.068-32	644,23			
		20040225.069-12	606,08			
		20040225.069-32	657,31			
		Position 3	20030312.002-33	556,12	548,14±20,86	
20030313.003-32			531,76			
20030317.004-32			584,84			
20031013.047-13			537,24			
20031013.047-33			561,00			

Nom. NO ₂ -Konz.:	Position:	Flaschen Nr:	Nitrit [nmol/Fl]:	MW Nitrit [nmol/Fl]±SD:			
		20040219.066-13	576,24				
		20040219.067-13	518,52				
		20040224.068-13	526,51				
		20040224.068-33	545,04				
		20040225.069-13	535,23				
		20040225.069-33	557,03				
	Position 4	20030312.002-34	410,98	473,55±30,67			
		20030313.003-31	459,70				
		20030317.004-31	518,78				
		20031013.047-14	470,28				
		20031013.047-34	478,92				
		20040219.066-14	511,73				
		20040219.067-14	437,89				
		20040224.068-14	478,55				
		20040224.068-34	489,45				
		20040225.069-14	466,56				
		20040225.069-34	486,18				
		50ppm	Position 1		20030711.056-11	2248,84	2214,54±68,77
					20030711.056-31	2325,94	
20031014.048-11	2192,96						
20031014.048-31	2227,53						
20031015.049-11	2149,76						
20031015.049-31	2142,20						
Position 2	20030711.056-12		1658,08	1676,99±26,43			
	20030711.056-32		1674,37				
	20031014.048-12		1683,18				
	20031014.048-32		1726,38				
	20031015.049-12		1654,02				
	20031015.049-32		1665,90				
Position 3	20030711.056-13		1502,79	1381,97±16,78			
	20030711.056-33		1514,73				
	20031014.048-13		1489,85				
	20031014.048-33		1516,85				
	20031015.049-13		1485,53				
	20031015.049-33		1508,21				
Position 4	20030711.056-13		1398,54	1381,97±16,78			
	20030711.056-33		1360,53				
	20031014.048-13		1390,48				
	20031014.048-33		1398,05				
	20031015.049-13		1380,76				
	20031015.049-33		1363,48				

Tabelle 6.2: Anhang zu Abb. 3.2
Tatsächliche NO₂-Belastung zellfrei / 4h / 10ppm, 50ppm

Nom. NO₂-Konz.:	Position:	Flaschen Nr:	tats. NO₂-Konz. [ppm]:	MW tats. NO₂-Konz [ppm]±SD:
10ppm	Wafla gross	Waschflaschen a	10,00	10,00±0,00
	Wafla klein	Waschflaschen b	8,00	8,00±0,00
	Position 1	20030312.002-31	6,40	6,40±0,00
		20030313.003-34	6,40	
		20030317.004-34	6,40	
		20031013.047-11	6,40	
		20031013.047-31	6,40	
		20040219.066-11	6,40	
		20040219.067-11	6,40	
		20040224.068-11	6,40	
		20040224.068-31	6,40	
		20040225.069-11	6,40	
	20040225.069-31	6,40		
	Position 2	20030312.002-32	5,09	4,94±0,12
		20030313.003-33	5,19	
		20030317.004-33	4,96	
		20031013.047-12	4,88	
		20031013.047-32	4,92	
		20040219.066-12	4,79	
		20040219.067-12	5,03	
		20040224.068-12	4,88	
		20040224.068-32	4,91	
		20040225.069-12	4,86	
	20040225.069-32	4,84		
	Position 3	20030312.002-33	3,92	3,76±0,14
		20030313.003-32	4,05	
		20030317.004-32	3,70	
		20031013.047-13	3,68	
		20031013.047-33	3,73	
		20040219.066-13	3,56	
		20040219.067-13	3,90	
		20040224.068-13	3,77	
		20040224.068-33	3,71	
20040225.069-13		3,73		
20040225.069-33	3,62			
Position 4	20030312.002-34	2,88	2,74±0,17	
	20030313.003-31	3,06		
	20030317.004-31	2,61		
	20031013.047-14	2,68		
	20031013.047-34	2,68		
	20040219.066-14	2,48		
	20040219.067-14	2,94		
	20040224.068-14	2,78		
	20040224.068-34	2,69		
	20040225.069-14	2,73		
20040225.069-34	2,58			
50ppm	Wafla gross	Waschflaschen a	50,00	50,00±0,00

Nom. NO ₂ -Konz.:	Position:	Flaschen Nr:	tats. NO ₂ -Konz. [ppm]:	MW tats. NO ₂ -Konz [ppm]±SD:
	Wafla klein	Waschflaschen b	36,92	36,92±0,00
	Position 1	20030711.056-11	29,93	29,93±0,00
		20030711.056-31	29,93	
		20031014.048-11	29,93	
		20031014.048-31	29,93	
		20031015.049-11	29,93	
		20031015.049-31	29,93	
	Position 2	20030711.056-12	25,73	25,79±0,00
		20030711.056-32	25,58	
		20031014.048-12	25,83	
		20031014.048-32	25,77	
		20031015.049-12	25,91	
		20031015.049-32	25,93	
	Position 3	20030711.056-13	22,63	22,66±0,15
		20030711.056-33	22,46	
		20031014.048-13	22,69	
		20031014.048-33	22,54	
		20031015.049-13	22,83	
		20031015.049-33	22,82	
	Position 4	20030711.056-14	19,83	19,86±0,00
		20030711.056-34	19,63	
		20031014.048-14	19,91	
		20031014.048-34	19,71	
		20031015.049-14	20,05	
		20031015.049-34	20,00	

Tabelle 6.3: Anhang zu Abb. 3.5
NO₂-Extraktion zellfrei / 1h, 2h, 4h, 12h, 24h / 10ppm

Dauer:	Position:	Flaschen Nr:	Nitrit [nmol/Fl]:	MW Nitrit [nmol/Fl]±SD:	
1h	Position 1	20030312.002-11	225,25	195,44±26,12	
		20030313.003-14	176,53		
		20030317.004-14	184,55		
	Position 2	20030312.002-12	162,33		140,07±21,83
		20030313.003-13	118,68		
		20030317.004-13	139,19		
	Position 3	20030312.002-13	150,15		127,07±20,37
		20030313.003-12	111,58		
		20030317.004-12	119,48		
	Position 4	20030312.002-14	96,36		97,75±9,28
		20030313.003-11	89,25		
		20030317.004-11	107,64		
2h	Position 1	20030312.002-21	427,22	388,53±33,66	
		20030313.003-24	372,42		
		20030317.004-24	365,96		

Dauer:	Position:	Flaschen Nr:	Nitrit [nmol/Fl]:	MW Nitrit [nmol/Fl]±SD:	
	Position 2	20030312.002-22	310,51	316,91±5,74	
		20030313.003-23	318,63		
		20030317.004-23	321,59		
	Position 3	20030312.002-23	272,95	282,72±8,58	
		20030313.003-22	286,15		
		20030317.004-22	289,06		
	Position 4	20030312.002-24	253,67	237,98±13,76	
		20030313.003-21	232,36		
		20030317.004-21	227,93		
	4h	Position 1	20030312.002-31	699,23	778,66±63,23
			20030313.003-34	647,46	
			20030317.004-34	766,25	
20031013.047-11			810,50		
20031013.047-31			791,06		
20040219.066-11			860,06		
20040219.067-11			729,24		
20040224.068-11			809,92		
20040224.068-31			796,84		
20040225.069-11			824,09		
20040225.069-31			830,63		
Position 2			20030312.002-32	627,17	
		20030313.003-33	608,90		
		20030317.004-33	676,53		
		20031013.047-12	643,09		
		20031013.047-32	638,77		
		20040219.066-12	660,09		
		20040219.067-12	605,61		
		20040224.068-12	598,45		
		20040224.068-32	644,23		
		20040225.069-12	606,08		
		20040225.069-32	657,31		
		Position 3	20030312.002-33	556,12	548,14±20,86
20030313.003-32			531,76		
20030317.004-32			584,84		
20031013.047-13			537,24		
20031013.047-33			561,00		
20040219.066-13			576,24		
20040219.067-13			518,52		
20040224.068-13			526,51		
20040224.068-33	545,04				
20040225.069-13	535,23				
20040225.069-33	557,03				

Dauer:	Position:	Flaschen Nr:	Nitrit [nmol/Fl]:	MW Nitrit [nmol/Fl]±SD:
	Position 4	20030312.002-34 20030313.003-31 20030317.004-31 20031013.047-14 20031013.047-34 20040219.066-14 20040219.067-14 20040224.068-14 20040224.068-34 20040225.069-14 20040225.069-34	410,98 459,70 518,78 470,28 478,92 511,73 437,89 478,55 489,45 466,56 486,18	473,55±30,67
12h	Position 1	20040219.066-21 20040219.067-21	2324,32 2078,47	2201,39±173,84
12h	Position 2	20040219.066-22 20040219.067-22	1869,56 1676,39	1772,97±136,59
12h	Position 3	20040219.066-23 20040219.067-23	1706,15 1512,97	1609,56±136,59
12h	Position 4	20040219.066-24 20040219.067-24	1599,71 1350,64	1475,17±176,12
24h	Position 1	20040219.066-31 20040219.067-31	4455,13 4117,89	4286,51±238,46
24h	Position 2	20040219.066-32 20040219.067-32	2898,41 2778,34	2838,38±84,90
24h	Position 3	20040219.066-33 20040219.067-33	2693,07 2633,21	2663,14±42,33
24h	Position 4	20040219.066-34 20040219.067-34	2521,06 2460,12	2490±43,09

Tabelle 6.4: Anhang zu Abb. 3.6
NO₂-Extraktion zellfrei / 1h, 2h, 4h / 10ppm Einlass links / rechts

Einlass:	Dauer:	Position	Flaschen Nr:	Nitrit [nmol/Fl]:	MW Nitrit [nmol/Fl]±SD:	
links	1h	Position 1	20030311.001-11	97,81	161,53±90,12	
			20030312.002-11	225,25		
		Position 2	20030311.001-12	64,32		113,33±69,30
			20030312.002-12	162,33		
		Position 3	20030311.001-13	37,94		94,04±79,34
			20030312.002-13	150,15		
		Position 4	20030311.001-14	20,69		58,52±53,50
			20030312.002-14	96,36		
	4h	Position 1	20030311.001-31	506,72	765,83±102,70	
			20030312.002-31	699,23		
20031013.047-11			810,50			
20031013.047-31			791,06			
20040219.066-11			860,06			
20040219.067-11			729,24			

Einlass:	Dauer:	Position	Flaschen Nr:	Nitrit [nmol/Fl]:	MW Nitrit [nmol/Fl]±SD:
			20040224.068-11 20040224.068-31 20040225.069-11 20040225.069-31	809,92 796,84 824,09 830,63	
		Position 2	20030311.001-32 20030312.002-32 20031013.047-12 20031013.047-32 20040219.066-12 20040219.067-12 20040224.068-12 20040224.068-32 20040225.069-12 20040225.069-32	364,67 627,17 643,09 638,77 660,09 605,61 598,45 644,23 606,08 657,31	604,55±87,05
		Position 3	20030311.001-33 20030312.002-33 20031013.047-13 20031013.047-33 20040219.066-13 20040219.067-13 20040224.068-13 20040224.068-33 20040225.069-13 20040225.069-33	267,26 556,12 537,24 561,00 576,24 518,52 526,51 545,04 535,23 557,03	518,02±89,79
		Position 4	20030311.001-34 20030312.002-34 20031013.047-14 20031013.047-34 20040219.066-14 20040219.067-14 20040224.068-14 20040224.068-34 20040225.069-14 20040225.069-34	136,37 410,98 470,28 478,92 511,73 437,89 478,55 489,45 466,56 486,18	436,69±109,18
rechts	1h	Position 1	20030313.003-14 20030317.004-14	176,53 184,55	180,54±5,57
		Position 2	20030313.003-13 20030317.004-13	118,68 139,19	128,94±14,50
		Position 3	20030313.003-12 20030317.004-12	111,58 119,48	115,53±5,58
		Position 4	20030313.003-11 20030317.004-11	89,25 107,64	53,50±13,01
	4h	Position 1	20030313.003-34 20030317.004-34	647,46 766,25	706,86±83,99
		Position 2	20030313.003-33 20030317.004-33	608,90 676,53	642,71±47,82
		Position 3	20030313.003-32 20030317.004-32	531,76 584,84	558,30±37,53

Einlass:	Dauer:	Position	Flaschen Nr:	Nitrit [nmol/Fl]:	MW Nitrit [nmol/Fl]±SD:
		Position 4	20030313.003-31	459,70	489,24±4,78
			20030317.004-31	518,78	

Tabelle 6.5: Anhang zu Abb. 3.7
Einfluss der Verweilzeit des Mediums aus den GSX-Gehalt der Zellen

Verweilzeit:	Flaschen Nr:	GSX [nmol/mg]:	MW GSX [nmol/mg]:
4h	20031030.053-04	35,50	36,88±2,33
	20031030.053-04	37,89	
	20031105.054-04	39,66	
	20031105.054-04	34,49	
12h	20031030.053-12	35,42	34,27±1,35
	20031030.053-12	35,27	
	20031105.054-12	32,57	
	20031105.054-12	33,81	
16h	20031030.053-16	32,73	31,84±1,30
	20031030.053-16	32,96	
	20031105.054-16	31,54	
	20031105.054-16	30,13	
20h	20031030.053-20	29,83	26,63±3,45
	20031030.053-20	29,35	
	20031105.054-20	24,17	
	20031105.054-20	23,16	
24h	20031030.053-24	20,63	19,64±2,25
	20031030.053-24	22,18	
	20031105.054-24	17,01	
	20031105.054-24	18,72	

Tabelle 6.6: Anhang zu Abb. 3.8
Einfluss von NO₂ auf den GSX-Gehalt / 4h / 0ppm, 1ppm, 10ppm, 50ppm

Nom. NO ₂ -Konz.:	Position:	Flaschen Nr:	GSX [nmol/mg]:	MW GSX [nmol/mg]±SD:
0ppm	Position 1	20030423.020-21	65,11	51,90±12,17
		20030429.021-21	45,60	
		20030326.010-21	35,50	
		20030516.025-21	66,03	
		20030403.014-21	38,94	
		20030416.018-21	57,36	
		20030520.026-21	54,77	
		20030423.020-22	57,73	
	Position 2	20030429.021-22	44,11	48,52±8,19
		20030326.010-22	37,89	
		20030516.025-22	46,61	
		20030403.014-22	42,18	
		20030416.018-22	60,14	

Nom. NO₂-Konz.:	Position:	Flaschen Nr:	GSX [nmol/mg]:	MW GSX [nmol/mg]±SD:
		20030520.026-22	51,00	
	Position 3	20030423.020-23 20030429.021-23 20030326.010-23 20030516.025-23 20030403.014-23 20030416.018-23 20030520.026-23	62,88 42,93 39,66 48,17 45,43 60,49 53,08	50,38±8,81
	Position 4	20030423.020-24 20030429.021-24 20030326.010-24 20030516.025-24 20030403.014-24 20030416.018-24 20030520.026-24	53,54 47,58 34,49 50,25 47,65 60,49 58,97	50,42±8,70
1ppm	Position 1	20030423.020-11 20030423.020-31 20030429.021-11 20030429.021-31	49,06 76,33 47,37 44,30	54,27±14,84
	Position 2	20030917.041-12 20030917.041-32 20030918.042-12 20030918.042-32	64,70 54,05 45,09 46,80	52,66±8,92
	Position 3	20030917.041-13 20030917.041-33 20030918.042-13 20030918.042-33	56,20 64,40 46,83 40,30	51,93±10,57
	Position 4	20030917.041-14 20030917.041-34 20030918.042-14 20030918.042-34	54,74 58,25 45,28 42,84	50,28±7,39
10ppm	Position 1	20030326.010-11 20030326.010-31 20030516.025-11 20030516.025-31	18,79 24,20 34,68 23,04	27,47±7,21
	Position 2	20030326.010-12 20030326.010-32 20030516.025-12 20030516.025-32	26,38 23,55 36,63 30,73	29,32±5,70
	Position 3	20030326.010-13 20030326.010-33 20030516.025-13 20030516.025-33	26,17 24,49 35,20 29,87	28,93±4,74

Nom. NO₂-Konz.:	Position:	Flaschen Nr:	GSX [nmol/mg]:	MW GSX [nmol/mg]±SD:
	Position 4	20030326.010-14 20030326.010-34 20030516.025-14 20030516.025-34	29,47 26,82 34,05 30,13	30,12±2,99
50ppm	Position 1	20030403.014-11	1,68	10,50±7,17
		20030403.014-31	2,72	
		20030416.018-11	9,91	
		20030416.018-31	12,70	
		20030520.026-11	17,10	
		20030520.026-31	18,87	
	Position 2	20030403.014-12	2,93	12,95±10,26
		20030403.014-32	2,57	
		20030416.018-12	11,90	
		20030416.018-32	9,94	
		20030520.026-12	27,23	
		20030520.026-32	23,16	
	Position 3	20030403.014-13	2,51	17,63±13,08
		20030403.014-33	2,53	
		20030416.018-13	15,83	
		20030416.018-33	32,47	
		20030520.026-13	29,95	
		20030520.026-33	22,49	
	Position 4	20030403.014-14	4,40	22,27±14,11
		20030403.014-34	4,60	
20030416.018-14		34,66		
20030416.018-34		34,55		
20030520.026-14		27,09		
20030520.026-34		28,29		

Tabelle 6.7: Anhang zu Abb. 3.9
Einfluss von NO₂ auf den GSX-Gehalt / 24h / 0ppm, 1ppm, 10ppm, 50ppm

Nom. NO₂-Konz.:	Position:	Flaschen Nr:	GSX [nmol/mg]:	MW GSX [nmol/mg]±SD:
0ppm	Position 1	20030507.023-21	44,32	39,19±4,44
		20030327.011-21	36,71	
		20030331.012-21	36,54	
	Position 2	20030507.023-22	45,33	40,52±4,39
		20030327.011-22	35,87	
		20030331.012-22	37,88	
		20030402.013-22	42,99	
	Position 3	20030327.011-23	45,37	39,87±4,30
		20030331.012-23	36,83	
		20030402.013-23	37,40	
		20030408.015-23	43,50	
	Position 4	20030327.011-24	44,48	39,50±4,17
		20030331.012-24	37,21	
		20030402.013-24	36,80	
		20030408.015-24	43,93	
	1ppm	Position 1	20030507.023-11	45,75
20030507.023-31			38,24	
Position 2		20030507.023-12	49,48	43,06±9,08
		20030507.023-32	36,64	
Position 3		20030507.023-13	46,81	43,31±4,95
		20030507.023-33	39,81	
Position 4		20030507.023-14	45,31	43,61±2,41
		20030507.023-34	41,90	
10ppm	Position 1	20030327.011-11	3,39	3,54±1,26
		20030327.011-31	5,30	
		20030331.012-11	3,17	
		20030331.012-31	2,30	
	Position 2	20030327.011-12	6,62	8,55±2,56
		20030327.011-32	7,89	
		20030331.012-12	12,30	
		20030331.012-32	7,37	
	Position 3	20030327.011-13	8,93	11,71±3,36
		20030327.011-33	10,18	
		20030331.012-13	16,56	
		20030331.012-33	11,17	
	Position 4	20030327.011-14	10,14	13,85±3,34
		20030327.011-34	11,98	
		20030331.012-14	17,25	
		20030331.012-34	16,02	
50ppm	Position 1	20030402.013-11	1,04	1,53±0,58
		20030402.013-31	1,57	
		20030408.015-11	1,17	
		20030408.015-31	2,33	

Nom. NO ₂ -Konz.:	Position:	Flaschen Nr:	GSX [nmol/mg]:	MW GSX [nmol/mg]±SD:
	Position 2	20030402.013-11	0,94	1,28±0,26
		20030402.013-31	1,45	
		20030408.015-11	1,22	
		20030408.015-31	1,52	
	Position 3	20030402.013-11	1,09	1,13±0,25
		20030402.013-31	0,92	
		20030408.015-11	1,49	
		20030408.015-31	1,00	
	Position 4	20030402.013-11	1,28	1,31±0,27
		20030402.013-31	1,12	
		20030408.015-11	1,70	
		20030408.015-31	1,13	

Tabelle 6.8: Anhang zu Abb. 3.13a
Einfluss von Beclomethason auf NO₂-exponierte Zellkulturen

Nom. NO ₂ -Konz.:	Position:	Flaschen Nr:	%-GSX zum Kontrollwert:	MW %-GSX zum Kontrollwert±SD:
10ppm	Position 1	20031120.060-11	70,28	75,2±4,7
		20031125.061-11	76,19	
		20040210.062-11	75,75	
		20040210.063-11	83,56	
		20040217.064-11	71,25	
		20040217.065-11	73,94	
	Position 2	20031120.060-12	71,85	96,6±14,0
		20031125.061-12	112,69	
		20040210.062-12	102,16	
		20040210.063-12	91,02	
		20040217.064-12	98,42	
		20040217.065-12	103,56	
	Position 3	20031120.060-13	83,53	80,0±4,0
		20031125.061-13	80,02	
		20040210.062-13	83,59	
		20040210.063-13	82,12	
		20040217.064-13	73,28	
		20040217.065-13	77,40	
	Position 4	20031120.060-14	79,38	98,0±11,8
		20031125.061-14	113,18	
		20040210.062-14	108,07	
		20040210.063-14	96,26	
		20040217.064-14	95,17	
		20040217.065-14	96,11	
Position 9a	20031125.061-31	100,22	100,7±1,4	
	20040210.062-31	102,27		
	20040217.065-31	99,66		
Position 10a	20031125.061-32	109,20	104,5±7,4	
	20040210.062-32	108,30		
	20040217.065-32	95,93		

Nom. NO ₂ -Konz.:	Position:	Flaschen Nr:	%-GSX zum Kontrollwert:	MW %-GSX zum Kontrollwert±SD:
	Position 11a	20031125.061-33	100,78	99,5±5,7
		20040210.062-33	104,48	
		20040217.065-33	93,34	
	Position 12a	20031125.061-34	101,39	98,3±2,8
		20040210.062-34	97,66	
		20040217.065-34	95,99	
	Position 9b	20031120.060-31	65,30	68,9±13,5
		20040210.063-31	83,78	
		20040217.064-31	57,47	
	Position 10b	20031120.060-32	74,39	61,6±14,1
		20040210.063-32	64,00	
		20040217.064-32	46,52	
	Position 11b	20031120.060-33	69,91	62,3±14,5
		20040210.063-33	71,36	
		20040217.064-33	45,51	
	Position 12b	20031120.060-34	62,52	50,6±13,4
		20040210.063-34	53,11	
		20040217.064-34	36,08	

Tabelle 6.9: Anhang zu Abb. 3.13b
Einfluss von Beclomethason auf NO₂-exponierte Zellkulturen

Nom. NO ₂ -Konz.:	Position:	Flaschen Nr:	%-GSX zum Kontrollwert:	MW %-GSX zum Kontrollwert±SD:
10ppm	4h NO ₂	20031120.060-11	70,28	77,6±4,9
		20031125.061-11	76,19	
		20040210.062-11	75,75	
		20040210.063-11	83,56	
		20040217.064-11	71,25	
		20040217.065-11	73,94	
		20031120.060-13	83,53	
		20031125.061-13	80,02	
		20040210.062-13	83,59	
		20040210.063-13	82,12	
		20040217.064-13	73,28	
		20040217.065-13	77,40	
		+ 0,0μM Becl	20031120.060-12	
	20031125.061-12		112,69	
	20040210.062-12		102,16	
	20040210.063-12		91,02	
	20040217.064-12		98,42	
	20040217.065-12		103,56	
	20031120.060-14		79,38	
	20031125.061-14	113,18		
20040210.062-14	108,07			
20040210.063-14	96,26			
20040217.064-14	95,17			
20040217.065-14	96,11			

Nom. NO ₂ -Konz.:	Position:	Flaschen Nr:	%-GSX zum Kontrollwert:	MW %-GSX zum Kontrollwert±SD:
	+ 0,1µM Becl	20031125.061-31	100,22	100,8±4,8
		20040210.062-31	102,27	
		20040217.065-31	99,66	
		20031125.061-32	109,20	
		20040210.062-32	108,30	
		20040217.065-32	95,93	
		20031125.061-33	100,78	
		20040210.062-33	104,48	
		20040217.065-33	93,34	
		20031125.061-34	101,39	
	20040210.062-34	97,66		
	20040217.065-34	95,99		
	+ 1,0µM Becl	20031120.060-31	65,30	60,8±13,7
		20040210.063-31	83,78	
		20040217.064-31	57,47	
		20031120.060-32	74,39	
		20040210.063-32	64,00	
		20040217.064-32	46,52	
		20031120.060-33	69,91	
		20040210.063-33	71,36	
20040217.064-33		45,51		
20031120.060-34		62,52		
20040210.063-34	53,11			
20040217.064-34	36,08			

Tabelle 6.10: Anhang zu Abb. 3.14a
Einfluss von Budesonid auf NO₂-exponierte Zellkulturen

Nom. NO ₂ -Konz.:	Position:	Flaschen Nr:	%-GSX zum Kontrollwert:	MW %-GSX zum Kontrollwert±SD:
10ppm	Position 1	20030919.040-11	69,09	61,3±10,2
		20030926.043-11	62,50	
		20030927.044-11	66,89	
		20031002.045-11	46,56	
	Position 2	20030919.040-12	96,58	88,6±9,9
		20030926.043-12	86,43	
		20030927.044-12	75,46	
		20031002.045-12	95,88	
	Position 3	20030919.040-13	78,34	68,0±8,8
		20030926.043-13	63,76	
		20030927.044-13	71,60	
		20031002.045-13	58,26	
	Position 4	20030919.040-14	96,01	83,9±11,3
		20030926.043-14	86,80	
		20030927.044-14	68,70	
		20031002.045-14	84,24	
	Position 9a	20030919.040-31	94,14	89,5±6,6
		20030926.043-31	84,79	

Nom. NO ₂ -Konz.:	Position:	Flaschen Nr:	%-GSX zum Kontrollwert:	MW %-GSX zum Kontrollwert±SD:
	Position 10a	20030919.040-32	90,61	84,1±8,8
		20030926.043-32	87,67	
		20030927.044-32	74,15	
	Position 11a	20030919.040-33	92,55	87,6±4,5
		20030926.043-33	86,76	
		20030927.044-33	83,63	
	Position 12a	20030919.040-34	92,91	88,2±6,7
		20030927.044-34	83,43	
	Position 9b	20030909.038-31	68,40	73,6±7,4
		20030912.039-31	78,80	
	Position 10b	20030909.038-32	66,06	69,7±3,7
		20030912.039-32	73,50	
		20031002.045-32	69,53	
	Position 11b	20030909.038-33	52,52	70,3±17,6
		20030912.039-33	87,65	
		20031002.045-33	70,79	
	Position 12b	20030909.038-34	57,33	71,4±13,0
		20030912.039-34	82,98	
		20031002.045-34	73,90	

Tabelle 6.11: Anhang zu Abb. 3.14b
Einfluss von Budesonid auf NO₂-exponierte Zellkulturen

Nom. NO ₂ -Konz.:	Position:	Flaschen Nr:	%-GSX zum Kontrollwert:	MW %-GSX zum Kontrollwert±SD:
10ppm	4h NO ₂	20030919.040-11	69,09	64,6±9,5
		20030926.043-11	62,50	
		20030927.044-11	66,89	
		20031002.045-11	46,56	
		20030919.040-13	78,34	
		20030926.043-13	63,76	
		20030927.044-13	71,60	
		20031002.045-13	58,26	
		+ 0,0μM Bud	20030919.040-12	
	20030926.043-12		86,43	
	20030927.044-12		75,46	
	20031002.045-12		95,88	
	20030919.040-14		96,01	
	20030926.043-14		86,80	
	20030927.044-14		68,70	
	20031002.045-14		84,24	
	+ 0,1μM Bud	20030919.040-31	94,14	87,1±6,0
		20030926.043-31	84,79	
		20030919.040-32	90,61	
		20030926.043-32	87,67	
		20030927.044-32	74,15	
		20030919.040-33	92,55	
		20030926.043-33	86,76	

Nom. NO₂-Konz.:	Position:	Flaschen Nr:	%-GSX zum Kontrollwert:	MW %-GSX zum Kontrollwert±SD:
		20030927.044-33	83,63	
		20030919.040-34	92,91	
		20030927.044-34	83,43	
	+ 1,0μM Bud	20030909.038-31	68,40	71,0±10,3
		20030912.039-31	78,80	
		20030909.038-32	66,06	
		20030912.039-32	73,50	
		20031002.045-32	69,53	
		20030909.038-33	52,52	
		20030912.039-33	87,65	
		20031002.045-33	70,79	
		20030909.038-34	57,33	
		20030912.039-34	82,98	
		20031002.045-34	73,90	

7 Literaturverzeichnis

1. Pace DM, Thompson JR, Aftonomos BT, Holck HGO. 1961. The effects of NO₂ and Salts of NO₂ upon established cell lines. *Canadian Journal of biochemistry and Physiology* 39: 1247-55
2. Samuelsen GS, Rasmussen RE, Nair BK, Crocker TT. 1978. Novel culture and exposure system for measurement of effects of airborne pollutants on mammalian cells. *Environmental Science and Technology* 12: 426-30
3. Rasmussen RE, Crocker TT. 1981. A culture system for the direkt exposure of mammalian cells to airborne pollutants. *Short-term bioassays in the analysis of complex environmental mixtures*: 119-31
4. Guerrero RR, Rounds DE, Booher J, Olson RS. 1979. Ozone Sensitivity in Aging WI-38 Cells based on Acid Phosphatase Content. *Archives of Environmental Health* 34: 407-12
5. Alink GM, van der Hoeven FMH, Debets WSM, van der Ven R, Koeman JH. 1979. At new exposure model for in Vitro testing of effects of gas pollutants on mammalian cells by means of gas diffusion through plastic films. *Chemosphere* 2: 63-73
6. Bolton DC, Tarkington BK, Zee YC, Osebold JW. 1982. An in Vitro System for Studying the Effects of Ozone on Mammalian Cell Cultures and Viruses. *Environmental Research* 27: 466-75
7. Kienast K, McKinnon KP, Madden M, Carter JD, Reed W, et al. 1995. In-vitro-Expositionen einer humanen bronchialen Epithelzelllinie mit Stickstoffdioxid induzieren eine vermehrte Transkription und Freisetzung proinflammatorischer Zytokine. *Pneumologie* 49: 695-9
8. Wallaert B, Fahy O, Tscopoulos A, Gosset P, Tonnel AB. 2000. Experimental systems for mechanistic studies of toxicant induced lung inflammation. *Toxicol Lett* 112-113: 157-63
9. Ritter D, Knebel JW, Aufderheide M. 2001. In vitro exposure of isolated cells to native gaseous compounds - Development and validation of an optimized system for human lung cells. *Exp Toxicol Pathol* 53: 373-86
10. Gery A, Martel H, Wallaert B. 1995. Incinération des déchets: un test biologique de qualité des fumées. *Techniques Sciences Méthodes*: 431-34
11. Wallaert B, Coursier JM, Gosset P, Saison JY, Tonnel AB. 1998. Effects of urban air pollution on cytokine secretion by alveolar macrophages in vitro. *The European Respiratory Journal* 12: 258S
12. Rasmussen RE. 1984. In vitro systems for exposure of lung cells to NO₂ and O₃. *Journal of toxicology and environmental health* 13: 397-411
13. Muhle H, McClellan. 2004. Respirationstrakt. In *Lehrbuch der Toxikologie*, ed. H Marquardt, SG Schäfer, pp. 365-82. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft
14. Lechleuthner A, Steffens W. 2005. Cortison bei Reizgasinhalation.
15. Eyer P, ed. 2004. *Gasförmige Verbindungen*. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft. 821-49 pp.
16. Mortimer CE. 1996. *Chemie - Das Basiswissen der Chemie*. 744 pp.
17. Norwood WD, Wisheart BS, Earl CA, Adley FE, Anderson DE. 1966. Nitrogen Dioxide Poisoning due to Metal-Cutting with Oxyacetylene Torch. *Journal of occupational medicine* 8: 301-6
18. Carson TR, Rosenholtz MS, Wilinski FT, Weeks MH. 1962. The Responses of Animals Inhaling Nitrogen Dioxide for single, short-term Exposures. *American Industrial Hygiene Association* 23: 457-62

19. Balmer R. 2001. Explosion in Düngemittelfabrik in Toulouse.
20. WDR-Online. 2005. Wie ein Bombenangriff - Vor 5 Jahren: Explosions-Katastrophe in Enschede.
21. Bernard G, Artigas A, Brigham K, Carlet J, Falke K, et al. 1994. The American - European Consensus Conference on ARDS. Definitions, mechanisms, relevant outcomes and clinical trial coordination. *American Journal of respiratory and critical care medicine* 149/3: 818-24
22. Schinnerl A. 1998. Rauchgas: Ein hochgiftiges Gemisch / Rauchgasvergiftung - Was ist das eigentlich / Hier die auch für Nichtmediziner verständliche Antwort. In *Die österreichische Feuerwehr*, pp. 18-9
23. Miller-Larsson A, Mattsson H, Hjertberg E, Dahlback M, Tunek A, Brattsand R. 1998. Reversible fatty acid conjugation for prolonged retention of topically applied steroid in airway tissue. *Drug Metab. Dispos* 26: 623-30
24. Schimmer BP, Parker KL. 2001. Adrenocorticotrophic Hormone; Adrenocortical Steroids and Their Synthetic Analogs. In *Goodman & Gilman's Basis of Therapeutics*, ed. JG Hardman, LE Limbird, pp. 1649-77. New York
25. Mückter H, Zwing M, Bäder S, Marx T, Doklea E, et al. 1998. A novel apparatus for the exposure of cultured cells to volatile agents. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* 40: 63-9
26. Aufderheide M. 2005. Direct exposure methods for testing native atmospheres. *Exp Toxicol Pathol* 57: 213-26
27. Tietze F. 1969. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. *Analytical Biochemistry* 27: 502-22
28. Beisenherz Gea. 1953. Diphosphofruktose-Aldolase, Phosphoglyceraldehyd-Dehydrogenase, Milchsäure-Dehydrogenase, Glycerophosphat-Dehydrogenase und Pyruvat-Dehydrogenase aus Kaninchenmuskulatur in einem Arbeitsgang. *Naturforschung* 8B: 118-26
29. Sachs L. 1991. *Angewandte Statistik*. Heidelberg: Springer Verlag. 188 pp.
30. Longui CA, Vottero A, Adamson PC, Cole DE, Kino T, et al. 2000. Low glucocorticoid receptor alpha/beta ratio in T-cell lymphoblastic leukemia. *Horm Metab Res* 32: 401-6
31. Leung HW, Morrow PE. 1981. Interaction of glutathione and ascorbic acid in guinea pig lungs exposed to nitrogen dioxide. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 31: 111-8
32. Zilker T. 1996. Stellungnahme zum Für und Wider der Steroidtherapie nach Inhalation toxischer Substanzen. *Der Notarzt* 6: 205-7

8 Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Priv. Doz. Dr. Dr. Harald Mückter, der mir das Erstellen dieser Arbeit ermöglichte. Durch seine grenzenlose Bereitschaft zu Diskussionen konnten Probleme aller Art spielend überwunden werden. Durch seinen unermüdlichen Einsatz und seine Hilfsbereitschaft in allen Phasen des Projektes trug er wesentlich zum erfolgreichen Erstellen dieser Arbeit bei.

Ganz herzlich möchte ich mich auch bei Frau Erika Doklea bedanken, die mich sehr sorgfältig in den Umgang mit Zellkulturen und in die Versuchsauswertung eingewiesen hat und mir dabei während der Versuchsreihen immer hilfreich zur Hand ging. Auch Ihr verdanke ich sehr hilfreiche Diskussionen bei Problemen im Zusammenhang mit den Zellkulturen und der Versuchsauswertung.

Mein Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. Burkhard Fichtl für seine Begutachtung der Arbeit.

Mein ganz liebevoller Dank gilt nicht zuletzt meinen Eltern, die mich während der gesamten Arbeit immer hundertprozentig unterstützten und mir in den kritischen Phasen der Arbeit immer den Rücken freihielten.

9 Lebenslauf

Geboren	28.03.1976 in Bad Aibling
Vater	Nikolaus Hartl, Realschullehrer
Mutter	Beatrice Hartl, Apothekerin
Sep. 1982 – Juli 1986	Besuch der Grundschule in Eichenau
Sep. 1986 – Juli 1987	Besuch des Graf-Rasso-Gymnasiums in Fürstentfeldbruck
Sep. 1987 – Juni 1995	Besuch des Feodor-Lynen-Gymnasiums in Planegg mit Abschluss Abitur
Juli 1995 – April 1996	Zivildienst beim Malteser Hilfsdienst in Gräfelfing
Mai 1996 – Juli 2001	Studium der Pharmazie an der Ludwig-Maximilians-Universität in München mit Abschluss als Pharmazeut durch zweites Staatsexamen
Juli 2001- Juli 2002	Praktikum in der St. Kosmas Apotheke in München
Seit Aug. 2002	wissenschaftlicher Mitarbeiter am Walther-Straub-Institut in München
Okt. 2002	Abschluss als Apotheker durch drittes Staatsexamen
Okt. 2002 – Dez. 2002	Angestellter Apotheker in der St. Kosmas Apotheke