

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

Wirkung von Ozon auf A549 Zellen und L929 Zellen *in vitro*

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

vorgelegt von
Kerstin Reinelt

aus
Dachau

2008

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	PD Dr. med. Dr. rer. nat. Harald Mückter
Mitberichterstatter:	PD Dr. P. Angerer
	Prof. Dr. Th. Gilg
Dekan:	Prof. Dr. med. Dietrich Reinhardt
Tag der mündlichen Prüfung:	10.01.2008

Die experimentellen Arbeiten zu dieser Dissertation wurden von April 2004 bis April 2006 am Walther-Straub-Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität München ausgeführt.

Ich danke Herrn Privatdozent Harald Mückter für die Überlassung des Themas, sowie für die intensive Betreuung und seine Unterstützung bei der Planung und Interpretation der Experimente.

Herrn Professor Burckhard Fichtl danke ich für viele konstruktive Ratschläge und Anregungen.

Mein besonderer Dank gilt Frau Erika Doklea für ihre tatkräftige Unterstützung bei der Durchführung der Experimente.

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG.....	1
1.1	Ozon als Reizgas	2
1.1.1	Physikochemische Eigenschaften von Ozon.....	2
1.1.2	Pathobiochemie und Pathophysiologie der Ozonexposition.....	4
1.1.3	Toxizität von Ozon.....	5
1.2	Schwellenwerte	7
1.3	Dosimetrie des Ozons	8
1.4	<i>In Vitro</i> Systeme zur Ozonexposition.....	10
1.5	Fragestellungen der Arbeit.....	12
2	MATERIAL UND METHODEN.....	13
2.1	Bezugsquellen für Chemikalien und Gase	13
2.2	Verwendete Geräte.....	13
2.3	Zellkultur	14
2.3.1	Verwendete Zellen	14
2.3.2	Kultivierungsbedingungen	14
2.3.3	Stammhaltung und Konservierung.....	14
2.3.4	Zellzahlbestimmung	14
2.3.5	Nährmedien und Pufferlösungen.....	15
2.4	Rasterelektronenmikroskopie	15
2.5	Ozonexposition.....	15
2.5.1	Vorbereiten der Zellen.....	15
2.5.2	Ozongenerierung und Messung.....	15
2.5.3	Expositionskammer	16
2.6	Biochemische Tests.....	17

2.6.1	Bestimmung der Zellaktivität.....	17
2.6.2	Glutathionbestimmung.....	18
2.6.3	Bestimmung des ATP-Gehalts.....	18
2.6.4	Farbstofftests.....	19
2.6.5	Proteinbestimmung.....	20
2.7	Statistik.....	20
3	ERGEBNISSE.....	21
3.1	Die Versuchsapparatur.....	21
3.1.1	Schäden an der Expositions-kammer durch Ozonexposition.....	21
3.1.2	Charakterisierung der Versuchsapparatur.....	22
3.2	Indigokarmin als Ozonindikator.....	24
3.2.1	Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten des Zerfalls von Indigokarmin.....	24
3.2.2	Toxizität von Indigokarmin.....	27
3.3	Abschätzung der tatsächlichen Ozonkonzentration.....	29
3.4	Wirkung von Ozon auf A549 und L929 Zellen.....	30
3.4.1	Vitalität.....	30
3.4.2	Bestimmung des oxidativen Stresses.....	38
3.4.3	Einfluss auf den Energiehaushalt.....	41
3.5	Spontanerholung nach Ozonexposition.....	44
4	DISKUSSION.....	46
4.1	Zusammenfassung der Ergebnisse.....	46
4.2	Apparatur.....	47
4.2.1	Indigokarmin als Indikator der Ozonkonzentration.....	48
4.3	Ozonexposition.....	49
4.3.1	Morphologische Schäden an den Zellen.....	49
4.3.2	Vergleich der unterschiedlichen Toxizitätsparameter.....	50
4.3.3	Vergleich der beiden Zelllinien.....	52

4.4	Spontanerholung	53
4.5	Ausblick.....	54
5	ZUSAMMENFASSUNG	55
6	ANHANG.....	57
7	LITERATURVERZEICHNIS	102
8	LEBENS LAUF	113

Abkürzungen

ATP	Adenosintriphosphat
DMEM-F12mix	Dulbecco's Modified Eagle Medium/Ham F12 Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTNB	Bis-(4-nitrophenyl)-disulfid-3,3'-dicarbonsäure
EC	Expositions-kammer
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetracetat
EPDM	Ethylen-Propylen-Dien-Kautschuk
FEV ₁	Forciertes Exspiratorisches Volumen in 1 Sekunde
FVC	Forcierte Vitalkapazität
GR	Glutathion-Reduktase
GSH	Reduziertes Glutathion
GSSG	Oxidiertes Glutathion
GSX	Gesamtglutathion
HBSS	Hanks's Balanced Salt Solution
KPP	Kaliumphosphatpuffer
LC ₅₀	mittlere letale Konzentration
LCLo	geringste bekannte letale Konzentration
MAK	Maximale Arbeitsplatz Konzentration
n.a.	Nicht angegeben
NAD/NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (reduziert)
ppb	Parts per billion (1:10 ⁹)
ppm	Parts per million (1:10 ⁶)
PTFE	Polytetrafluorethylen
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
SER	Glattes endoplasmatisches Retikulum
TCA	Trichloressigsäure
TCLo	geringste bekannte toxische Konzentration
TRK	Technische Richtkonzentration
XTT	2,3-Bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilid

1 Einleitung

Ozon ist eine Modifikation des Sauerstoffs, die in der Stratosphäre als Filter für die (schädliche) UV Strahlung der Sonne, am Boden aber als Reizgas wirkt. Die Wirkungen des Gases auf die menschliche Gesundheit rückte zuletzt im heißen Sommer 2003 mit seiner vermehrten Ozonbildung in den Blickpunkt des öffentlichen Interesses [145; 41]. In diesem Jahr wurde der Schwellenwert für Ozon ($180 \mu\text{g}/\text{m}^3$) vielerorts mehrfach überschritten (Abbildung 1.1). Einige Studien haben daher die Sterblichkeit in dieser Zeit untersucht: in den Niederlanden stiegen die dem Ozon zugeschriebenen Todesfälle im Vergleich zu 2002 um 22,8% (260 mehr Tote) [45] und im Vereinigten Königreich um 78% (593 mehr Tote) [135] an. Eine Erhöhung der täglichen Ozonbelastung um 10 ppb hat nach Bell et al eine Erhöhung der Sterblichkeitsrate um 0,87% zur Folge [12].

Im Vergleich zu den natürlich auftretenden Ozonkonzentrationen werden in der Industrie sehr viel höhere Ozonkonzentrationen verwendet. Bei der Abwasserbehandlung und der Trinkwasserdesinfektion findet Ozon im Bereich von 0,5 - 4 mg/L Anwendung [22; 94]. Daher sind im Sinne des vorbeugenden Gesundheitsschutzes für exponierte Arbeiter auch die toxischen Wirkungen sehr hoher Ozonkonzentrationen von Interesse.

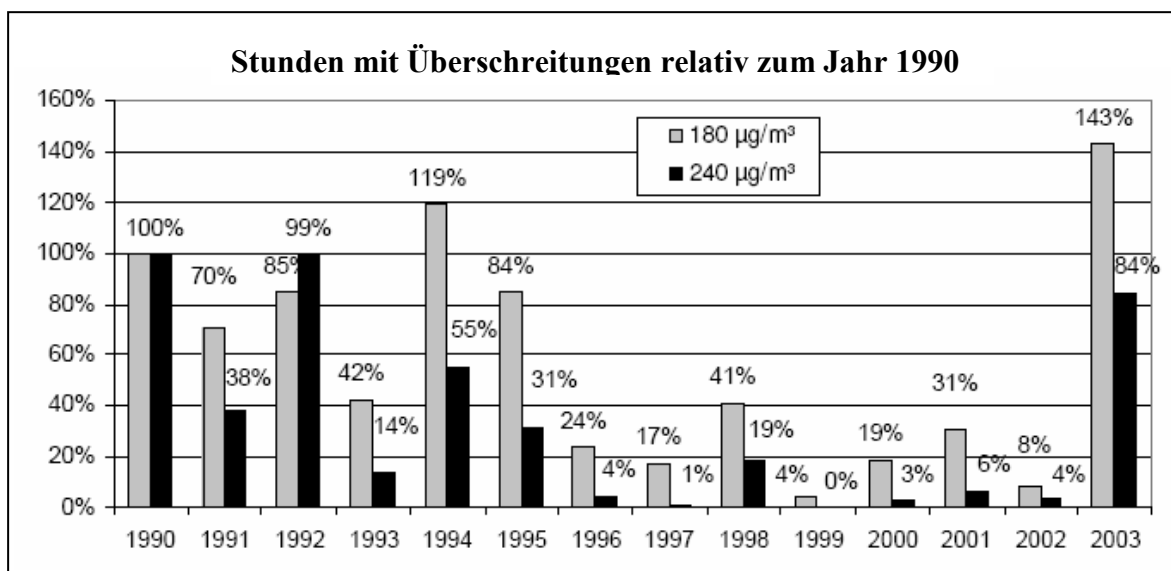


Abbildung 1.1: Ozonbelastung in Deutschland von 1990-2003: Auf 1990 normierte Anzahl der Stunden mit Überschreitungen von 180 und $240 \mu\text{g}/\text{m}^3$. Dargestellt sind die Mittelwerte der jeweils betriebenen Messstationen.

Quelle: Umweltbundesamt, 2003

1.1 Ozon als Reizgas

Als Reizgase bezeichnet man Gase, die beim Kontakt mit dem Körper, insbesondere mit der Haut und den Schleimhäuten, Reizwirkungen (Juckreiz, Hustenreiz, Entzündungsreize) auslösen. Nach (längerer) Inhalation wird der Respirationstrakt u. U. bis hin zur irreversiblen Zerstörung des betroffenen Gewebes geschädigt.

Der Angriffspunkt eines Reizgases wird maßgeblich von seiner Wasserlöslichkeit und Reaktivität bestimmt. Hydrophile Substanzen wirken vor allem an den Konjunktiven und Schleimhäuten der oberen Luftwege. Beispiele hierfür sind Ammoniak, Säuredämpfe, Halogene und Formaldehyd. Die unteren Abschnitte (Bronchiolen, Alveolen) werden durch lipophilere Reizgase betroffen. Dazu zählen Ozon, nitrose Gase, Phosgen, aber auch Aerosole wie Cadmiumrauch oder Kobaltchloridnebel.

1.1.1 Physikochemische Eigenschaften von Ozon

Ozon (O_3) wurde 1839 durch Christian Schönbein entdeckt [131]. Der Name kommt von dem stechenden Geruch (gr. οζειν= riechen).

Es besitzt ein Molekulargewicht von 48 g/mol, 1 ppm entspricht 2 mg/m^3 und ist ein instabiles, bläuliches, diamagnetisches Gas, das stark reizend und oxidierend wirkt.

Die drei Sauerstoffatome des Ozonmoleküls bilden ein gleichschenkliges Dreieck, mit einem Bindungswinkel von $116,8^\circ$. Es können zwei mesomere Grenzstrukturen formuliert werden (Abbildung 1.2).

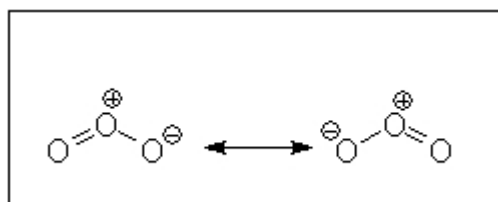
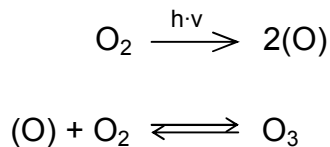


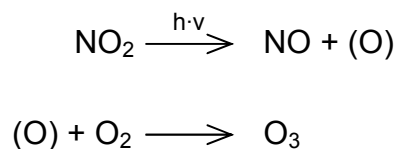
Abbildung 1.2: Mesomere Grenzstrukturen des Ozons

Aufgrund dieser mesomeren, zwitterionischen Grenzstruktur ist Ozon 14mal besser in Wasser löslich als molekularer Sauerstoff (570 mg/l bei 20°C). Bei $253,7 \text{ nm}$ weist es ein Absorptionsmaximum auf.

Ozon entsteht in der Stratosphäre vor allem unter dem Einfluss von UV-Strahlung (<242 nm) gemäß folgender Reaktion:



Zu den unteren Atmosphärenschichten hin nimmt die Ozonkonzentration durch photolytischen Abbau durch die UV-B-Strahlung (<310 nm) stetig ab. In der Troposphäre fördern allerdings die durch den Kraftstoffverkehr freigesetzten Schadstoffe, vor allem die Stickoxide (NO_x), die Bildung des Ozons. Stickstoffdioxid wird photolytisch durch die UV-A-Strahlung (<400 nm) gespalten und zerfällt in das radikalische Stickstoffmonoxid und atomaren Sauerstoff, welcher wiederum mit molekularem Sauerstoff reagiert und Ozon bildet:



Außerdem kann Ozon durch eine komplizierte Kettenreaktion in Gegenwart von nitrosen Gasen, Kohlenwasserstoffen und Sonnenlicht gebildet werden. Ozon ist die Leitkomponente der unter dem Einfluss intensiver Sonnenstrahlung entstehenden Photooxidantien, die zu Sommersmog-Situationen führen können [9]. Aufgrund der höheren Sonneneinstrahlung in Reinluftgebieten können durch den Schadstoffeintrag höhere Ozonkonzentrationen erreicht werden als am Ort der Schadstoffentstehung. Dies wird dadurch begünstigt, dass Ozon mit NO und Kohlenwasserstoffen reagieren und dadurch wieder zerfallen kann. Die durchschnittliche Halbwertszeit von Ozon in der Troposphäre beträgt 7 min.

Eine wichtige Eigenschaft des Ozons ist das hohe Standardredoxpotential von +2 V. Es ist also ein sehr starkes Oxidationsmittel. Ozon ist in der Lage Kohlenstoffdoppelbindungen zu spalten [29]. Dieser Prozess, die Ozonolyse, stellt einen Spezialfall der 1,3-dipolaren Cycloaddition dar (Abbildung 1.3). Das gebildete Primärozonid zerfällt sofort in ein Keton und eine Peroxoverbindung. In einem weiteren Schritt reagieren diese beiden zum Ozonid. Die Hydrolyse des Ozonids führt je nach Reaktionsbedingungen zu verschiedenen Endprodukten. Reduktiv entsteht ein Aldehyd, ohne Reduktionsmittel reagieren die entstehenden Aldehyde zur Karbonsäure weiter.

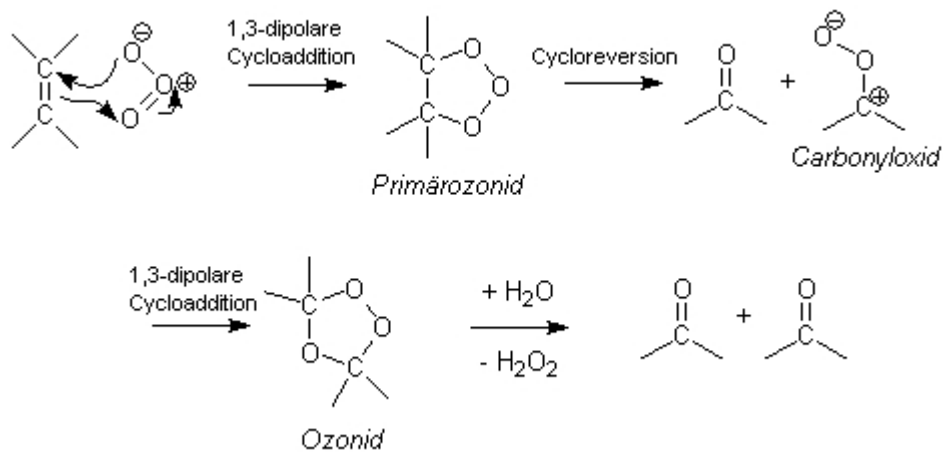


Abbildung 1.3: Schematische Darstellung der Ozonolyse

1.1.2 Pathobiochemie und Pathophysiologie der Ozonexposition

Ozon greift C-C-Mehrfachbindungen an, egal ob diese isoliert oder in aromatischen Ringsystemen vorkommen. Der bevorzugte Angriff auf $-C=C-$ Doppelbindungen ist bedeutsam für die toxische Wirkung von Ozon. Es ist wahrscheinlich, dass ungesättigte Fettsäuren in der oberflächenaktiven Schicht der Alveolen ein Hauptangriffspunkt sind. Durch deren Ozonolyse entstehen Peroxide, Aldehyde, Ketone, Säuren und freie Radikale [50]. Diese Folgeprodukte sind in der Lage, die Membranen der obersten Zellschichten von Atemwegen und Alveolen zu schädigen [112; 113]. Geschädigte Zellen setzen Mediatoren frei, die eine entzündliche Reaktion auslösen bzw. unterhalten [74]. Diese Entzündungsreaktion verlängert die Ozonwirkung über die eigentliche Einwirkzeit hinaus.

Aufgrund der geringen Wasserlöslichkeit von Ozon gelangt das Gas bis in die tieferen Atemwege. Die höchste Ozonkonzentration wird in den terminalen [68] und den respiratorischen Bronchiolen erreicht [96]. Die oberen Atemwege halten bei Nasenatmung etwa 36%, bei Mundatmung 40% des eingeatmeten Ozons zurück [53]. Die Ozonabsorption in der Lunge nimmt mit steigender Temperatur zu und ist unabhängig von der Durchblutung [111]. Aufgrund der hohen Reaktivität von Ozon ist die Absorption des Gases im Lungengewebe 15.000-mal größer als die von molekularem Sauerstoff [127].

Seine Wirkungen entfaltet Ozon vorwiegend in der laminaren Grenzschicht der Atemwege und der Lungenbläschen und nicht direkt im Gewebe [114; 79].

1.1.3 Toxizität von Ozon

Die subjektiven Symptome bei akuter Ozonexposition sind unter anderem Engegefühl, trockener Hals, Heiserkeit, Husten, Kurzatmigkeit, Kopfschmerzen, Schwindelgefühl und verminderte Leistungsfähigkeit [64; 157]. Die Stärke dieser subjektiven Symptome korreliert bei einer mittleren Ozondosis mit Einschränkungen von Lungenfunktionen [59; 77; 130]. Das Einsetzen der Wirkung ist stark abhängig von der körperlichen Aktivität. Unter Ruhebedingungen führen Ozonkonzentrationen unter $200 \mu\text{g}/\text{m}^3$ erst bei einer Expositionsdauer von 5-6 Stunden zu messbaren Veränderungen der spirometrischen Parameter (FVC, FEV₁) und der Lungenelastizität. Während körperlicher Belastung treten diese Veränderungen dagegen schon nach 1-2 Stunden auf [154].

Zur besseren Einschätzung der in den eigenen Versuchen verwendeten Ozonkonzentrationen, sind in Tabelle 1.1 Beispiele für die toxische Wirkung von Ozon in verschiedenen Spezies bei unterschiedlichen Expositionsszenarien aufgeführt.

Tabelle 1.1: Wirkung von Ozon in verschiedenen Spezies bei unterschiedlichen Expositionsszenarien:

TCLo: Geringste Konzentration bei der eine toxische Wirkung festgestellt wurde. LCLo: Geringste Konzentration bei der Letalität festgestellt wurde.

Organismus	Ozon [mg/m ³]	Dauer [h]	c-t-Produkt [(mg/m ³)h]	Wirkungen	Literatur
Mensch	0,78	2	1,56	Entzündungsreaktion der Lunge	[126]
Mensch	0,2	0,5	0,1	Bindehautentzündung, Husten,	[7]
Mensch	2	1	2	Respiratorische Depression	[7]
Mensch	8	n.a.	n.a.	Akutes Lungenödem, TCLo	[7]
Mensch	0,15	6,6	0,99	Husten, respiratorische Depression	[91]
Mensch	100	0,5	50	LCLo	
Ratte	0,43	6	2,58	Chromosomenaberrationen in Lungenmakrophagen	[123]
Maus	24	3	72	Akutes Lungenödem; Blutung, (LC ₅₀)	[7]
Maus	1,6	3	4,8	Veränderungen des Lungengewichts und des Lebergewichts, Enzyminhibition, -induktion	[7]
Maus	1,5	4	6	Plasmaproteine koagulieren nicht mehr	[19]

Organismus	Ozon [mg/m ³]	Dauer [h]	c-t-Produkt [(mg/m ³)h]	Wirkungen	Literatur
Maus	2	1	2	Bronchiale Konstriktion einschließlich Asthma; Effekte auf Entzündungsreaktion oder auf die Vermittlung einer Entzündungsreaktion	[158]

Es hat nicht an Versuchen gefehlt, die Wirkungen von Ozon an weniger komplexen *in vitro* Systemen zu studieren. Aufgrund der Bedeutung des Respirationstrakts für die Ozonvergiftung wurden hierbei isolierte Zellen aus dem bronchio-alveolären System bevorzugt. Tabelle 1.2 zeigt die Wirkungen bei unterschiedlichen Ozonkonzentrationen *in vitro*.

Tabelle 1.2: Wirkungen von Ozon in verschiedenen Zelllinien bei unterschiedlichen Expositionsszenarien

Zelllinie	Ozon [mg/m ³]	Dauer [h]	c-t-Produkt [(mg/m ³)h]	Wirkung	Literatur
Typ II Pneumozyten	0,8	6	4,8	Erhöhte Anzahl von Micro-nuclei	[26]
A549	0,16	1	0,16	Einzelstrangbrüche; 8-Oxo-guaninbildung	[24]
A549	0,2	5	1,0	Induktion von Interleukin-8	[70]
A549	1,0	3	3,0	Erhöhte Freisetzung von Laktat-Dehydrogenase	[38]
L929	0,5	0,5	0,25	DNA Strangbrüche	[148]
L929	0,5	0,5	0,25	Inaktivierung von Transportsystemen aufgrund von Membranschäden	[147]
L929	0,5	0,5	0,25	Enzyminaktivierung, K ⁺ Freisetzung, Erniedrigung des GSH-Gehalts	[146]

Ein wichtiger Aspekt der Wirkung von Ozon sind die großen interindividuellen Unterschiede. Diese Schwankungen sind so gravierend, dass bei geringer und mittlerer Ozondosis bei den meisten Menschen keine Reaktion nachzuweisen ist, während einige bereits eine heftige Reaktion zeigen. Man spricht hierbei von „Nichtrespondern“ und „Respondern“. Etwa 10-20% der Bevölkerung sind Responder [66]. Interessant ist, dass unter den Respondern Asthmatiker und chronische

Bronchitiker nicht häufiger als Lungengesunde vorkommen [78; 87; 88; 136].

Im Gegensatz zu einer Exposition mit Schwefeldioxid tritt bei einer wiederholten Ozonexposition von Respondern keine Verstärkung der Reizsymptome (Husten, Atemnot) auf, sondern ein Nachlassen bis hin zu einem vollständigen Verschwinden der ozonbedingten Symptome. Dies betrifft auch die Veränderungen der Lungenfunktionsparameter. Dieses Adaptionsphänomen tritt sowohl unter kontrollierten Laborbedingungen auf [92; 47; 43] als auch unter natürlichen Bedingungen. So liegt im Frühjahr eine erhöhte Ozonempfindlichkeit vor, welche sich im Lauf des Sommers abschwächt. Auch sind Menschen, die in Gebieten mit häufig auftretenden höheren Ozonkonzentrationen wie Kalifornien leben, weniger empfindlich gegenüber Ozon als Menschen, die in ihrer natürlichen Umgebung wie z.B. Kanada nur geringen Ozonkonzentrationen ausgesetzt sind [59]. Die Adaption tritt bereits nach 1-2 Tagen ein und verliert sich nach 1-3 Wochen wieder [46; 58; 67]. Bei Versuchspersonen mit hoher Ozonempfindlichkeit setzt im Vergleich zu durchschnittlichen Respondern die Adaption später ein und verliert sich früher wieder [67]. Vermutlich kann diese Adaption auch über Kreuzreaktionen ausgelöst werden. So zeigen Raucher eine geringere Empfindlichkeit gegenüber Ozon als Nichtraucher [40; 76]. Worauf diese Adaption beruht ist nicht abschließend geklärt. Sie könnte durch eine Kapazitätssteigerung des antioxidativen Systems zustande kommen [142], durch eine Empfindlichkeitssenkung des „entzündungsvermittelnden Rezeptors“ [20], vermehrte Schleimsekretion und größere Schleimhautdicke [107] oder durch eine beschleunigte mukoziliäre Clearance [48].

1.2 Schwellenwerte

Die Geruchsschwelle von Ozon ist sehr niedrig, sie liegt bei $40 \mu\text{g}/\text{m}^3$. Ozon tritt im Jahresmittel in der Troposphäre in Konzentrationen von $20\text{-}80 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (0,01-0,04 ppm) auf [132; 39]. Im Sommer kommt es aufgrund der verstärkten Bildung bei Sonnenlicht in den Ballungsgebieten zu stark erhöhten Konzentrationen bis 0,3 ppm [10]. Sowohl der Tagesgang, als auch der Jahresgang der Ozonkonzentrationen zeigt einen charakteristischen Verlauf. Im Verlauf des Tages steigt die Ozonkonzentration bis zum frühen Nachmittag steil an, um nach Sonnenuntergang wieder abzufallen. Der Jahresverlauf zeigt ein deutliches Maximum im Sommerhalbjahr.

Schwellenwerte der Ozonkonzentration sind in der "EU-Richtlinie über Luftverschmutzung durch Ozon" festgelegt [121]:

Zielwert:

120 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ als 8-Stunden-Mittelwert

Schwellenwert für die Unterrichtung der Bevölkerung:

180 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ als 1-Stunden-Mittelwert

Schwellenwert für die Auslösung von Ozon-Warnungen:

240 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ als 1-Stunden-Mittelwert

Der Zielwert darf an maximal 25 Tagen im Jahr, gemittelt über 3 Jahre, überschritten werden. Bis 2010 muss dieser Wert erreicht sein. Der seit 1958 geltende MAK-Wert (Maximale Arbeitsplatzkonzentration) betrug 200 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ und bezog sich lediglich auf die schleimhautreizende Wirkung des Ozons. Auf Grund von Hinweisen auf eine krebserregende Wirkung und das genotoxische Potential von Ozon wurde 1995 der MAK-Wert ausgesetzt und 1998 durch einen TRK-Wert (technische Richtkonzentration) von 200 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ersetzt.

1.3 Dosimetrie des Ozons

In der Literatur sind viele Möglichkeiten beschrieben, Ozonkonzentrationen zu bestimmen. Die Techniken reichen von chemischen [81], elektrochemischen [65] bis hin zu optischen [61; 13; 4] Methoden. Die meisten dieser Techniken dienen der Bestimmung atmosphärischer Ozonkonzentrationen.

Die am häufigsten verwendete chemische Methode ist die iodometrische, da sie die größte Übereinstimmung mit absolut physikalischen Methoden, basierend auf Messungen der Gasdichte [16] oder der Druckveränderung [14] zeigt. Hierbei wird das ozonhaltige Gas durch eine 2%ige Kaliumiodidlösung geleitet. Anschließend wird die Lösung mit 1 M Schwefelsäure angesäuert und mit 0,1 N Natriumthiosulfatlösung titriert [5]. Diese Methode wurde von Shechter 1972 modifiziert, um gelöstes Ozon in Wasser zu bestimmen [134]. Die wässrige Ozonlösung wird mit neutraler Kaliumiodidlösung gemischt und die Konzentration des entstandenen Triiodids photometrisch bei 352 nm bestimmt. 0,01 N Triiodid entspricht 240 μg Ozon. Da Kaliumiodid allerdings für die Zellen toxisch sein kann, kann diese Methode nicht in der Zellkultur angewendet werden. Außerdem ist diese Methode nicht spezifisch für Ozon, so dass weitere entwickelt wurden, wie eine chemieluminometrische Bestimmung mit Rhodamin-B [57] und eine photometrische mit Indigokarmin [35].

Babior et al [6] benutzten Indigokarmin, um die Ozonproduktion von Neutrophilen nachzuweisen. Indigokarmin besitzt ein charakteristisches Absorptionsmaximum bei 610 nm.

Die Reaktion von Indigokarmin mit Ozon ist in Abbildung 1.4 dargestellt.

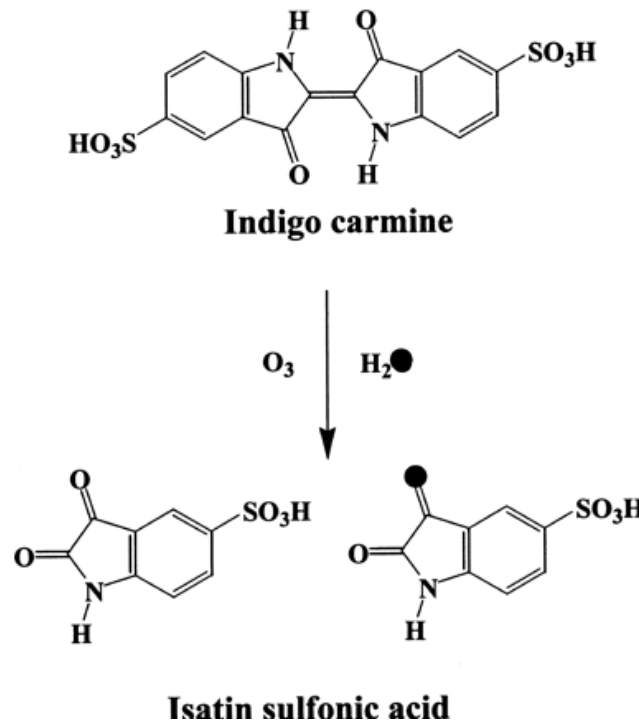


Abbildung 1.4: Schematische Darstellung der Reaktion von Indigokarmin mit Ozon

Die Vorteile dieser Methode bestehen darin, dass sie einfach, schnell, billig und sensitiv ist [56]. Außerdem kann sie während des Versuchs an lebenden Zellen verwendet werden, weil Indigokarmin als nicht toxisch gilt [23; 52].

1.4 *In Vitro* Systeme zur Ozonexposition

Um die zellulären Effekte von Reizgasen wie Ozon zu untersuchen, werden Systeme bevorzugt, welche den Expositionsbedingungen der Lunge *in vivo* möglichst gut entsprechen. Folgende Forderungen sollten bei einer geeigneten Expositionsapparatur erfüllt sein [120]:

- 1) Präzise Kontrolle der Expositionsbedingungen (Gaskonzentration und Gasfluss)
- 2) Intensiver Gas-Zell-Kontakt; das Zellmedium sollte mit dem Gas keine toxischen Effekte hervorrufen
- 3) Flexible Expositionsintervalle, Austrocknung der Zellen muss vermieden werden
- 4) Leichte Entnahme der Zellen für spätere Tests
- 5) Sterile Versuchsbedingungen, um die Zellen auch nachinkubieren zu können

Die entwickelten Systeme unterscheiden sich vor allem darin, ob die Zellen direkt oder indirekt, d. h. über eine Flüssigphase, bzw. apikal oder basal exponiert werden.

Bei der indirekten Exposition befindet sich zwischen dem Zellrasen und dem Gasraum eine (dünne) Flüssigkeitsschicht. Dies hat den Vorteil, dass die Zellen nicht austrocknen und der Gaskontakt eher den natürlichen Gegebenheiten in der Lunge entspricht. Der Nachteil liegt darin, dass das Gas zunächst mit dem Kulturmedium reagieren kann. Außerdem muss das Gas erst physikalisch im Medium gelöst werden, wodurch die Zellen mit einer geringeren Gaskonzentration in Kontakt kommen [106; 155].

Bei der direkten Methode dagegen versucht man den Flüssigkeitsfilm zwischen Zellen und Gas möglichst gering zu halten. Hierfür werden die Zellen entweder durch periodisches Schaukeln immer wieder aus dem Medium gehoben (sog. „roller cultures“ oder „rocking cultures“), oder mittels einer Membran kopfüber montiert.

Pace et al [105; 106] untersuchten sowohl mit einer indirekten als auch mit einer direkten Methode die Toxizität von NO₂ und O₃. Sie verwendeten hierfür modifizierte Glaskolben, welche eine Gasführung über den Zellrasen ermöglichen. Die Zellen wurden entweder kontinuierlich, d. h. ohne Schaukeln, oder periodisch exponiert, indem die Flaschen durch Drehung aus der Ruhelage aus dem Medium auftauchen.

Bolton et al [17] entwickelten ein System mit rotierenden Flaschen. Die Zellen wurden in Rundflaschen gezüchtet, welche mit einem modifizierten Deckel verschlossen wurden, der sowohl den Gaseintritt als auch einen Mediumwechsel ermöglichten. Diese Flaschen wurden um die Längsachse rotiert, wobei immer ein Teil der Zellen mit Medium bedeckt war, was ein Austrocknen

verhindert. Der Rest der Zellen trat direkt mit dem Gas in Kontakt. Der Nachteil dieser Methode besteht darin, dass das Gas mit dem Medium reagieren kann.

Ein weiteres System ist das Exponieren der Zellen in Petrischalen auf einer Plattform in einem hermetischen Inkubator [55]. Die Zellen wurden auf einer Taumelplattform periodisch bewegt, so dass sie direkt dem Gas ausgesetzt waren, aber nicht austrockneten. Der Nachteil hierbei ist die mangelnde Sterilität.

Alink et al [3] dagegen wählten eine Methode mit der das Gas von unten an die Zellen gelangen kann. Hierfür modifizierten sie Petrischalen so, dass der Boden aus einer 25 µm dicken Teflonmembran bestand auf welchen die Zellen ausgesät wurden. Diese Platten wurden dann in einen Inkubator mit Ozonatmosphäre inkubiert. Somit gelangt das Ozon von unten an die Zellen, während sie von oben durch das Medium vor dem Austrocknen geschützt sind. Eine Glasbedeckung der Petrischale sorgte für Sterilität. Die Ozonkonzentration wurde im Medium bestimmt. Dadurch gestaltet sich die Dosimetrie schwierig, da lediglich das Ozon, welches nicht mit den Zellen reagiert hat, bestimmt wird. Zudem variiert die Durchlässigkeit der Teflonmembranen für Ozon stark.

Abschließend soll noch eine Methode mit zweiphasigen Membranen erwähnt werden. Hierbei werden die Zellen auf unterschiedliche Membranen, wie beispielsweise Polysulfon-Membranen [152] oder Polyethylen-Terephthalat-Membranen [124] ausgesät. Die Membranen wurden dann über mit Medium gefüllte Schalen positioniert, so dass die Zellen mittels Kapillarkräften in der Lage sind das Medium aufzusaugen und dadurch nicht austrockneten. Die Zelloberfläche konnte so direkt der Gasatmosphäre ausgesetzt werden. Nachteilig ist hier die aufwendige und teure Konstruktion.

Die für unsere Versuche verwendete Apparatur arbeitet nach der indirekten Methode, besitzt aber den Vorteil, dass auf Spezialgefäße verzichtet wird. Die Exposition erfolgt in gebräuchlichen Zellkulturflaschen. Zudem können viele Gefäße gleichzeitig exponiert werden, was ein flexibles Versuchsprotokoll mit der Möglichkeit fraktionierter Exposition erlaubt. Die indirekte Exposition wurde gewählt, um die Ozonkonzentration besser abschätzen zu können. Die Details des Versuchsaufbaus sind in Abschnitt 2.5 aufgeführt.

1.5 Fragestellungen der Arbeit

Zunächst sollte die Frage geklärt werden, ob die in der Arbeit beschriebene Expositionsapparatur, die bislang für Untersuchungen von nitrosen Gasen benutzt wurde, auch für die Exposition von isolierten Zellen gegenüber Ozon geeignet ist. Hierfür sollte eine Evaluation der Versuchsapparatur durchgeführt werden und ein geeigneter Indikator für die Bestimmung der Ozonkonzentration im umgebenen Medium gefunden werden.

Anschließend sollte die Toxizität von Ozon bei zwei verschiedenen Zelllinien (A549 und L929) mit Hilfe verschiedener Endpunkte untersucht werden. Es sollte geklärt werden, welche Parameter für die Untersuchung der Ozonwirkung geeignet sind und ob sich Unterschiede in der Sensitivität feststellen lassen. Außerdem sollte geklärt werden, ob sich A549 und L929 Zellen in ihrer Empfindlichkeit gegenüber Ozon unterscheiden.

Zuletzt sollte geprüft werden, ob die Schäden reversibel und die Zellen in der Lage sind, sich spontan zu erholen.

2 Material und Methoden

2.1 Bezugsquellen für Chemikalien und Gase

Soweit nicht anders angegeben, wurden alle Chemikalien von der Firma Merck (Darmstadt) bezogen. Im Folgenden sind Chemikalien aufgeführt die anderweitig bestellt wurden.

Carbogen Gas	Linde, München
Glutathion-Reduktase, NADH/H ⁺	Roche Applied Science, Mannheim
GSSG, DTNB	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Indigokarmin, Trypanblau,	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Neutralrot	Serva Feinbiochemika, Heidelberg
Cell Proliferation Kit II	Roche Applied Science, Mannheim
ATPlite kit	Roche Applied Science, Mannheim

2.2 Verwendete Geräte

Ozongenerator Ozomat COM SC HF4	Anseros GmbH, Tübingen
Ozonanalysator Ozomat MP	Anseros GmbH, Tübingen
Zytostatika Werkbank Typ C-Max 190	Brenner International GMBH, Elmshorn
CO ₂ -Brutschrank für die Expositions-kammer TypB 5060 EC-CO ₂	Heraeus, Hanau
CO ₂ -Brutschrank Hera-cell 240	Heraeus, Hanau
Zentrifuge Rotanta/RP	Hettich, Tuttlingen
Lichtmikroskop Axiovert 35M	Zeiss, Oberkochen
Spektralphotometer LKB-Biochrom 4060	Pharmacia, Freiburg
Mikrotiterplattenleser Wallac 1420 Victor2	Perkin Elmer, Rodgau-Jügesheim
Rasterelektronenmikroskop JSM 35	Jeol, J-Tokyo
Rodinal®	Agfa, München

2.3 Zellkultur

2.3.1 Verwendete Zellen

Alle Experimente wurden mit A549 Zellen und mit L929 Zellen durchgeführt. Beide Zelllinien wurden von der American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA) bezogen und identisch behandelt.

A549 Zellen stammen von einem Lungenkarzinompatienten und dienen als Modell für Typ-II-Alveolarepithelzellen [118; 119; 24].

L929 Zellen sind Mausfibroblastenzellen [63].

2.3.2 Kultivierungsbedingungen

Die Zellanzucht erfolgte in 80 cm² Standardkulturflaschen (Nunc, Wiesbaden) mit DMEM-F12 Medium, ergänzt mit 10% fötalem Kälberserum, Penicillin (100 µg/mL) und Streptomycin (50 µg/mL) bei 37°C und 8,5% CO₂.

Zur Vermehrung wurden die Zellen mit 5 mM Trypsin-EDTA-Lösung abgelöst, zweimal mit Medium gewaschen und in Flaschen ausgesät.

2.3.3 Stammhaltung und Konservierung

Die Konservierung der L929 und A549 Zellen wurde durch Resuspendieren der Zellen in Kryomedium und anschließender Lagerung zunächst bei -20°C, dann bei -80°C und schließend in flüssigem Stickstoff erreicht. Wurden erneut Zellen benötigt, so wurden die konservierten Zellen aufgetaut, 2-mal mit Medium gewaschen und kultiviert.

Kryomedium

Fötales Kälberserum	20 mL
DMSO	10 mL
DMEM-F12	ad 100 mL

2.3.4 Zellzahlbestimmung

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte in einer Neubauer-Zählkammer. Es wurden jeweils 4 Quadranten mit einem Volumen von je 0,1 µL unter dem Lichtmikroskop ausgezählt und daraus der Mittelwert berechnet. Multipliziert man den Mittelwert mit 10⁴ so erhält man die Zellzahl/mL

2.3.5 Nährmedien und Pufferlösungen

Dulbecco's Modified Eagle/Ham F12 Medium (DMEM-F12 1:1 mix, Fa. Life-Technologies, Eggenstein)

Fötale Kälberserum (Fa. Life-Technologies, Eggenstein)

Hanks's Balanced Salt Solution (HBSS, Fa. Life-Technologies, Eggenstein)

Penicillin/Streptomycin (Fa. Life-Technologies, Eggenstein)

Trypsin-EDTA-Gemisch (Fa. Life-Technologies, Eggenstein)

Indigokarmin-Stammlösung (1 mM in HBSS, sterilfiltriert, bei 4°C maximal eine Woche gelagert)

2.4 Rasterelektronenmikroskopie

Für Untersuchungen der Zellen mit dem Rasterelektronenmikroskop wurden die Zellen auf Deckgläsern oder Visking®-Folie angezogen. Am Ende des Versuchs wurden sie 24 Stunden in Glutaraldehyd (2,5% v/v in 0,1 M Kakodylatpuffer, pH 7,4) fixiert. Der Glutaraldehyd wurde dann sorgfältig mit 0,9% NaCl-Lösung ausgewaschen. Anschließend wurde die Präparate in einer aufsteigenden Alkoholreihe (15, 30, 60, 85, 95, 100%) entwässert und in einer Kritisch-Punkt-Trocknungsanlage nach Austausch des EtOH gegen CO₂ getrocknet. Die getrockneten Präparate wurden mit kolloidalem Graphit auf Al-Probenhalter montiert und zuerst mit Kohle (ca. 10 nm) und dann mit Gold (ca. 25 nm) in Ar-Atmosphäre (ca. 0,1 mbar) bedampft. Die mikroskopische Untersuchung erfolgte mit einem Rasterelektronenmikroskop im Sekundärelektronen-Modus bei 25 kV und kurzem Fensterabstand. Für die Fotoaufnahmen wurde Agfapan 100 Rollfilm 120 benutzt. Das Negativmaterial wurde mit Rodinal® entwickelt.

2.5 Ozonexposition

2.5.1 Vorbereiten der Zellen

48 Stunden vor dem Experiment wurden die Zellen durch die Einwirkung von Trypsin-EDTA (5 mM)-Lösung abgelöst, zweimal mit DMEM-F12 gewaschen und auf die benötigte Anzahl 25 cm² Standardkulturflaschen verteilt. Die konfluent gewachsenen Zellen wurden unmittelbar vor dem Versuch mit HBSS gewaschen und mit jeweils 4 mL 100 µM Indigokarminlösung bedeckt.

2.5.2 Ozongenerierung und Messung

Ozon wurde aus Carbogen® Gas (95% O₂ + 5% CO₂) in einem Ozongenerator mittels gepulster Hochspannung in einer Gasentladungsröhre generiert. Die Kontrolle der Ozonkonzentration erfolgte über einen angeschlossenen Analysator photometrisch bei 253,7 nm.

2.5.3 Expositionskammer

Die verwendete Expositionsapparatur wurde 1998 von Mückter et al [100] beschrieben. Sie besteht aus drei separaten Teilen:

- (1) der Gasmischeinheit (GM), in der Testgas und Trägergas im gewünschten Verhältnis gemischt werden und die gewünschte Flussgeschwindigkeit (300 mL/min) eingestellt wird. Dies war im vorliegenden Fall nicht nötig, da das Carbogen direkt über eine Wirbelkammer zum Ozongenerator (Abschnitt 2.5.2) weitergeleitet wurde. Vom Ozongenerator gelangt das Gas über eine Reihe von Waschflaschen, die der Anfeuchtung des Gases dienen, zu einem Verteilerkreuz und von dort zu den drei Plattformen der Expositionskammer.
- (2) der Expositionskammer (EC), welche in einem Standardinkubator bei 37°C und Wasserdampfsättigung untergebracht ist. Hier findet die Begasung der Zellen statt. Die kultivierten Zellen sind in 25 mL Standardzellkulturflaschen auf 3 parallelen Plattformen verteilt, wobei jeweils 4 Flaschen pro Plattform in Serie geschaltet sind. Jede Plattform verfügt über eine eigene Zu- und Ableitung und jede Flasche kann manuell entweder dem Testgasstrom („in-line“) oder der Inkubatoratmosphäre bzw. einem zweiten Gasstrom („off-line“) ausgesetzt werden. Bei den hier vorliegenden Versuchen wurden die Flaschen der mittleren Plattform „off-line“ geschaltet und dienten als Kontrolle.
- (3) der Reduziereinheit (RM), welche der EC nachgeschaltet ist und der Kontrolle des Gasflusses dient. Sie besteht aus drei Rotametern, die mit Nadelventilen ausgestattet sind. Durch die Nadelventile kann ein gleichmäßiger Gasfluss auf allen drei Plattformen gewährleistet werden. Von der Reduziereinheit aus gelangt der Gasstrom zur Verringerung des Feuchtigkeitsgehalts über eine eisgekühlte Kühlfalle in das Ozonmessgerät (Abschnitt 2.5.2) und von dort nach Zerstörung restlicher Ozonanteile in den Abzug.

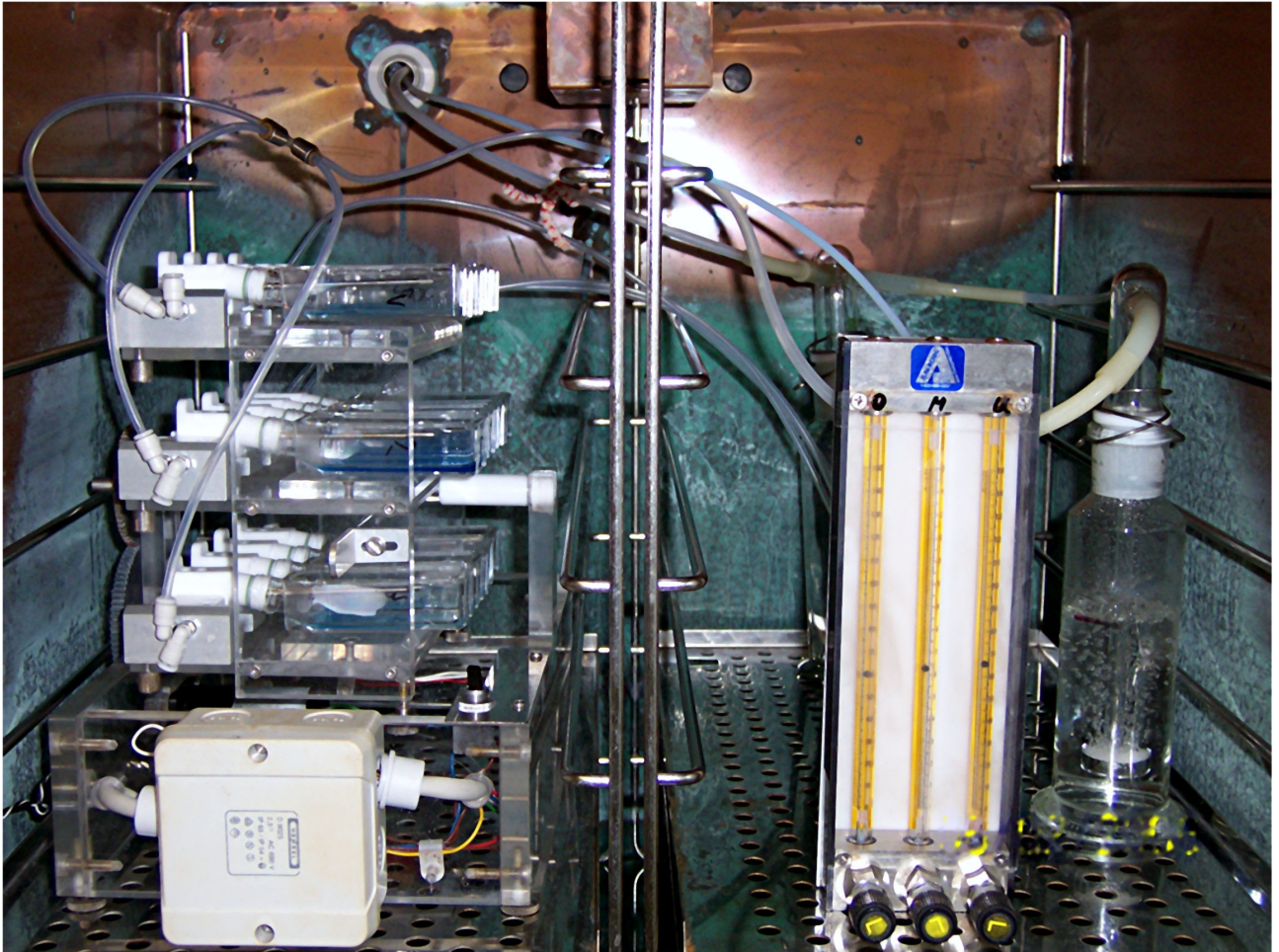


Abbildung 2.1: Bild der Expositionskammer

2.6 Biochemische Tests

2.6.1 Bestimmung der Zellaktivität

Die Bestimmung der Zellaktivität erfolgte mit Hilfe des Cell Proliferation Kit II. Sie beruht auf einer Reduktion des Tetrazoliumsalzes XTT durch mitochondriale Dehydrogenasen zu einem Formazan in Gegenwart von NAD(P)H [99].

Die Zellen wurden in einer Konzentration von $3 \cdot 10^4$ Zellen/mL ausgesät. Nach 48 h erfolgte eine 24stündige Inkubation mit Indigokarmin bzw. ozoniertem Indigokarmin in verschiedenen Konzentrationen. Die Bestimmung des Formazangehalts erfolgte wie vom Hersteller angegeben. Nach einer Inkubationszeit von 4 h wurde die Formazanbildung photometrisch in einem Mikrotiterplattenleser bestimmt.

2.6.2 Glutathionbestimmung

Der intrazelluläre Glutathiongehalt wurde mit einem Tietze Assay bestimmt [140] modifiziert nach Eyer [42]. Reduziertes Glutathion (GSH) reagiert mit DTNB zu oxidiertem Glutathion (GSSG) und 2-Nitro-thiobenzoat, das bei einer Wellenlänge von 412 nm photometrisch bestimmt werden kann. Das GSSG wiederum wird durch die Glutathion-Reduktase (GR) unter Verbrauch von NADPH/H⁺ zu GSH reduziert. Je mehr Glutathion vorhanden ist, desto schneller färbt sich der Reaktionsansatz gelb.

Die Stammlösungen wurden jeden Tag frisch in Kaliumphosphatpuffer (KPP), der 1 mM EDTA enthielt, angesetzt. Die Zellen wurden mit 2 mL eiskalter 0,33 N HClO₄ 30 min bei 4°C aufgelöst und 200 µL des Überstands durch 20 µL eines Triethanolamin/KPP-Gemisches (1:1) neutralisiert.

Der Reaktionsansatz wurde wie folgt in eine Küvette pipettiert:

Reaktionsansatz

KPP (0,1M, pH 7)	850 µL
Probe	50 µL
NADPH/H ⁺ (4,1 g/mL)	50 µL
DTNB (1,5 g/mL)	20 µL

Die Reaktion wurde durch Zugabe von 30 µL GR (20 U/mL) gestartet und die Extinktionsänderung bei 412 nm gemessen.

Die Bestimmung der Glutathionmenge erfolgte mittels einer mitgeführten GSX-Eichkurve. Hierfür wurde aus einer 250 µM GSSG-Stammlösung durch entsprechende Verdünnung mit 0,33 N Perchlorsäure 1, 3, 10, 30 und 100 µM Standardlösungen hergestellt und diese wie die Proben bearbeitet.

2.6.3 Bestimmung des ATP-Gehalts

Die Bestimmung des ATP-Gehalts erfolgte bioluminometrisch mit Hilfe des ATPlite kits [75].

Nach der Exposition wurden die Zellen mittels 5 M Trypsin-EDTA-Lösung abgelöst, zweimal mit HBSS gewaschen und in der Zählkammer ausgezählt. Die Zellzahl wurde auf $3 \cdot 10^5$ Zellen/mL eingestellt und in jedes „well“ 100 µL Zellsuspension und 50 µL der TCA-Lösung gegeben. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 50 µL Luciferase gestartet und sofort im Mikrotiterplattenleser gemessen. Die Kalibration erfolgte durch eine mitgeführte ATP-Eichkurve.

2.6.4 Farbstofftests

2.6.4.1 Trypanblau-Test

Der Farbstoff Trypanblau kann bei gesunden Zellen nicht in das Zellinnere gelangen, während sich geschädigte Zellen blau färben. Er ist somit geeignet, die Zahl der geschädigten Zellen zu bestimmen [139].

Hierfür wurden die Zellen nach der Exposition abgelöst, gewaschen und in HBSS resuspendiert. 360 μL der Zellsuspension wurden mit 270 μL temperierter Trypanblaulösung versetzt. Der Ansatz wurde gut durchmischt und die Anzahl der gefärbten Zellen unter dem Mikroskop bestimmt.

Trypanblaulösung

Trypanblau	0,5 g
NaCl	0,9 g
H ₂ O _{demin}	ad 100 mL

Die Lösung wurde sterilfiltriert (Minisart, 0,2 μm Porengröße, Sartorius) und bei 4°C gelagert.

2.6.4.2 Neutralrot-Test

Neutralrot wird nur von vitalen Zellen aufgenommen, wogegen geschädigte Zellen nicht angefärbt werden. Mit diesem Farbstoff kann man die Zahl der vitalen Zellen bestimmen [44].

Hierfür wurde nach erfolgter Exposition das Medium abgesaugt, die Zellen mit HBSS gewaschen und mit 2 mL temperierter Neutralrotlösung bedeckt. Nach einer 3stündigen Inkubation bei 37°C wurden die Zellen zweimal mit HBSS gewaschen und mit 2 mL Ethanol-Eisessiglösung (50% Ethanol, 1% Eisessig) versetzt, um den Farbstoff zu extrahieren. 100 μL des Überstands wurden in ein well einer 96-well Platte gegeben und die Extinktion bei 540 nm bestimmt.

Neutralrotlösung

Neutralrot	2,5 mg
HBSS	ad 50 mL

Die Lösung wurde sterilfiltriert und bis zu einer Woche bei 4°C im Dunkeln gelagert.

2.6.4.3 Bestimmung der Koloniebildungseffizienz

Um die Proliferationsaktivität der Zellen zu bestimmen, wurde die Koloniebildungseffizienz abgeschätzt.

Hierfür wurde nach der Exposition die Zellzahl quantifiziert und 500 Zellen in eine 25 mL Standardzellkulturflasche ausgesät. Nachdem die Zellen eine Woche bei 37°C inkubiert worden waren, wurden die Kolonien ausgezählt [116].

2.6.5 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung erfolgte nach der Biuret-Methode [11]. Sie beruht auf der (Um)komplexierung der Kupferionen eines Cu-Tartrat-Komplexes durch Peptide, was zu einer intensiven Blaufärbung führt.

Hierzu wurden 2 mL Biuret-Reagenz zu dem trockenen Zellrasen gegeben, die Ansätze 30 min lang bei 37°C inkubiert und anschließend die Extinktion bei 546 nm gemessen. Als Leerwert wurde die Biuret-Lösung verwendet. Die Kalibration erfolgte mit Rinderserumalbumin.

Biuret-Reagenz

CuSO ₄	1,5 g
KNaTartrat	4,5 g
NaOH	4,0 g
KJ	2,5 g
H ₂ O _{demin}	ad 500 mL

2.7 Statistik

Die in den Diagrammen dargestellten Ergebnisse sind Mittelwerte; die Tabellen mit den Einzelwerten sind dem Anhang zu entnehmen. Aus den Einzeldaten wurden Mittelwerte und Standardabweichungen der jeweiligen Gruppe berechnet. Für paarweise Vergleiche zweier Mittelwerte bei kontinuierlicher Verteilung wurde der t-Test für gepaarte Stichproben angewendet. Als Signifikanzgrenze für die Irrtumswahrscheinlichkeit wurde $p \leq 0,05$ festgesetzt. Zur besseren Unterscheidung von knapp oder hoch signifikanten Resultaten wurde nach Sachs folgende Symbolik verwendet

[125]: *	$0,05 \geq p > 0,01$
**	$0,01 \geq p > 0,001$
***	$0,001 \geq p$

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

3 Ergebnisse

3.1 Die Versuchsanordnung

3.1.1 Schäden an der Expositions-kammer durch Ozonexposition

Für die vorliegenden Untersuchungen wurden nach Pilotversuchen einige Bauteile der Apparatur durch beständigere Materialien wie PTFE oder EPDM ersetzt. Bei einigen Bauteilen war es allerdings nicht möglich, ozonbeständiges Material zu bekommen. Diese wurden daher täglich überprüft und gegebenenfalls ersetzt, so dass die Dichtigkeit der Apparatur zu jedem Zeitpunkt gewährleistet war. Abbildung 3.1 zeigt die typischen Schäden, welche durch die Ozonexposition auftraten.

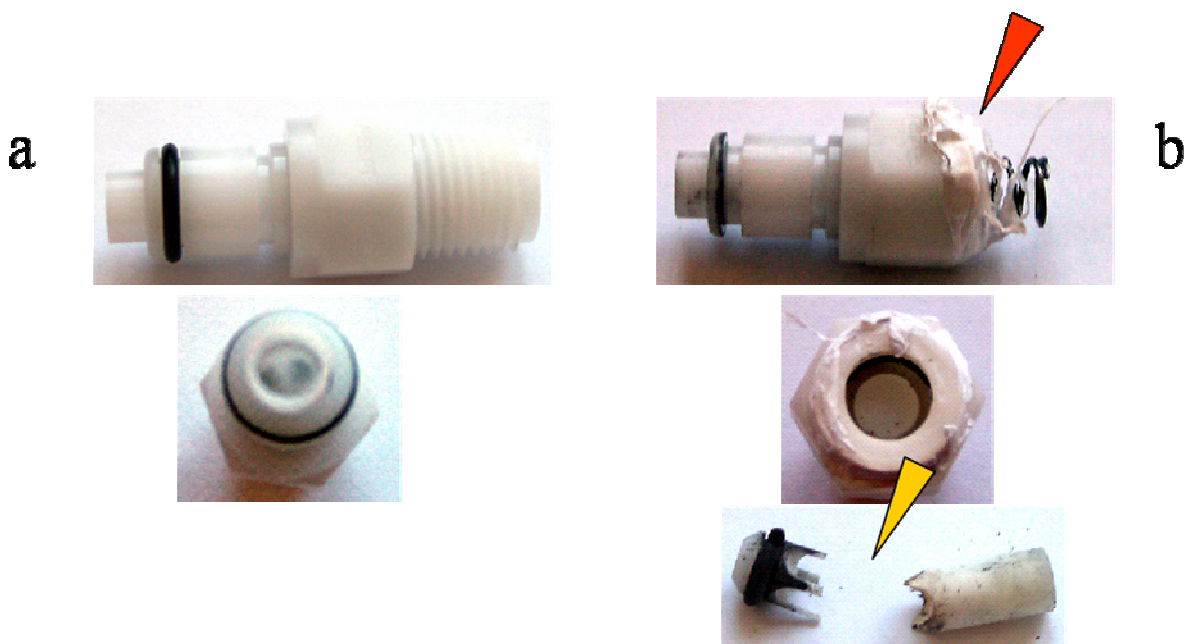


Abbildung 3.1: Schäden an der Ozonapparatur: a zeigt das unbeschädigte Originalteil. In b ist dasselbe Teil nach etwa 3 monatiger Nutzungsdauer dargestellt. Die Pfeile markieren die Bruchstellen

In den Bildern ist das von Ozon angegriffene Plastik zu sehen, dessen Korrosion schließlich zum Bruch führte (roter Pfeil). Auch das Innere des Bauteils ist gebrochen (gelber Pfeil). Die abgebildeten Bauteile befanden sich zwischen Expositions-kammer und Rotameter.

3.1.2 Charakterisierung der Versuchsanordnung

Um das Verhalten von Ozon in der Expositionsapparatur zu überprüfen, wurden Versuche durchgeführt, durch welche der Ozonzerfall in der Apparatur bestimmt werden sollte. Zudem wurde die Äquilibrierungszeit, sowie die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse mit der Versuchsanordnung untersucht. 12 Standardzellkulturflaschen, sowohl mit als auch ohne Zellen wurden mit 4 mL 100 μ M Indigokarminlösung versetzt und die Ozonkonzentration am Analysator im Kurzschluss und nach Durchlaufen der Apparatur gemessen. Die mittlere Plattform wurde nicht in den Ozonstrom gestellt, da sie in späteren Versuchen ebenfalls als Kontrolle dienen sollte. Die schematische Versuchsanordnung ist in Abbildung 3.2 dargestellt.

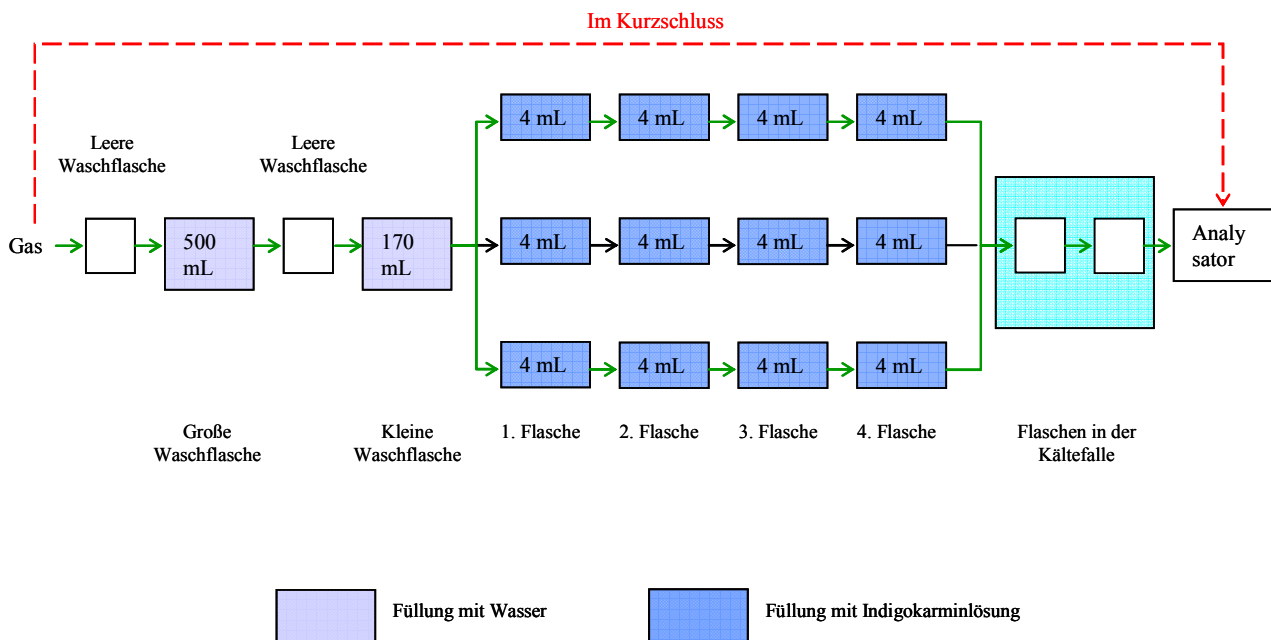


Abbildung 3.2: Pfad des Testgases durch die Expositions-kammer. Angegeben sind jeweils die Flüssigkeitsvolumina, mit denen sich das Ozongas auf dem Weg zum Analysator ins Gleichgewicht setzt.

Es wurde im Kurzschluss eine Ozonkonzentration von etwa 700 ppm eingestellt. Anschließend wurde der Gasstrom über die Apparatur geleitet und die Ozonkonzentration am Analysator im Verlauf der Zeit abgelesen. Nach 4 Stunden wurde abermals die Ozonkonzentration im Kurzschluss bestimmt. Das Ergebnis ist in Abbildung 3.3 dargestellt.

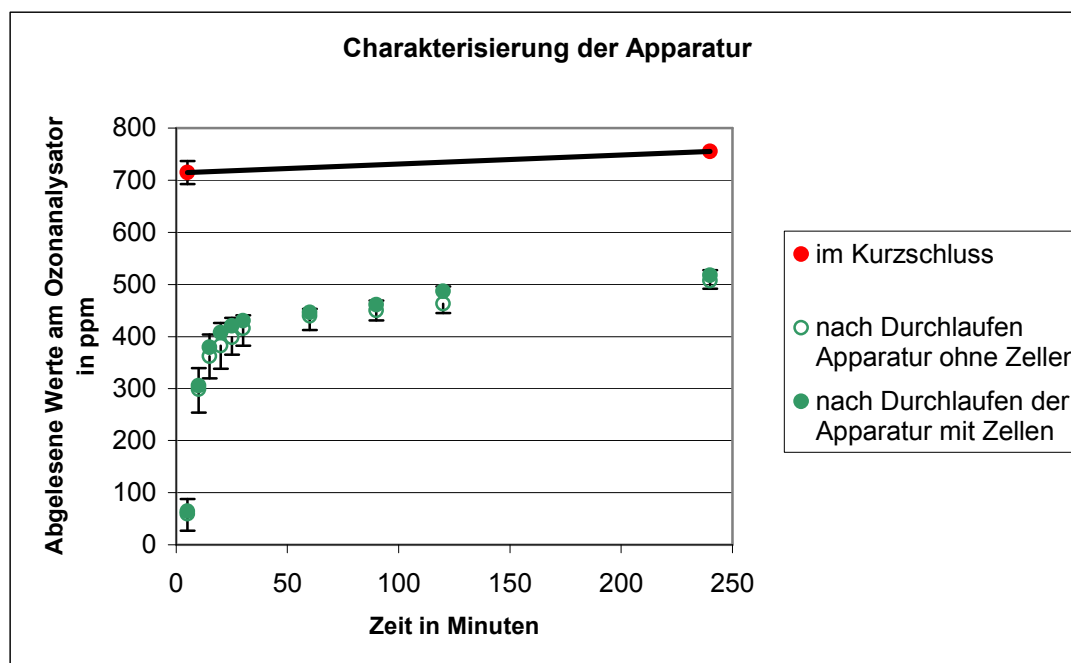


Abbildung 3.3: Charakterisierung der Ozonapparatur: Versuche mit A549 und L929 Zellen bzw. Zellfreie Versuche mit 4 mL 100 μ M Indigokarminlösung (in HBSS). Abgelesene Werte am Ozonanalysator im Kurzschluss bzw. nach Leiten des Gasstroms über die Apparatur. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 9 unabhängigen Versuchen + bzw. - Standardabweichung.

Aus Abbildung 3.3 ist ersichtlich, dass die Äquilibrierungszeit etwa 15 Minuten beträgt. Tatsächliche „steady-state“ Bedingungen wurden allerdings nicht erreicht, da die Ozongenerierung durch den Generator im Laufe der 4 Stunden leicht ansteigt. Die relativ niedrige Standardabweichung zeigt, dass die Versuche gut reproduzierbar sind und nur geringe Schwankungen von einem Versuch zum anderen auftraten. Innerhalb der Apparatur zerfällt 33,7% (\pm 2,6%) des eingesetzten Ozons. Hierbei ist es interessant, dass das meiste Ozon durch die Apparatur selbst zerfällt und nicht mit den Zellen reagiert. Sind Zellen anwesend zerfällt nicht mehr Ozon als wenn keine Zellen anwesend sind.

3.2 Indigokarmin als Ozonindikator

Zunächst sollte untersucht werden ob Indigokarmin dazu geeignet ist, als Indikator für die tatsächliche Ozonkonzentration zu dienen. Indigokarmin wurde von verschiedenen Autoren zur Messung der Ozon-Konzentration bei Zellversuchen eingesetzt, da es die Zellen offenbar nicht schädigt, gut in Wasser löslich ist und stöchiometrisch mit Ozon reagiert.

3.2.1 Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten des Zerfalls von Indigokarmin

Zunächst wurde die Geschwindigkeitskonstante des Ausbleichens von Indigokarmin durch Ozon im zellfreien System in der 1. und 4 Flasche einer Plattform (Abbildung 3.2) experimentell bestimmt. Hierfür wurde eine 100 μM Indigokarminlösung mit 0,100% w/w Ozon begast und nach verschiedenen Zeitpunkten Proben genommen. Anschließend wurde die Extinktion bei 610 nm gemessen und der natürliche Logarithmus der Extinktion gegen die Zeit aufgetragen.

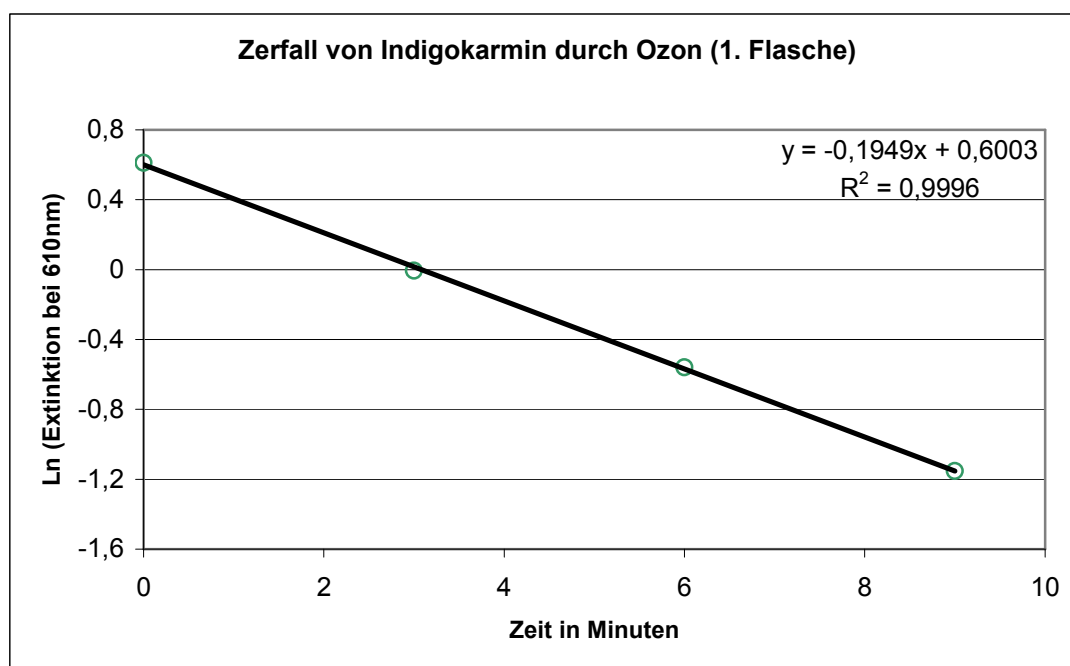


Abbildung 3.4: Geschwindigkeit des Ausbleichens von Indigokarmin bei 0,100% w/w Ozon in der 1. Flasche: Zellfreier Versuch mit 0,100% w/w Ozon. Dargestellt ist der Ln der Extinktion bei 610 nm einer 100 μM Indigokarminlösung nach 0, 3, 6, und 9 minütiger Exposition. Angegeben sind die Mittelwerte aus 5 unabhängigen Versuchen

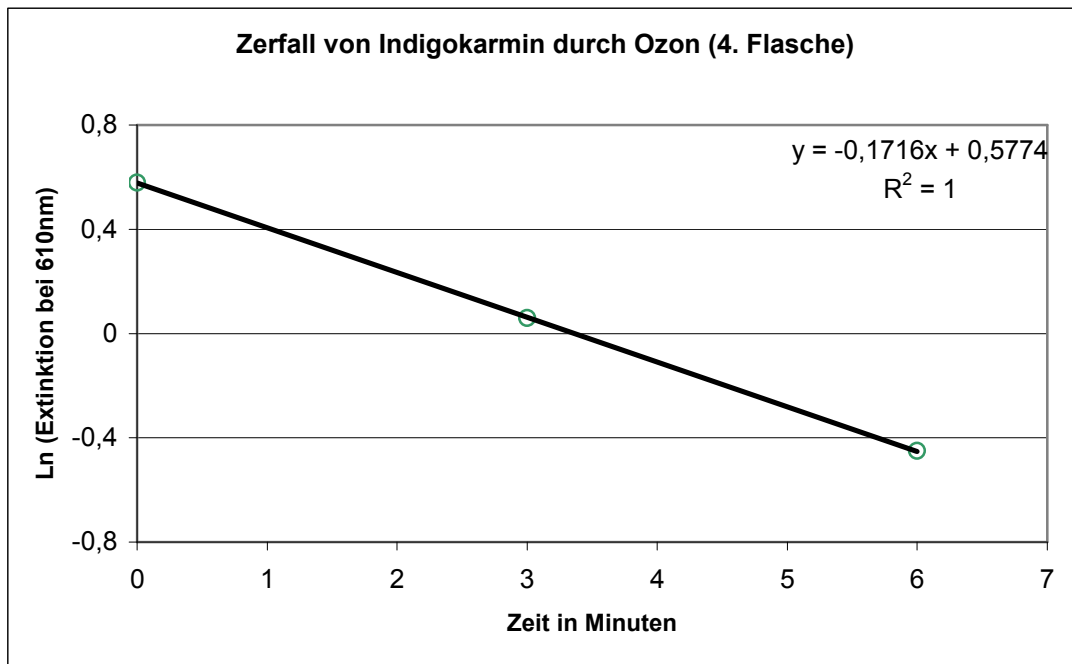


Abbildung 3.5: Geschwindigkeit des Ausbleichens von Indigokarmin bei 0,100% w/w Ozon in der 4. Flasche: Zellfreier Versuch mit 0,100% w/w Ozon. Dargestellt ist der Ln der Extinktion bei 610 nm einer 100 μ M Indigokarminlösung nach 0, 3, und 6 minütiger Exposition. Angegeben sind die Mittelwerte aus 5 unabhängigen Versuchen

Zur besseren Übersicht sind die Geschwindigkeitskonstanten mit den Standardabweichungen in Tabelle 3.1 dargestellt.

Tabelle 3.1: Geschwindigkeitskonstanten des Ausbleichens von Indigokarmin in den Flaschen

	1. Flasche	4. Flasche
Geschwindigkeitskonstante	$-0,1949 \pm 0,0034$	$-0,1716 \pm 0,0090$

Aus den Geschwindigkeitskonstanten ist ersichtlich, dass bei der 4. Flasche nur noch etwa 88% der Ozonkonzentration, die in der 1. Flasche vorlag ankommt. Dieser Wert wird auch zur Abschätzung der tatsächlichen Ozonkonzentrationen benötigt.

Um Indigokarmin zur Abschätzung der tatsächlichen Ozonkonzentration verwenden zu können, ist es von Vorteil, wenn das Ausbleichen des Farbstoffs durch die Zellen vernachlässigbar langsam geschieht. Deshalb wurde zunächst die Geschwindigkeitskonstante des Ausbleichens ohne Ozon für beide Zelllinien bestimmt. Hierfür wurden die Zellen mit 100 μ M Indigokarminlösung inkubiert und nach 0,5, 1, 2, 4 und 24 Stunden Proben genommen und im Photometer bei 610 nm vermessen.

Abbildung 3.6 zeigt den Ln der Extinktion gegen die Zeit.

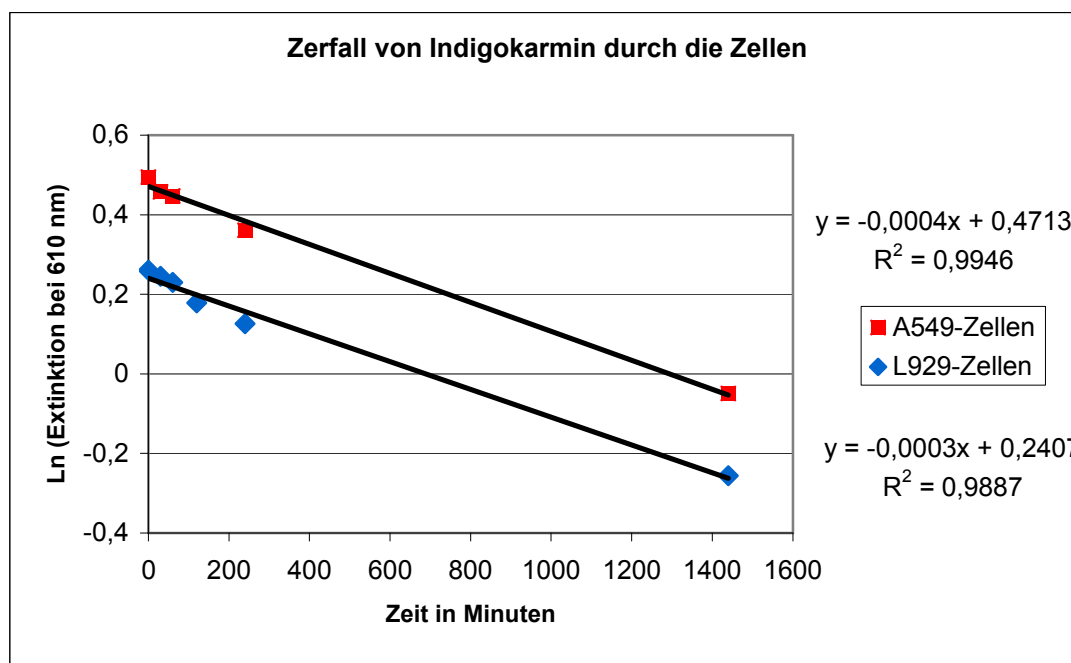


Abbildung 3.6: Ausbleichen des Indigokarmins im Verlauf der Zeit: A549 bzw. L929 Zellen wurden mit 4 mL einer 100 μ M Indigokarminlösung (in HBSS) inkubiert und die Extinktion bei 610 nm nach 0, 0,5, 1, 2, 4 und 24 min Inkubation gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 5 bzw. 3 unabhängigen Versuchen.

Die Konzentration des Indigokarmins nimmt zwar bei den A549 Zellen etwas ab, allerdings ist die Geschwindigkeitskonstante mit $-0,0004 \pm 0,00008$ klein. Auch bei den L929 Zellen bleicht das Indigokarmins im Verlauf der 24 Stunden zwar etwas aus, die Geschwindigkeitskonstante ist mit $-0,0003 \pm 0,00005$ ebenfalls klein.

Da das Ausbleichen des Indigokarmins ohne Ozon nur sehr langsam vonstatten geht, fällt es bei der Abschätzung der tatsächlichen Ozonkonzentration bei einer Versuchsdauer von 4 Stunden nicht ins Gewicht.

3.2.2 Toxizität von Indigokarmin

Weder Indigokarmin noch die Produkte der Reaktion mit Ozon sollten toxisch wirken. Um dies abzuklären wurde zuerst ein XTT-Test (Abschnitt 2.6.1) mit verschiedenen Indigokarminkonzentrationen durchgeführt. Abbildung 3.7 zeigt das Ergebnis des XTT-Tests bei den entsprechenden Zelllinien.

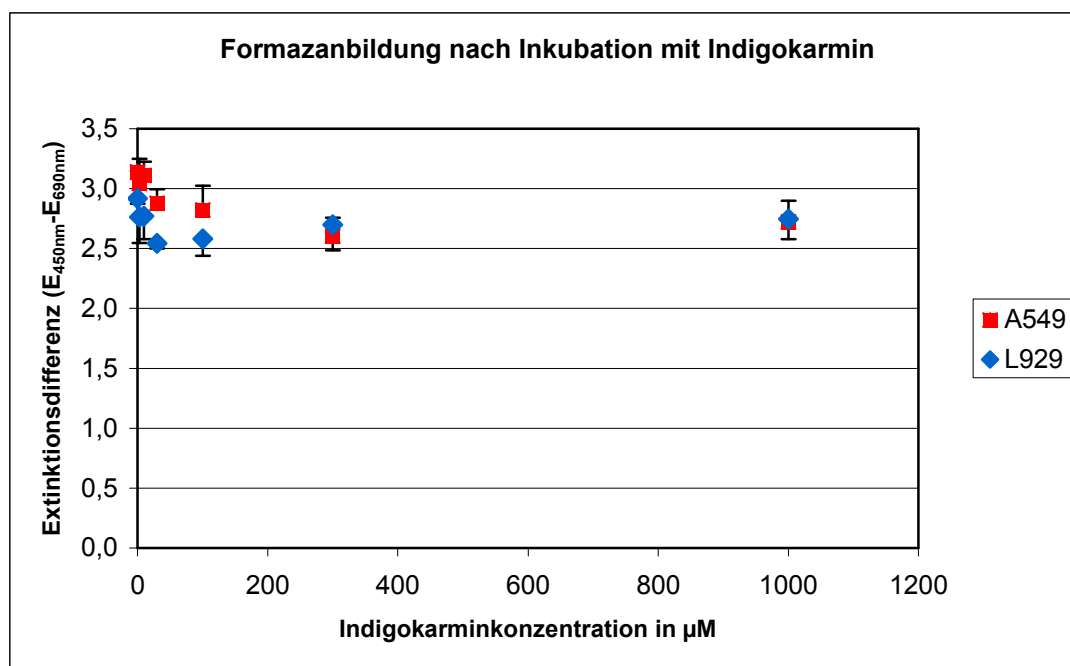


Abbildung 3.7: Formazanbildung der Zellen nach Inkubation mit Indigokarmin: A549 bzw. L929 Zellen wurden in 96-well Platten ausgesät und 24 Stunden mit 0, 3, 10, 30, 100, 300, 1000 μM Indigokarminlösung (in HBSS) inkubiert. Nach Reduktion des XTT zum Formazan wurde die Differenz der Extinktion bei 450 nm und 690 nm bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 6 wells eines unabhängigen Versuchs + bzw. – Standardabweichung.

Sowohl die A549 Zellen, als auch die L929 Zellen, zeigten bei keiner der geprüften Indigokarminkonzentrationen Anzeichen einer Zellschädigung.

Um zu überprüfen, ob die Ozonierungsprodukte von Indigokarmin toxisch wirken wurde eine 10 mM Indigokarminlösung in Wasser 4 Stunden bei 0,1% w/w Ozon exponiert. Von dieser Stammlösung wurde anschließend eine Verdünnungsreihe mit HBSS hergestellt und in einem XTT-Test auf Toxizität überprüft. Das Ergebnis ist in Abbildung 3.8 dargestellt.

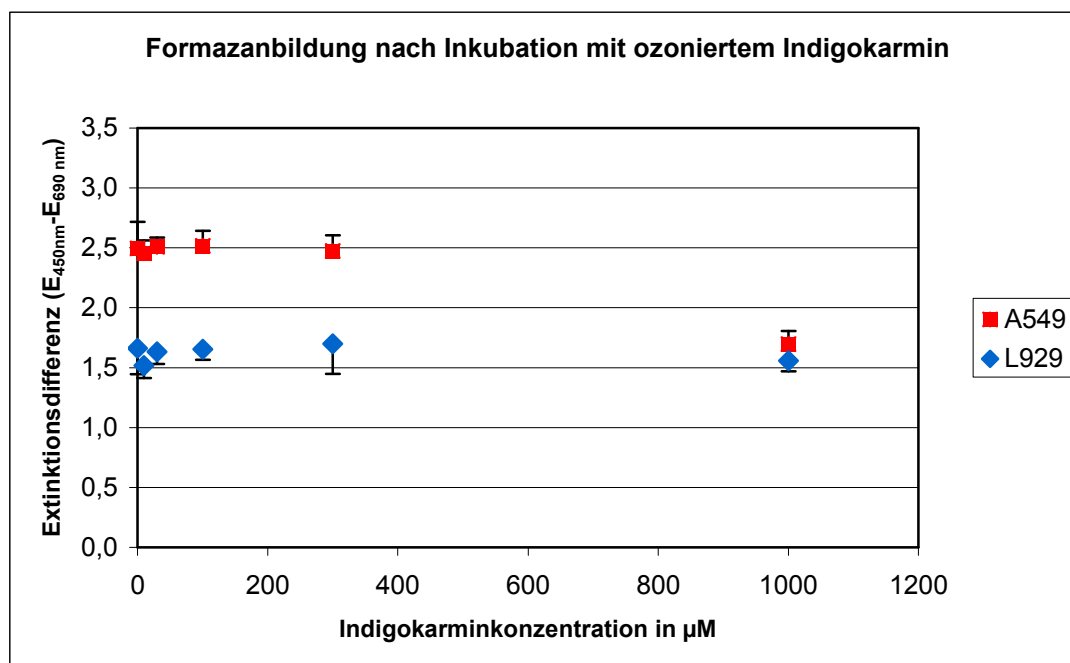


Abbildung 3.8: Formazanbildung der Zellen nach Inkubation mit ozoniertem Indigokarmin

(0,1% w/w Ozon): 10 mM Indigokarminlösung (in Wasser) wurde 4 Stunden mit 0,100% w/w Ozon inkubiert. Die Lösung wurde anschließend mit HBSS auf 3, 10, 30, 100, 300 und 1000 μM verdünnt und A549 bzw. L929 Zellen damit 24 Stunden inkubiert. Nach Reduktion des XTT zum Formazan wurde die Differenz der Extinktion bei 450 nm und 690 nm bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 6 wells eines unabhängigen Versuchs + bzw. – Standardabweichung.

Bei den A549 Zellen zeigt lediglich eine Konzentration von 1 mM ozonierter Indigokarminlösung eine geringe Toxizität. Da die für die Versuche verwendete Konzentration bei 100 μM liegt, sollte dies aber kein Problem darstellen.

Bei den L929 Zellen wirkt sogar eine Konzentration von 1 mM nicht toxisch.

Abschließend konnte festgestellt werden, dass weder Indigokarmin noch seine Ozonierungsprodukte in einem Bereich von 10-300 μM toxisch wirkten. Der Spontanzerfall von Indigokarmin im relevanten Zeitraum von 4 Stunden war sehr gering.

3.3 Abschätzung der tatsächlichen Ozonkonzentration

Für die Abschätzung der tatsächlich in den Flaschen vorliegenden Ozonkonzentration konnte davon ausgegangen werden, dass die 4. Flasche in der Gasphase mindestens die Ozonkonzentration, die am Analysator nach Durchlaufen der Apparatur gemessen wurde, bekommt (520 ppm bei eingestellten 715 ppm). Die Konzentration in der 1. Flasche wurde mithilfe des Verhältnisses der Geschwindigkeitskonstanten für das Ausbleichen von Indigokarmin der 1. und 4. Flasche ermittelt. Da die Geschwindigkeitskonstante in der 4. Flasche nur 88% der in der 1. Flasche gemessenen betrug, war die Ozonkonzentration in der 1. Flasche um den Faktor 1,14 größer (590 ppm). In Abbildung 3.9 sind die rechnerisch ermittelten Ozonkonzentrationen in ppm schematisch dargestellt. Da die mittlere Plattform bei allen Versuchen als Kontrolle diente und nicht von Ozon durchströmt wurde, betrug hier die Ozonkonzentration 0.

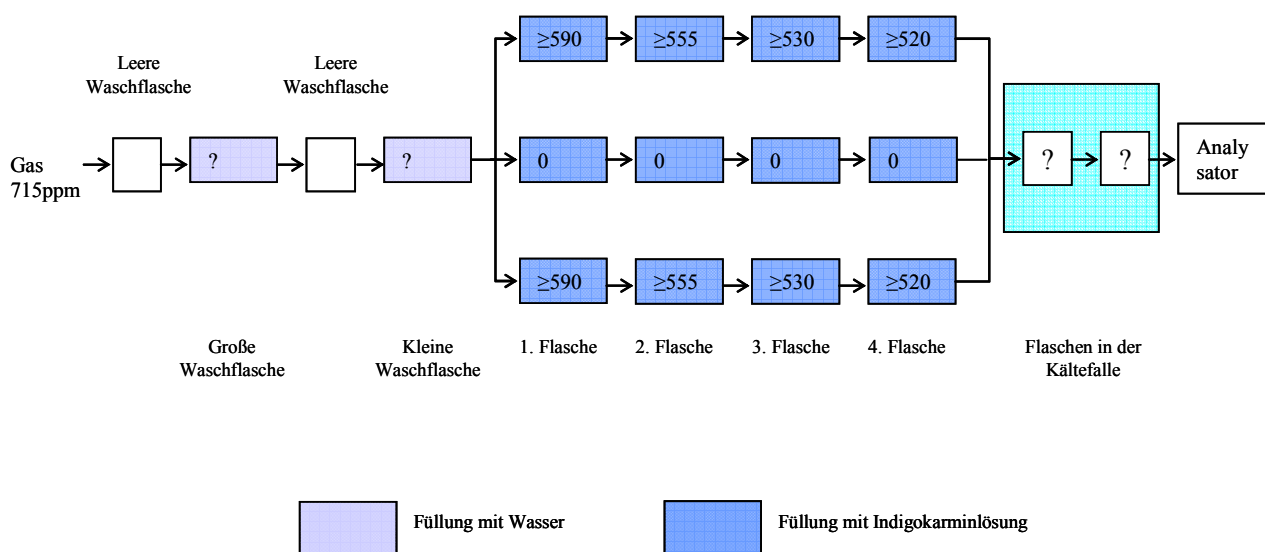


Abbildung 3.9: Rechnerisch ermittelte Ozonkonzentrationen in ppm

Wie in der Abbildung 3.9 zu sehen beträgt der Unterschied der Ozonkonzentration in der Gasphase von der 1. zur 4. Flasche etwa 70 ppm. Dies entspricht in etwa 0,010% w/w Einstellung am Ozongerät. Allerdings ist ein ähnlich großer Unterschied allein durch die noch nicht vollständige Äquilibrierung der Apparatur zu erwarten. Nachdem die Abweichungen bei der Einstellung der Ozonkonzentration im Kurzschluss bereits größer waren, wurden bei den nachfolgenden Versuchen die Ergebnisse aller Flaschen einer Serie zusammengefasst.

3.4 Wirkung von Ozon auf A549 und L929 Zellen

3.4.1 Vitalität

3.4.1.1 Morphologische Veränderungen

Zuerst sollte untersucht werden, ob durch Exposition mit Ozon eine Veränderung in der Morphologie der Zellen auftrat. A549 und L929 Zellen wurden 4 Stunden bei 0,100% w/w Ozon exponiert, anschließend fixiert, getrocknet und im Rasterelektronenmikroskop (REM) untersucht. Die aufgetretenen morphologischen Veränderungen sind in Abbildung 3.10 vergleichend dargestellt.

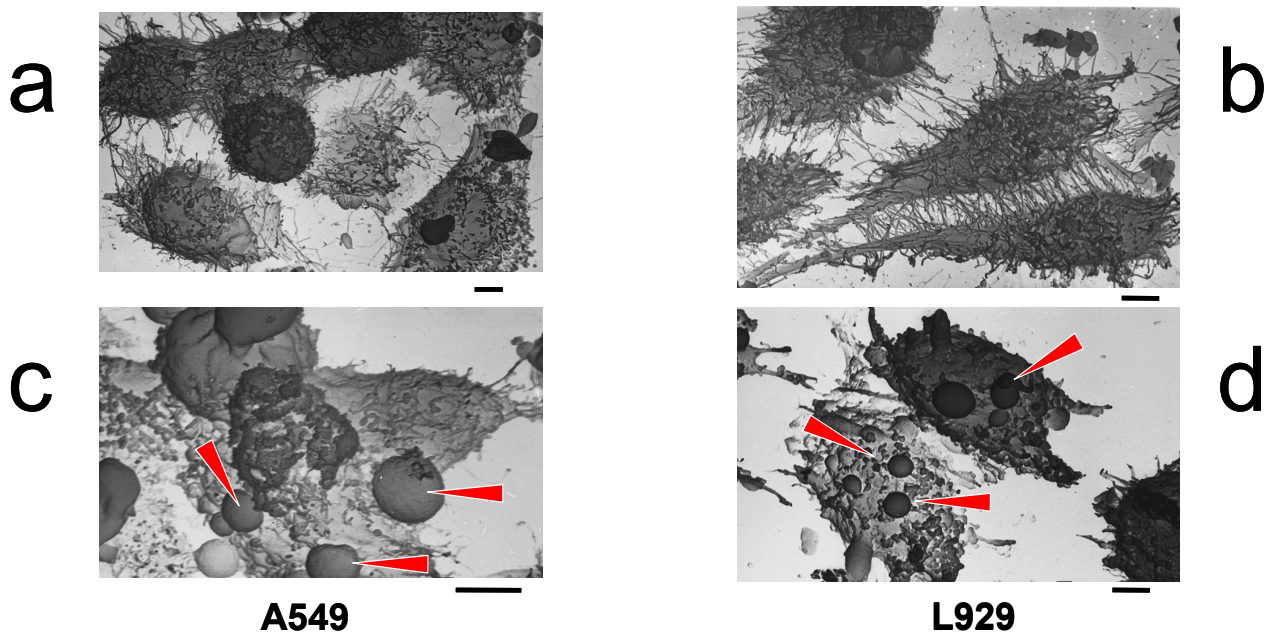


Abbildung 3.10: Rasterelektronenmikrogramme von Ozon-exponierten A549 und L929 Zellen. a und b zeigen die Kontrollzellen nach 4 Stunden in glucosefreiem HBSS. Zellen in c und d wurden für 4 Stunden in glucosefreiem HBSS mit Ozon (0,100% w/w) exponiert. Die zyttoplasmatischen Blasen sind durch rote Pfeile hervorgehoben. (Skala: Strich = 3 µm)

Auf den Bildern ist bei beiden Zelllinien nach der Exposition eine deutliche Blasenbildung (rote Pfeile) zu erkennen. Diese Blasen wurden manchmal ebenso groß wie der Zellkörper. Zudem verringerte sich die Ausbildung der Zellfortsätze (Lamellipodia). Dies ist besonders deutlich bei den L929 Zellen zu sehen, deren ausgeprägte fibroblasten-typische Fortsätze bei den Kontrollzellen gut erkennbar sind. Nach Ozon-Exposition waren die Fortsätze beinahe vollständig verschwunden.

3.4.1.2 Bestimmung der Trypanblau-gefärbten Zellfraktion

Die Bestimmung der geschädigten Zellen erfolgte über den Trypanblau-Test (Abschnitt 2.6.4.1). Es wurden jeweils 200 Zellen ausgezählt und der Prozentsatz der gefärbten Zellen bestimmt. Jeder Versuch wurde mindestens dreimal durchgeführt.

Zunächst wurde die Toxizität bei verschiedenen Ozonkonzentrationen sowohl für A549 als auch L929 Zellen bestimmt. Das Ergebnis ist in Abbildung 3.11 dargestellt.

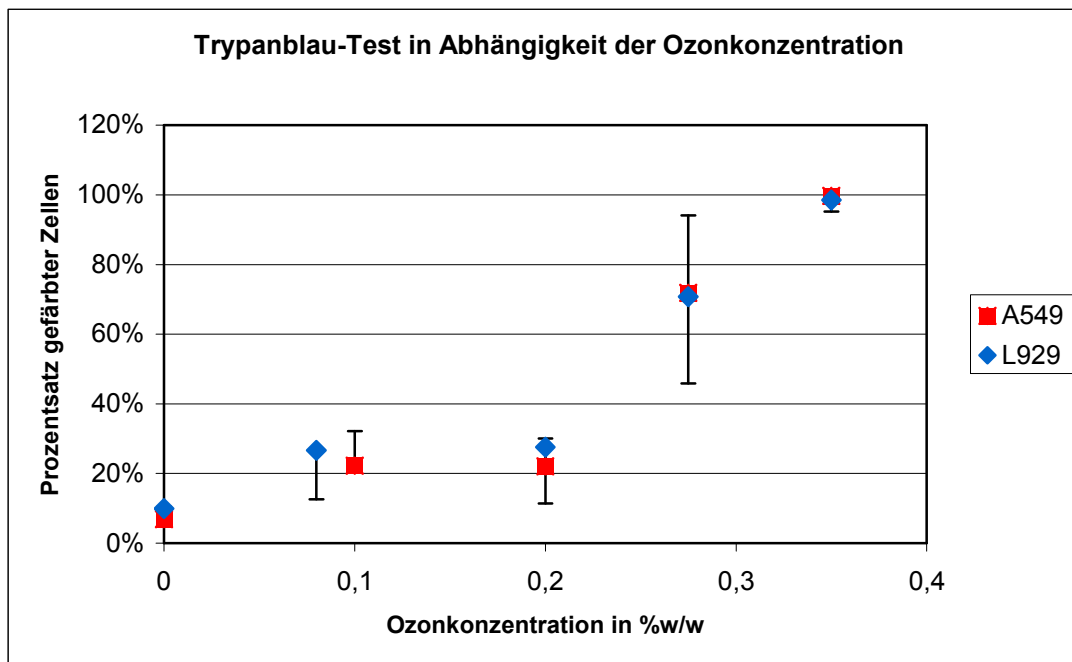


Abbildung 3.11: Trypanblau-Test der Zellen bei verschiedenen Ozonkonzentrationen:

Exposition von A549 bzw. L929 Zellen mit 0, 0,1, 0,2, 0,28 und 0,35% w/w Ozon für 4 Stunden. Nach der Trypanblaufärbung wurden 200 Zellen ausgezählt und der Prozentsatz gefärbter Zellen aufgetragen. Dargestellt sind die Mittelwerte aus mindestens 3 unabhängigen Versuchen + bzw. - Standardabweichung.

Wie man aus der Abbildung ersehen kann, reagierten A549 Zellen und L929 Zellen in gleicher Weise auf steigende Ozonkonzentrationen. Die Toxizität erhöhte sich bei 0,08% w/w Ozon von etwa 10% bei der Kontrolle auf 20-30%. Anschließend blieb sie bis zu einer Konzentration von 0,2% w/w gleich und stieg dann stark an. Bei 0,28% w/w Ozon waren bereits etwa 70% der Zellen gefärbt. Bei einer Konzentration von 0,35% w/w Ozon waren nach 4 h alle Zellen mit Trypanblau gefärbt.

Um zu erfahren, ab welchem Zeitpunkt die Schädigung der Zellen einsetzte, wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten Proben genommen und der Prozentsatz gefärbter Zellen bestimmt. Zunächst wurde die Kinetik bei der niedrigen Konzentration von 0,1% w/w Ozon (A549) bzw. 0,08% w/w (L929) Ozon bestimmt.

Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.12 dargestellt.

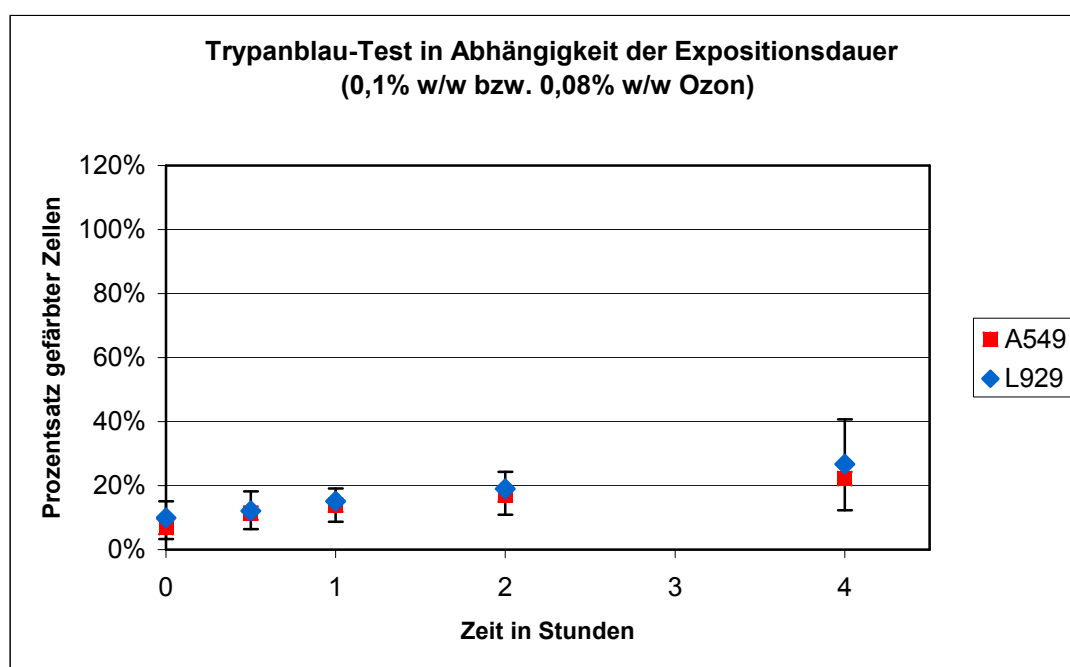


Abbildung 3.12: Trypanblau-Test in Abhängigkeit der Expositionsdauer bei 0,1% w/w bzw. 0,08% w/w Ozonexposition: Exposition von A549 bzw. L929 Zellen mit 0,1% w/w bzw. 0,08% w/w Ozon für, 0, 0,5, 1, 2 und 4 Stunden Nach der Trypanblaufärbung wurden 200 Zellen ausgezählt und der Prozentsatz gefärbter Zellen aufgetragen. Dargestellt sind die Mittelwerte aus mindestens 3 unabhängigen Versuchen + bzw. – Standardabweichung.

Bei beiden Zelllinien stieg die Toxizität vergleichbar rasch an. Gegen Ende der Exposition verlangsamte sich der Anstieg, wobei die Streuung der Messwerte allerdings zunahm.

Die Versuche wurden bei einer Ozonkonzentration von 0,28% w/w wiederholt, um zu prüfen, ob die Zellen bei höheren Ozonkonzentrationen entsprechend reagierten. Das zugehörige Diagramm ist in Abbildung 3.13 dargestellt.

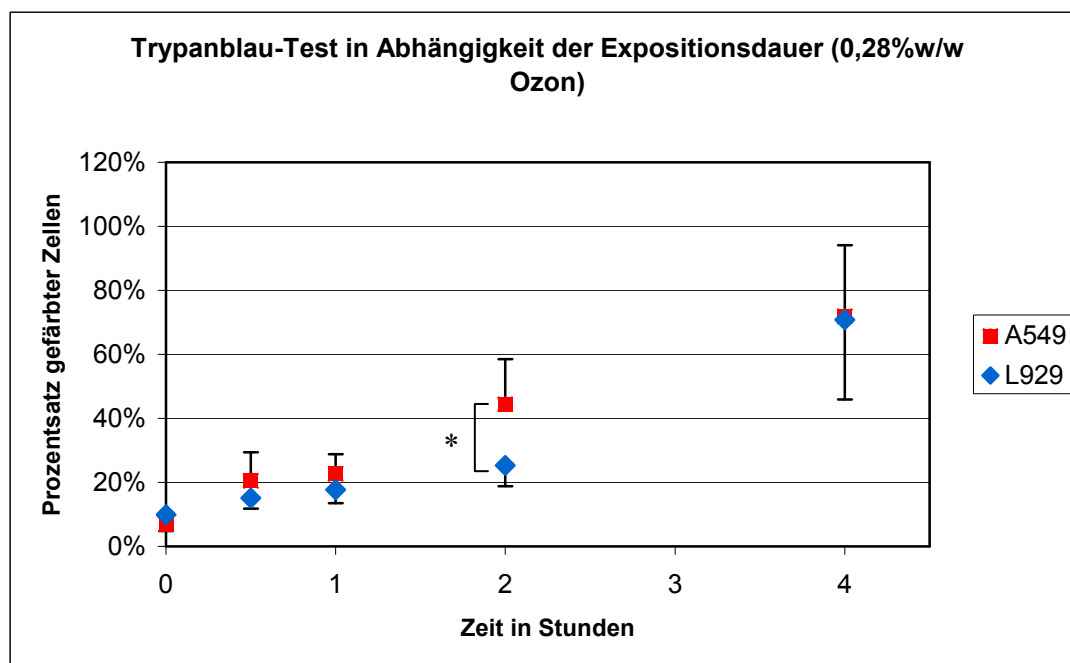


Abbildung 3.13: Trypanblau-Test in Abhängigkeit der Expositionsdauer bei 0,28% w/w Ozonexposition: Exposition von A549 bzw. L929 Zellen mit 0,28% w/w Ozon für, 0, 0,5, 1, 2 und 4 Stunden Nach der Trypanblaufärbung wurden 200 Zellen ausgezählt und der Prozentsatz gefärbter Zellen aufgetragen. Dargestellt sind die Mittelwerte aus mindestens 3 unabhängigen Versuchen + bzw. - Standardabweichung. $p < 0,05$ (*) markiert den statistisch signifikanten Unterschied zwischen dem Mittelwert der L929 und der A549 Zellen ($P_{2h} = 0,0305$).

Bei der höheren Ozonkonzentration zeigten beide Zelllinien eine stärkere Schädigung.

Während bei den A549 Zellen der Verlauf allerdings ähnlich wie bei einer niedrigeren Ozonkonzentration war, stiegen bei den L929 Zellen die Werte in den ersten 2 Stunden langsam an, dann aber zwischen 2 und 4 Stunden deutlich steiler. Interessant war auch, dass bei den A549 Zellen bei 0,5 und 1 Stunde ein ähnliches Plateau auftrat wie bei 0,1% w/w und 0,2% w/w. Auch der Prozentsatz gefärbter Zellen lag hier bei etwa 20%. Dies könnte darauf hinweisen, dass nach etwa 0,5-1 Stunde 0,28% w/w Ozon die gleiche Wirkung erfolgte wie bei 0,1-0,2% w/w Ozon und 4 Stunden Inkubation.

3.4.1.3 Bestimmung der vitalen Zellfraktion

Als Ergänzung zum Trypanblau-Test, wurde neben der „geschädigten“ die „gesunde“ Zellfraktion bestimmt. Dies geschah mit Hilfe des Neutralrot-Tests (Abschnitt 2.6.4.2). In Abbildung 3.14 ist der Prozentsatz mit Neutralrot gefärbter Zellen bei verschiedenen Ozonkonzentrationen dargestellt. Die Kontrolle wurde hierbei auf 100% gesetzt.

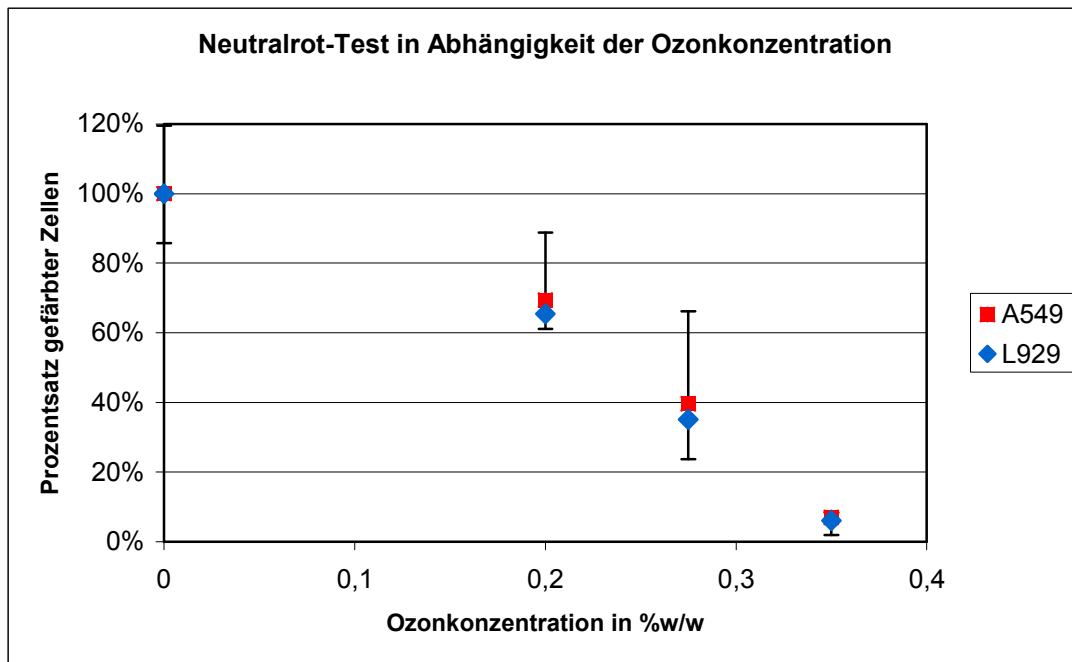


Abbildung 3.14: Neutralrot-Test bei verschiedenen Ozonkonzentrationen: Exposition von A549 bzw. L929 Zellen mit 0, 0,2, 0,28 und 0,35% w/w Ozon für 4 Stunden. Nach dem Neutralrot-Test wurde die Extinktion des Überstands bei 540 nm bestimmt. Die Extinktionen sind in Prozent der Kontrollzellen (100%) angegeben. Dargestellt sind die Mittelwerte aus mindestens 3 unabhängigen Versuchen + bzw. - Standardabweichung.

Sowohl bei den A549 Zellen als auch bei den L929 Zellen sind die Ergebnisse des Trypanblau-Tests weitgehend denen des Neutralrot-Tests komplementär. Da durch das Setzen der Kontrolle auf 100% die geschädigten Zellen der Kontrolle nicht erfasst sind, fällt der Prozentsatz der gesunden Zellen mit diesem Test allerdings um etwa 10% höher aus. Die 10% Differenz entspricht dem Prozentsatz der im Farbstoffausschluss-Test bestimmten Trypanblau-gefärbten Zellen bei der Kontrolle.

Bei einer Ozonkonzentration von 0,2% w/w sind noch etwa 70% der Zellen vital. Das liegt im Bereich der im Trypanblau-Test bestimmten Prozentsatz von 70-80% (20%-30% Trypanblau gefärbte Zellen). Nach einer Ozonexposition mit einer Konzentration von 0,275% w/w werden noch 40% der Zellen mit Neutralrot gefärbt. Auch dies entspricht dem Ergebnis vom Trypanblau-Test. Bei 0,35% w/w Ozonkonzentration sind im Neutralrottest alle Zellen ungefärbt.

3.4.1.4 Bestimmung der koloniebildenden Fraktion

Um die Frage zu klären, ob die lebenden Zellen ihre Fähigkeit zur Teilung behalten haben, wurde zusätzlich die koloniebildende Fraktion bestimmt (Abschnitt 2.6.4.3). Hierfür wurden die Zellen zunächst 0,5; 1; 2 bzw. 4 Stunden mit 0,1% w/w Ozon für A549 Zellen bzw. 0,08% w/w Ozon für L929 Zellen inkubiert. Es wurden 500 Zellen pro Flasche ausgesät und nach einer Woche die Kolonien gezählt. Für jeden Zeitpunkt wurde in der Expositions-kammer eine Kontrolle mitgeführt, die der Inkubatoratmosphäre ausgesetzt wurde. Das Ergebnis für die jeweilige Zelllinie ist in Prozent der ausgesäten Zellen in Abbildung 3.15 und Abbildung 3.16 dargestellt.

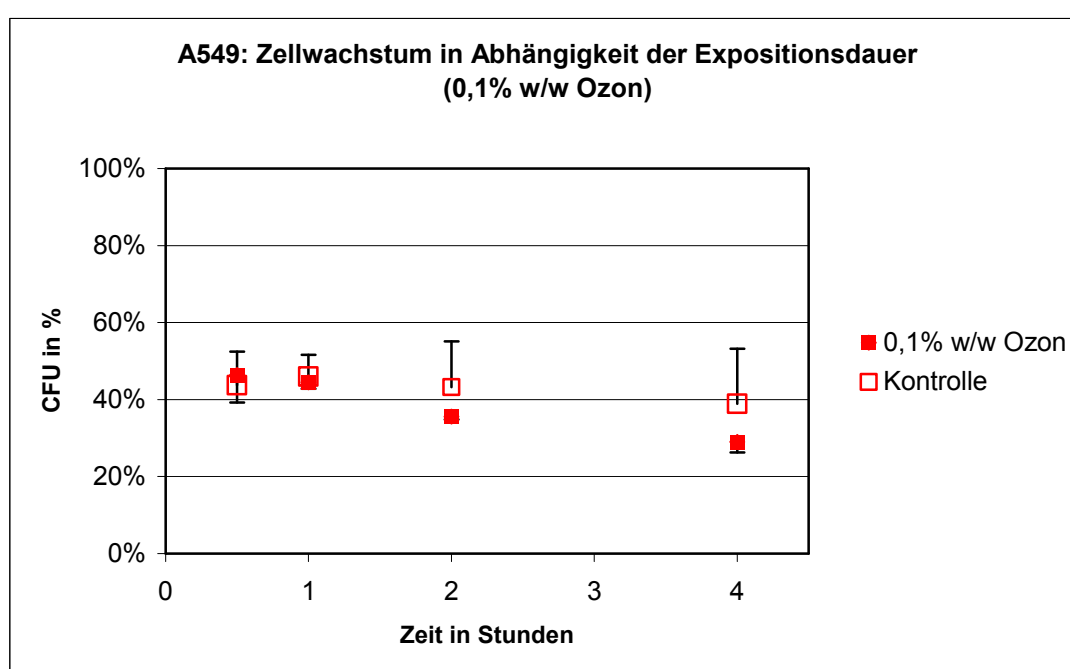


Abbildung 3.15: Bestimmung der koloniebildenden Fraktion in Abhängigkeit der Expositionsdauer bei 0,1% w/w Ozonexposition: A549 Zellen wurden 0,5, 1, 2 und 4 Stunden mit 0,1% w/w Ozon exponiert. Die Kontrolle dieselbe Zeit mit Inkubatoratmosphäre. Nach Exposition wurden 500 Zellen/Flasche ausgesät und 1 Woche im Brutschrank inkubiert. Die Anzahl der vorhandenen Kolonien wurde in % von 500 in das Diagramm aufgetragen. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 2 unabhängigen Versuchen + bzw. - Standardabweichung.

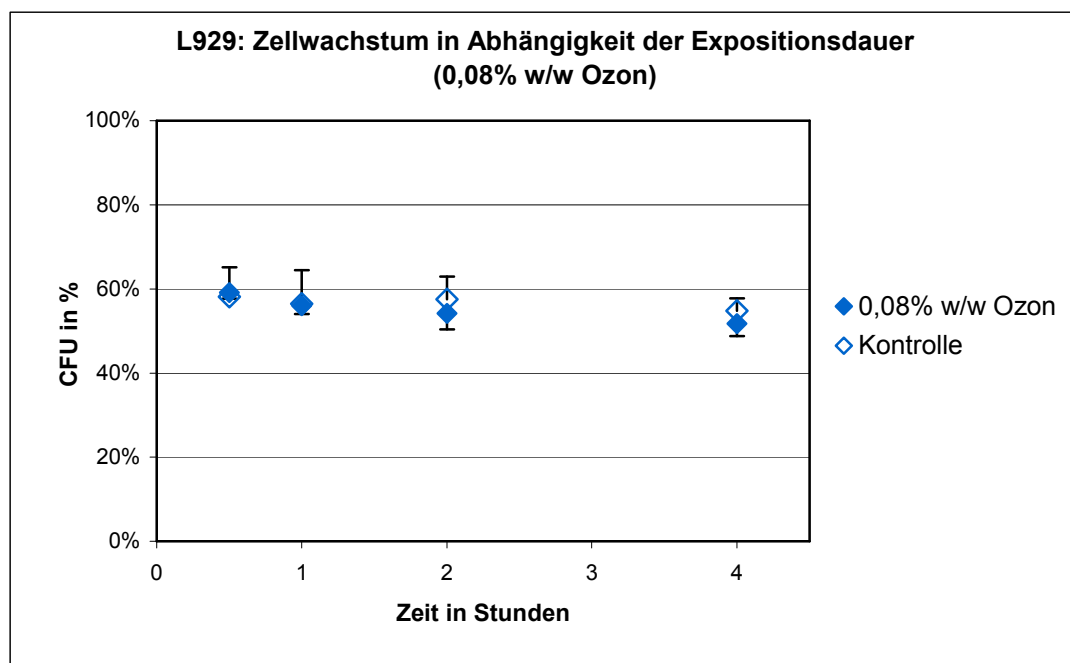


Abbildung 3.16: Bestimmung der koloniebildenden Fraktion in Abhängigkeit der Expositionsdauer bei 0,08% w/w Ozonexposition: L929 Zellen wurden 0,5, 1, 2 und 4 Stunden mit 0,08% w/w Ozon exponiert. Die Kontrolle dieselbe Zeit mit Inkubatoratmosphäre. Nach Exposition wurden 500 Zellen/Flasche ausgesät und 1 Woche im Brutschrank inkubiert. Die Anzahl der vorhandenen Kolonien wurde in % von 500 in das Diagramm aufgetragen. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 3 unabhängigen Versuchen + bzw. - Standardabweichung.

Wie man aus den Abbildungen erkennen kann, waren sowohl bei A549 Zellen als auch bei den L929 Zellen alle überlebenden Zellen auch teilungsfähig.

Bei den A549 Zellen betrug die Koloniebildungseffizienz nach 4 Stunden Exposition mit 0,1% w/w Ozon etwa 30%, während diese bei der unexponierten Kontrolle bei etwa 40% lag. Dies entsprach komplementär den durch den Trypanblau-Test bestimmten avitalen Zellen (etwa 10%). Auch die Abnahme über die Zeit war identisch mit dem beim Trypanblau-Test bestimmten Verlauf.

Inwieweit dies auch bei der höheren Ozonkonzentration von 0,28% w/w zutrifft, zeigen Abbildung 3.17 und Abbildung 3.18.

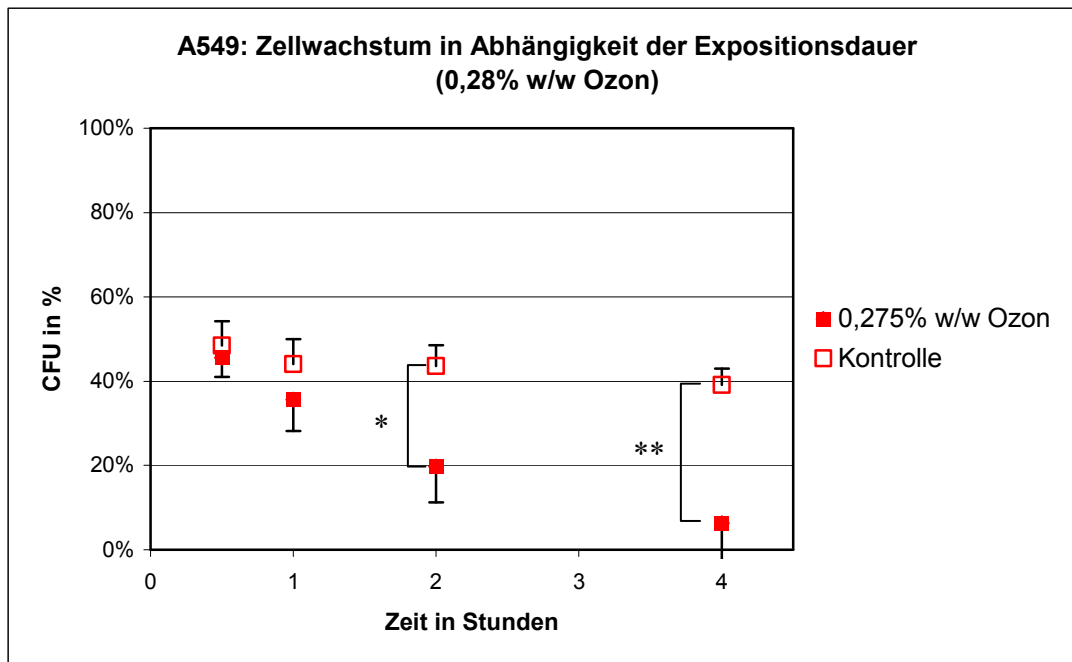


Abbildung 3.17: Bestimmung der koloniebildenden Fraktion in Abhängigkeit der Expositionsdauer bei 0,28% w/w Ozonexposition: A549 Zellen wurden 0,5, 1, 2 und 4 h mit 0,28% w/w Ozon exponiert, die Kontrolle dieselbe Zeit mit Inkubatoratmosphäre. Nach Exposition wurden 500 Zellen/Flasche ausgesät und 1 Woche im Brutschrank inkubiert. Die Anzahl der vorhandenen Kolonien wurde in % von 500 in das Diagramm aufgetragen. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 3 unabhängigen Versuchen+ bzw. - Standardabweichung. $p < 0,05$ (*) und $p < 0,01$ (**) markieren die statistisch signifikanten Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle (* $P_{2h} = 0,0265$; ** $P_{4h} = 0,0088$).

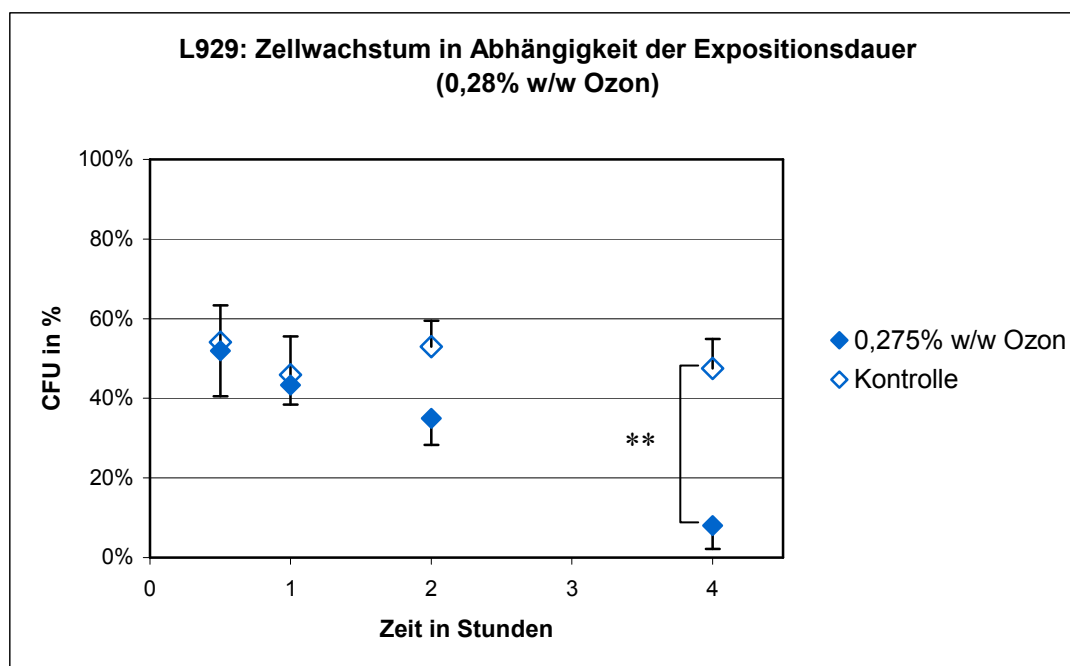


Abbildung 3.18: Bestimmung der koloniebildenden Fraktion in Abhängigkeit der Expositionsdauer bei 0,28% w/w Ozonexposition: L929 Zellen wurden 0,5, 1, 2 und 4 h mit 0,28% w/w Ozon exponiert, die Kontrolle dieselbe Zeit mit Inkubatoratmosphäre. Nach Exposition wurden 500 Zellen/Flasche ausgesät und 1 Woche im Brutschrank inkubiert. Die Anzahl der vorhandenen Kolonien wurde in % von 500 in das Diagramm aufgetragen. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 3 unabhängigen Versuchen + bzw. - Standardabweichung. $p < 0,01$ (**) markiert den statistisch signifikanten Unterschied im Vergleich zur Kontrolle (** $P_{4h} = 0,0040$).

Auch hier waren alle überlebenden Zellen teilungsfähig. Der Verlauf spiegelte bei den Zelllinien ebenfalls den im Trypanblau-Test festgestellten unterschiedlichen Anstieg wieder. Bei L929 Zellen erfolgte der stärkste Anstieg zwischen 2 und 4 Stunden, während bei A549 Zellen ein gleichmäßiger Anstieg beobachtet wurde.

3.4.2 Bestimmung des oxidativen Stresses

Da Ozon ein starkes Oxidationsmittel ist, erzeugt es oxidativen Stress für die inkubierten Zellen. Ein Parameter zur Bestimmung des oxidativen Stresses ist der intrazelluläre Glutathiongehalt. Nach der Exposition der Zellen mit verschiedenen Ozonkonzentrationen wurde der Glutathiongehalt bestimmt (Abschnitt 2.6.2) und aus mindestens drei Versuchen der Mittelwert gebildet. Das Ergebnis für die A549 Zellen ist in Abbildung 3.19, das für die L929 Zellen in Abbildung 3.20 dargestellt.

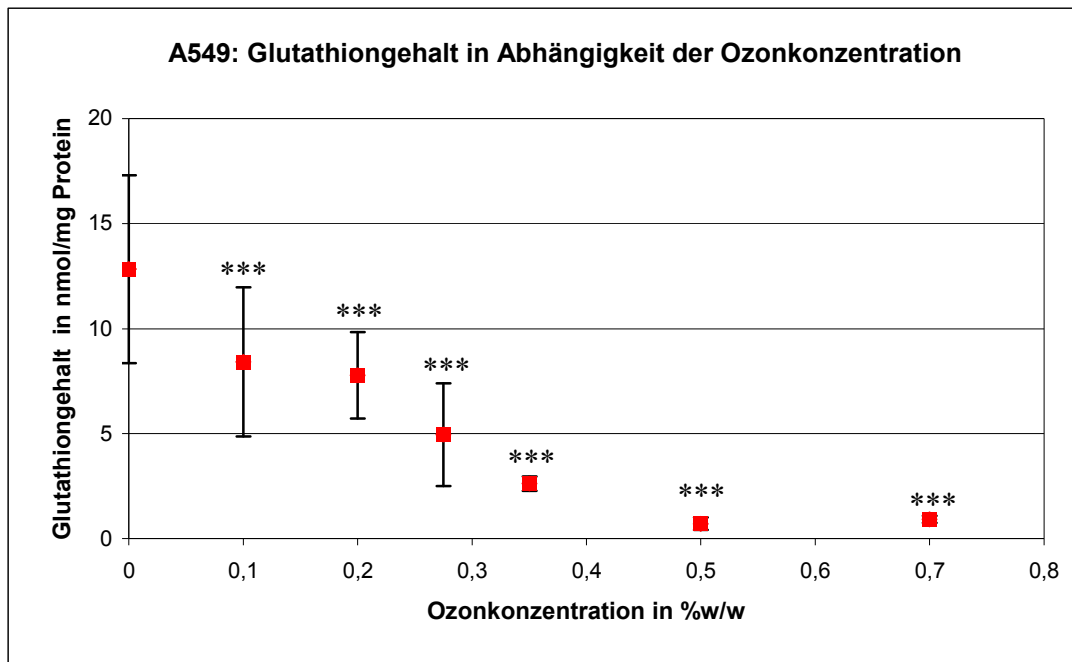


Abbildung 3.19: Glutathiongehalt von A549 Zellen bei verschiedenen Ozonkonzentrationen:

Exposition von A459 Zellen für 4 Stunden mit 0, 0,1, 0,2, 0,28, 0,35, 0,5 und 0,7% w/w Ozon. Dargestellt sind die Mittelwerte des Glutathiongehalts aus mindestens 3 unabhängigen Versuchen \pm Standardabweichung. $p < 0,001$ (***) markieren die statistisch signifikanten Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle.

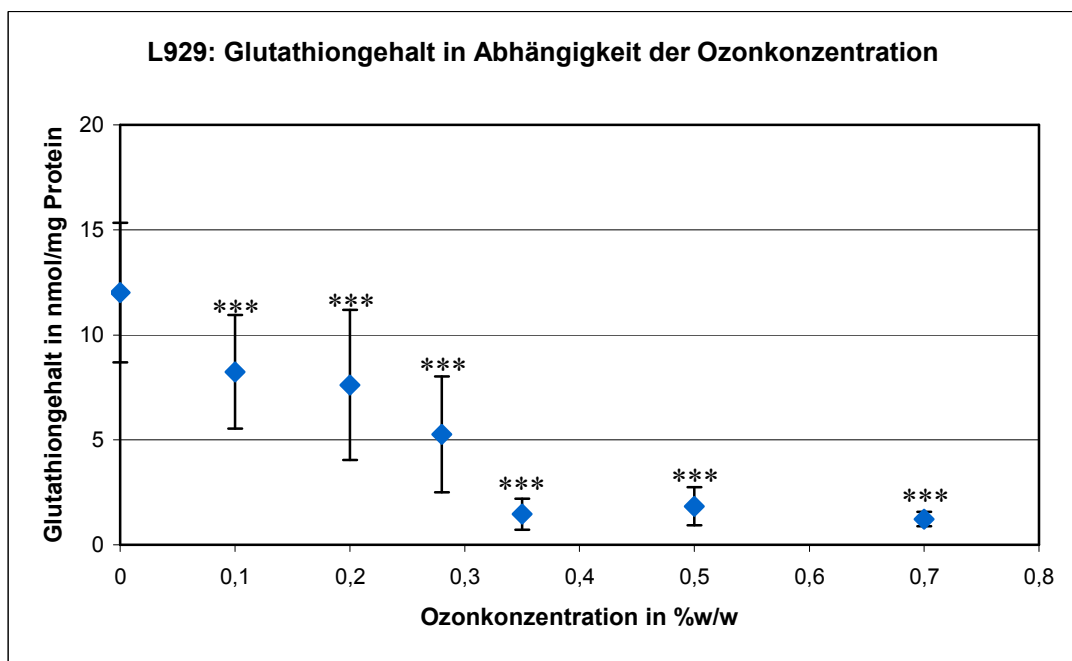


Abbildung 3.20: Glutathiongehalt von L929 Zellen bei verschiedenen Ozonkonzentrationen:

Exposition von L929 Zellen für 4 Stunden mit 0, 0,1, 0,2, 0,28, 0,35, 0,5 und 0,7% w/w Ozon. Dargestellt sind die Mittelwerte des Glutathiongehalts aus mindestens 3 unabhängigen Versuchen \pm Standardabweichung. $p < 0,001$ (***) markieren die statistisch signifikanten Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle.

Wie bereits bei der Vitalitätsuntersuchung festgestellt, verhielten sich A549 Zellen und L929 Zellen sehr ähnlich.

Auch die Abnahme des Glutathiongehalts erfolgte nach dem gleichen Muster wie die der Vitalität der Zellen. Nach einer leichten Abnahme des Glutathiongehalts zu Anfang blieb der Glutathiongehalt zunächst gleich, um dann bei 0,28%w/w Ozon stark abzusinken.

Auch beim Glutathiongehalt war es interessant zu klären, wie dieser im Verlauf der Zeit abnimmt. Für die Kinetikbestimmung wurde eine Ozonkonzentration von 0,08%w/w gewählt, da diese der EC_{50} entspricht. Bei 0,5, 1, 2 und 4 Stunden wurden jeweils zwei Flaschen gestoppt und der Glutathiongehalt bestimmt. Das Ergebnis ist in Abbildung 3.21 dargestellt.

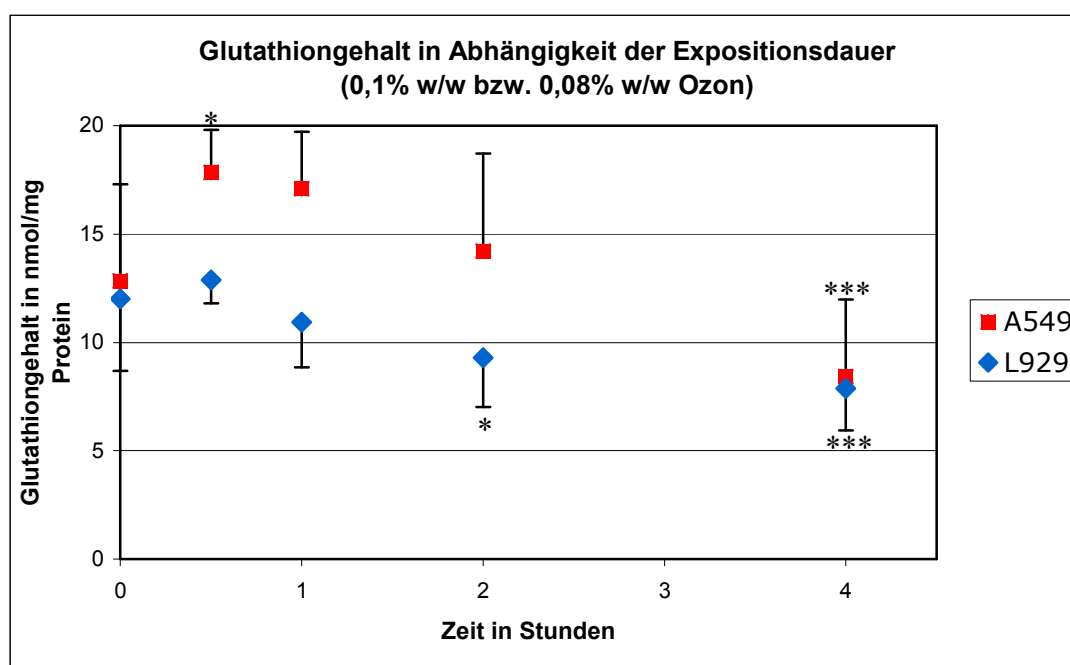


Abbildung 3.21: Bestimmung des Glutathiongehalts in Abhängigkeit der Expositionsdauer:

Exposition von A549 bzw. L929 Zellen für 0, 0,5, 1, 2 und 4 Stunden mit 0,1% w/w bzw. 0,08% w/w Ozon. Dargestellt sind die Mittelwerte des Glutathiongehalts aus mindestens 3 unabhängigen Versuchen + bzw. - Standardabweichung. $P < 0,05$ (*) und $p < 0,001$ (***) markieren die statistisch signifikanten Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle. (* $P_{0,5hA549} = 0,0283$; * $P_{2hL929} = 0,0250$).

Bei den Ergebnissen für beide Zelllinien fällt auf, dass der Glutathiongehalt nach 0,5 Stunden leicht angestiegen ist. Nach diesem anfänglichen Anstieg fällt der Glutathiongehalt ab.

3.4.3 Einfluss auf den Energiehaushalt

Als nächstes sollte die Frage geklärt werden welchen Einfluss eine Ozonexposition auf den Energiehaushalt der Zellen hat. Hierfür wurden wiederum die Zellen 4h lang bei verschiedenen Ozonkonzentrationen inkubiert und anschließend der ATP-Gehalt bestimmt (Abschnitt 2.6.3). Das Ergebnis ist in Abbildung 3.22 dargestellt.

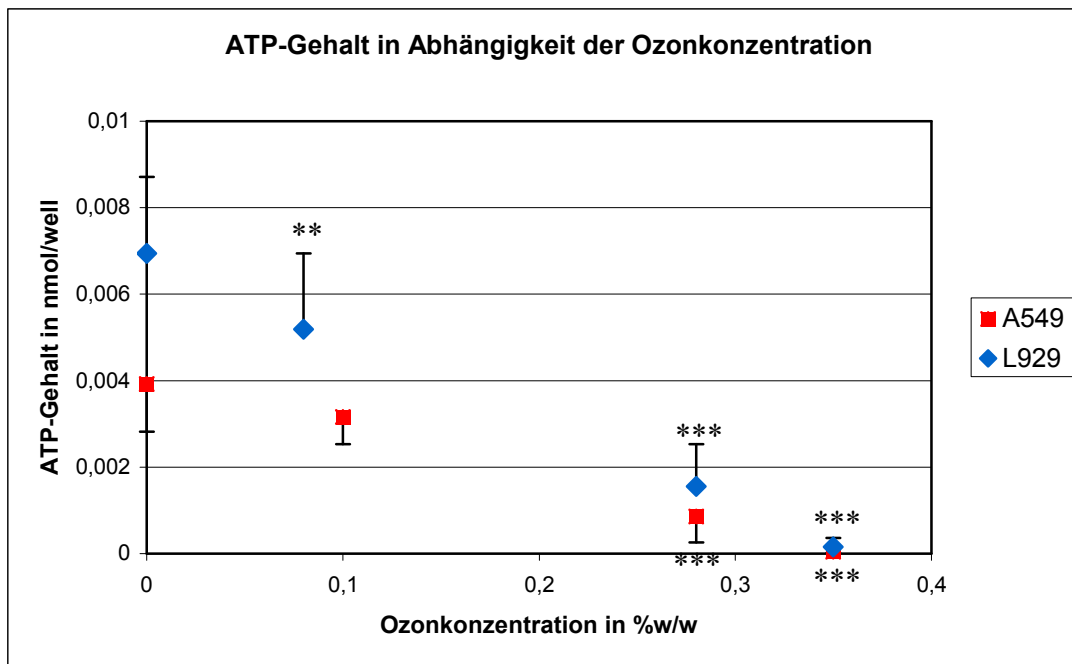


Abbildung 3.22: ATP-Gehalt der Zellen bei verschiedenen Ozonkonzentrationen: Exposition von A549 bzw. L929 Zellen für 4 Stunden mit 0, 0,1, 0,28, 0,35% w/w Ozon. Dargestellt sind die Mittelwerte des ATP-Gehalts aus mindestens 3 unabhängigen Versuchen + bzw. - Standardabweichung. $P < 0,01$ (**) und $p < 0,001$ (***) markieren die statistisch signifikanten Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle. (** $P_{0,08L929} = 0,0025$).

Auch hier entspricht die Abnahme des ATP-Gehalts bei der niedrigeren Ozonkonzentration von 0,1 bzw. 0,08% w/w weitgehend dem Absterben der Zellen. Bei einer Ozonkonzentration von 0,28% w/w dagegen ist der ATP-Gehalt schon etwas weiter abgesunken als es durch ein Absterben der Zellen erklärt werden könnte, nämlich um etwa 80% im Vergleich zur Kontrolle, wogegen der Anstieg der Toxizität etwa 60% beträgt. Bei 0,35% w/w Ozon ist der ATP-Gehalt praktisch gleich „0“, da zu diesem Zeitpunkt bereits alle Zellen avital sind.

Die Abnahme des ATP-Gehalts im Laufe der Zeit wurde ebenfalls bei 2 verschiedenen Ozonkonzentrationen bestimmt. Das Ergebnis für die niedrigere Ozonkonzentration (0,1% bzw. 0,08% w/w) ist in Abbildung 3.23 dargestellt.

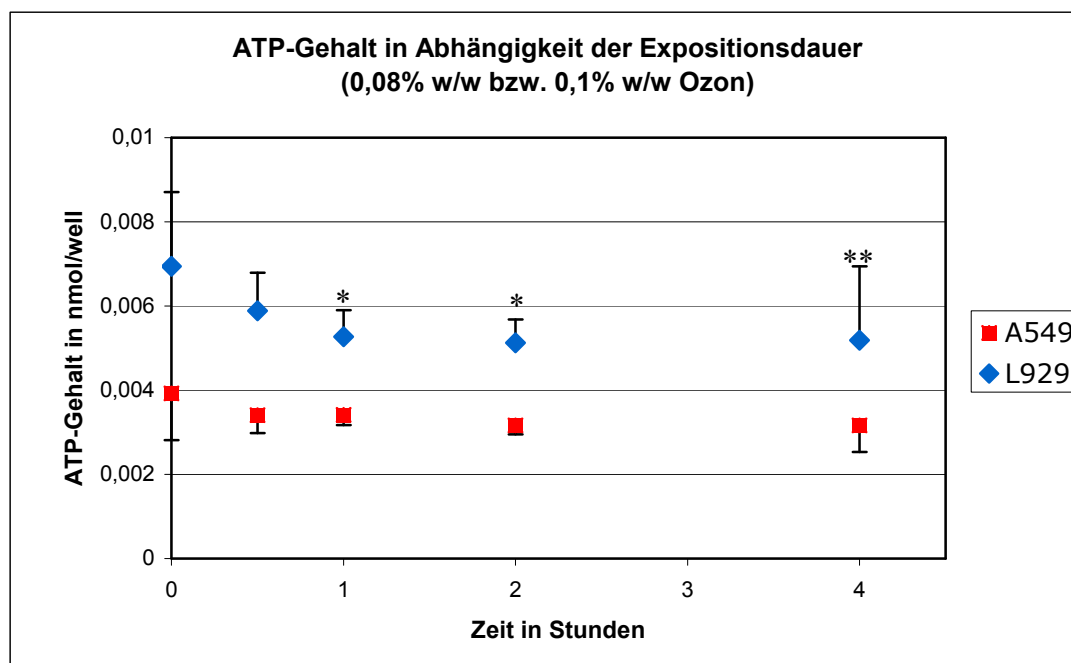


Abbildung 3.23: Abnahme des ATP-Gehalts in Abhängigkeit der Expositionsdauer bei einer Ozonkonzentration von 0,1% w/w bzw. 0,08% w/w: Exposition von A549 bzw. L929 Zellen für 0, 0,5, 1, 2 und 4 Stunden mit 0,1% w/w bzw. 0,08% w/w Ozon. Dargestellt sind die Mittelwerte des ATP-Gehalts aus 3 unabhängigen Versuchen + bzw. - Standardabweichung. $P < 0,05$ (*) und $p < 0,01$ (**) markieren die statistisch signifikanten Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle. (* $P_{1hL929} = 0,0104$; * $P_{2hL929} = 0,0215$; ** $P_{4hL929} = 0,0025$).

Im Gegensatz zum Glutathiongehalt nahm der ATP-Gehalt bei beiden Zelllinien relativ gleichmäßig ab, zu Anfang sogar stärker als gegen Ende der Expositionszeit. Ansonsten entsprach der Verlauf weitgehend dem, welcher bei den anderen Vitalitätsuntersuchungen festgestellt wurde.

Inwieweit dies auch bei einer Ozonkonzentration von 0,28% w/w zutrifft, wird in Abbildung 3.24 dargestellt.

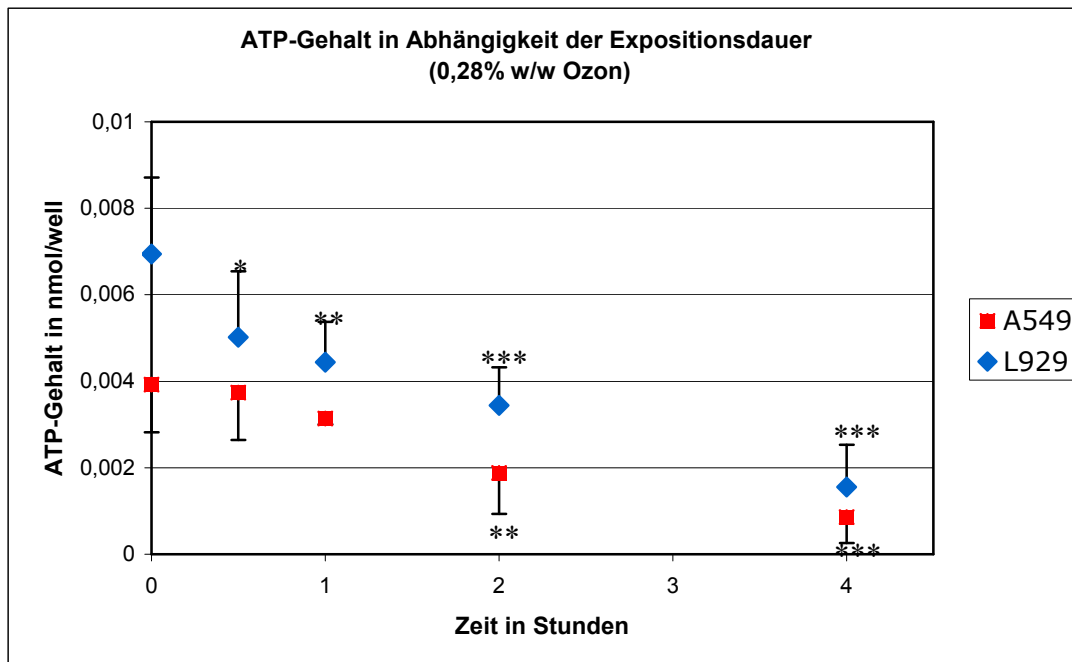


Abbildung 3.24: Abnahme des ATP-Gehalts in Abhängigkeit der Expositionsdauer bei einer Ozonkonzentration von 0,28% w/w: Exposition von A549 bzw. L929 Zellen für 0, 0,5, 1, 2 und 4 Stunden mit 0,28% w/w Ozon. Dargestellt sind die Mittelwerte des ATP-Gehalts aus 3 unabhängigen Versuchen + bzw. – Standardabweichung. $P < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (***) und $p < 0,001$ (***) markieren die statistisch signifikanten Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle. (* $P_{0,5hL929} = 0,0214$; ** $P_{1hL929} = 0,0025$; ** $P_{2hA549} = 0,0069$).

Bei den L929 Zellen nahm der ATP-Gehalt auch bei der höheren Ozonkonzentration anfangs stärker ab als gegen Ende der Expositionszeit. Dagegen zeigten die Werte bei den A549 Zellen eher einen sigmoiden Verlauf.

3.5 Spontanerholung nach Ozonexposition

Schließlich sollte überprüft werden, ob die Zellen in der Lage sind, sich nach einer Ozonexposition aus eigener Kraft zu erholen. Dies sollte bei 3 verschiedenen Ozonkonzentrationen untersucht werden, bei 0,2% w/w; 0,28% w/w und 0,35% w/w. Die höchste Konzentration diente hierbei als „Negativ“-Kontrolle, da bei dieser Konzentration bereits alle Zellen tot sind und eine Erholung kaum zu erwarten ist. Als Endpunkt wurde der Glutathiongehalt der Zellen gewählt, der ausreichend empfindlich schien und gut zu messen war.

Nach der 4stündigen Ozonexposition wurde bei der Hälfte der Flaschen der Glutathiongehalt sofort bestimmt. Bei der anderen Hälfte wurde das Expositionsmedium durch frisches DMEM-F12-Medium (angereichert mit 10% fötalem Kälberserum) ersetzt und die Zellen weitere 20 Stunden bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Anschließend erfolgte die Glutathionmessung.

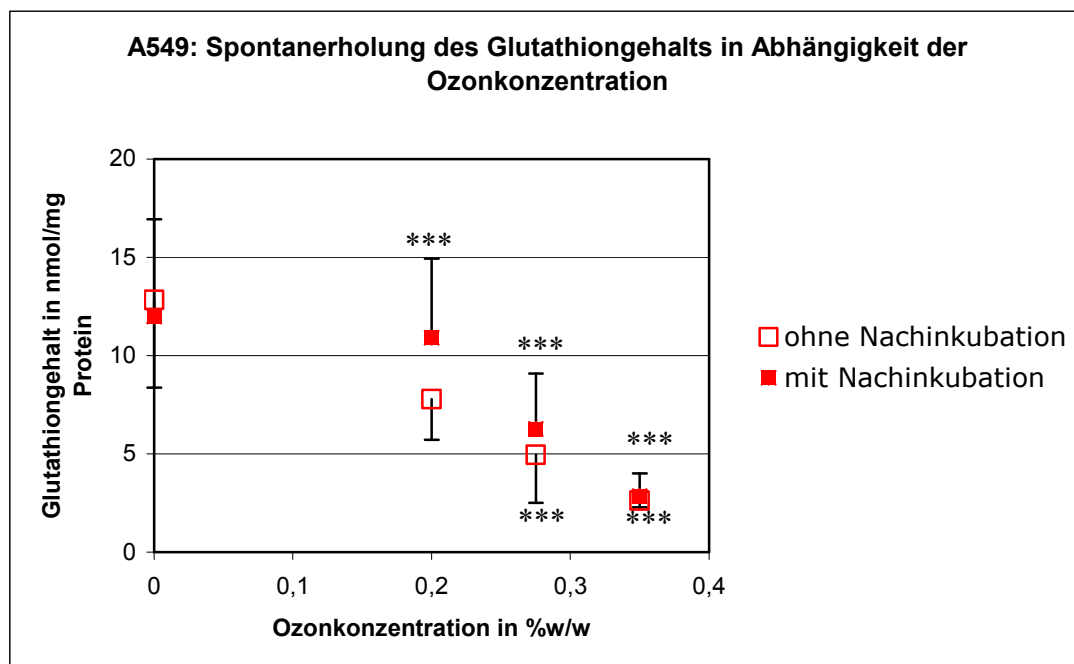


Abbildung 3.25: Spontanerholung des Glutathiongehalts bei A549 Zellen nach 20stündiger

Nachinkubation: Glutathionwerte der Ozon-exponierten A549 Zellen im 4 Stunden-Versuch ohne bzw. mit Nachinkubation (20 Stunden) mit Medienwechsel (HBSS durch DMEM-F12 mit FCS). Dargestellt sind die Mittelwerte aus mindestens 3 unabhängigen Versuchen + bzw. - Standardabweichung. $p < 0,001$ (***) markieren die statistisch signifikanten Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle. Die Mittelwerte ohne Nachinkubation und mit Nachinkubation sind nicht signifikant verschieden.

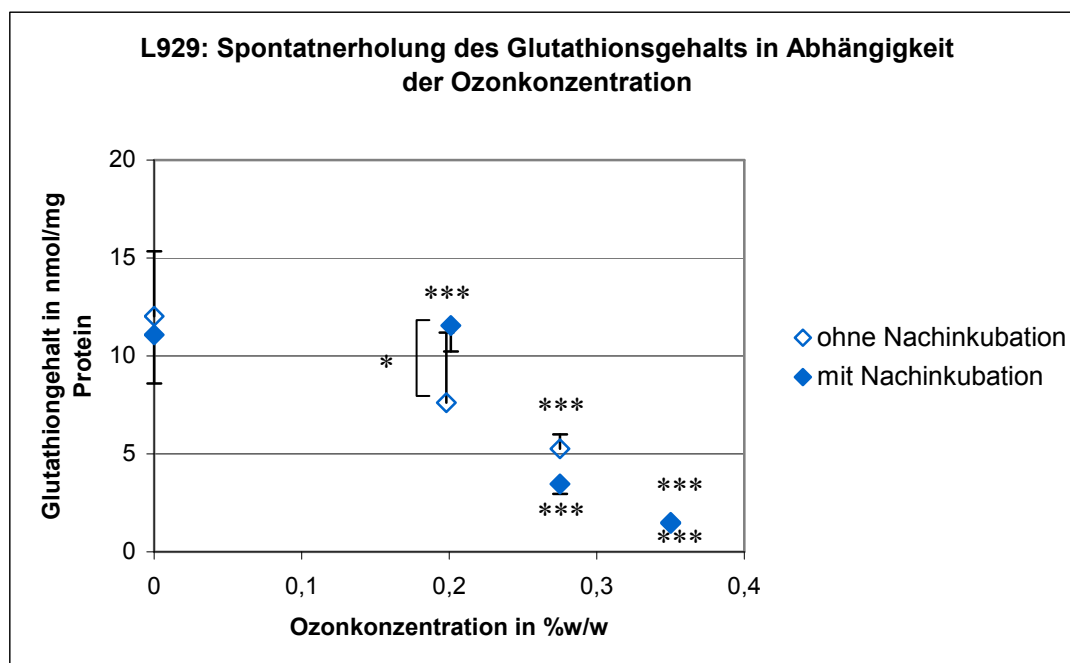


Abbildung 3.26: Spontanerholung des Glutathiongehalts bei L929 Zellen nach 20stündiger Nachinkubation: Glutathionwerte der Ozon-exponierten L929 Zellen im 4 Stunden-Versuch ohne bzw. mit Nachinkubation (20 Stunden) mit Medienwechsel (HBSS durch DMEM-F12 mit FCS). Dargestellt sind die Mittelwerte aus mindestens 3 unabhängigen Versuchen + bzw. - Standardabweichung. $p < 0,001$ (***) markieren die statistisch signifikanten Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle, $P < 0,05$ (*) markiert den statistisch signifikanten Unterschied ohne und mit Nachinkubation ($P_{0,2} = 0,0186$).

Bei beiden Zelllinien trat lediglich bei einer Konzentration von 0,2% w/w so etwas wie eine Spontanerholung auf.

Bei einer Konzentration von 0,275% w/w waren die entstandenen Schäden für die Zellen offenbar zu groß, um eine Erholung aus eigener Kraft zuzulassen. Bei den A549 Zellen stieg zwar der Glutathiongehalt wieder leicht an, allerdings war dieser Unterschied zu klein, um von einer Erholung zu reden. Bei den L929 Zellen ist nach der Nachinkubation der Glutathiongehalt sogar etwas geringer als vorher. Da bei dieser Konzentration etwa 60% der Zellen bereits tot sind, ist dies auch wenig überraschend.

Wie erwartet war nach einer Exposition mit 0,350% w/w Ozon keine Erholung mehr erkennbar.

Bei 0,2% w/w dagegen stieg der Glutathiongehalt nach der 20stündigen Erholungszeit wieder annähernd auf den Wert der Kontrolle an, nachdem er nach der Exposition zunächst auf etwa 66% der Kontrolle abgefallen war. Dieser Effekt war bei den L929 Zellen deutlicher als bei den A549 Zellen.

4 Diskussion

4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

Bevor die Ergebnisse dieser Arbeit im Einzelnen kritisch diskutiert werden, sollen in einer Kurzübersicht die Ergebnisse der Experimente dargestellt werden. Folgende Fragen sollten geklärt werden:

- 1) Wie verhält sich die Expositionsapparatur mit Ozon?
- 2) Wie verhält sich Indigokarmin als Indikator für die Ozonkonzentration?
- 3) Welche Wirkungen hat Ozon auf A549 und L929 Zellen?
- 4) Wie ist das Spontanverhalten von Ozon-exponierten Zellen nach Aussetzen der Noxe?

Tabelle 4.1 fasst die Ergebnisse der einzelnen Versuche zusammen, wobei neben dem Hinweis auf die entscheidenden Textpassagen bzw. Diagrammen eine stichwortartige Botschaft formuliert wird.

Tabelle 4.1: Synopsis wesentlicher Befunde bei der Ozonexposition

Aufgabe	Versuchsbedingungen	Abbildungen	Fazit
Prüfung der Apparatur	Zellfrei und mit Zellen 0,1% w/w Ozon	Abbildung 3.1 Abbildung 3.3	–Schäden an der Apparatur durch Ozonexposition –Äquilibrierungszeit ca. 20 min –Ozonzerfall 33% allein durch die Apparatur (ohne Zellen)
Indigokarmin als Indikator	1. Zellfrei 0,1% w/w Ozon; 100 µM Indigokarmin 2. mit Zellen ohne Ozon; 100 µM Indigokarmin 3. XTT-Test Indigokarmin und ozoniertes (0,1%w/w Ozon) Indigokarmin	Abbildung 3.4 Abbildung 3.5 Abbildung 3.6 Abbildung 3.7 Abbildung 3.8	–Unterschied in den Geschwindigkeitskonstanten 1./4. Flasche etwa 88% –Ohne Ozon sehr langsames Ausbleichen –Keine toxischen Wirkungen
Ozonwirkung auf Zellen	1. Morphologie 0,1% w/w Ozon 4h 2. Koloniebildung 0,1% bzw. 0,28% w/w Ozon für 0, 0,5, 1, 2, 4 h	Abbildung 3.10 Abbildung 3.15 Abbildung 3.16 Abbildung 3.17 Abbildung 3.18	–Massive Blasenbildung verringerte Ausbildung von Zellfortsätzen –alle überlebenden Zellen sind noch teilungsfähig

	3. 0,1, 0,2, 0,28 0,35% w/w Ozon für 4 h	Abbildung 3.11 Abbildung 3.14 Abbildung 3.19 Abbildung 3.20 Abbildung 3.22	–Zunehmende Zellschädigung bzw. Abnahme des Glutathion- und ATP-Gehalts bei Steigerung der Ozonkonzentration
	0,1 bzw. 0,28% w/w Ozon für 0, 0,5, 1, 2, 4 h	Abbildung 3.12 Abbildung 3.13 Abbildung 3.21 Abbildung 3.23 Abbildung 3.24	–Zunehmende Zellschädigung bzw. Abnahme des Glutathion- und ATP-Gehalts mit zunehmender Expositionsdauer
Spontanerholung	4 h 0,2, 0,28; 0,35% w/w Ozon dann Nachinkubation mit Mediumwechsel	Abbildung 3.25 Abbildung 3.26	–Gute Spontanerholung bei 0,2% w/w Ozon, bei $\geq 0,28\%$ keine Spontanerholung mehr

4.2 Apparatur

Die Untersuchung von volatilen Chemikalien hat in den letzten 20 Jahren stark an Bedeutung gewonnen [80]. Das Hauptinteresse liegt hierbei auf den Gesundheitsrisiken von Umweltgasen, wie z. B. Ozon. Zunehmend werden hierzu *in vitro* Modelle eingesetzt, die allerdings mitunter schwierig zu interpretieren sind. *In vitro* Modelle besitzen eine Reihe von Vorteilen gegenüber *in vivo* und *ex vivo* Methoden. Zum einen können Ozonkonzentrationen verwendet werden, die aus ethischen Gründen nicht bei Versuchstieren oder gar beim Menschen getestet werden können. Außerdem kann die Antwort verschiedener Zelltypen auf Ozon untersucht und die spezifische Zellantwort besser bestimmt werden [150]. Ein weiterer Punkt ist, dass die Expositionsbedingungen in *in-vitro*-Systemen besser kontrolliert und einfacher reproduziert werden können [82; 151].

Allerdings sind bei einer *in vitro* Exposition zahlreiche technische Schwierigkeiten zu berücksichtigen. Typische Probleme sind die Messung der tatsächlich am Wirkort ankommenden Schadstoffmengen, der mangelhafte direkte Gas-Zell-Kontakt, die Gefahr von Trocknungsartefakten bei längeren Expositionszeiten, sowie unvorhergesehene Reaktionen des Gases mit dem Kulturmedium bzw. den darin enthaltenen Metaboliten aus dem Zellstoffwechsel [120]. Bei der Arbeit mit Ozon ist auch noch die starke Reaktivität des Gases zu beachten. Natürliche Polymere, wie Gummi, Baumwolle, Cellulose und Leder sowie Farben, Elastomere, Kunststoffe, Nylon und Textilfarbstoffe werden durch Ozon angegriffen [85; 86]. Aus diesem Grund sollte darauf geachtet werden, dass alle verwendeten Materialien ozonbeständig sind. Es war zwar nicht möglich, alle anfälligen Teile der Apparatur durch ozonbeständige auszutauschen, aber da die Apparatur täglich auf Dichtigkeit überprüft wurde und beschädigte Teile gegebenenfalls ersetzt wurden, hatte dies auf die Ergebnisse keinen Einfluss.

Die Gewährleistung eines intensiven Gas-Zell-Kontakts gehört zu den Streitpunkten, die wiederholt in Publikationen diskutiert werden [2; 18; 120; 152]. Allerdings sind die Zellen *in vivo* immer von einem Flüssigkeitsfilm bedeckt, der die Zellen an einem direkten Kontakt mit der Gasphase hindert [49]. Außerdem gilt es als gesichert, dass Ozon seine Wirkung nicht durch direkten Kontakt mit den Zellen entfaltet, sondern vor allem durch freie Radikale, besonders Lipidperoxidationsprodukte [115; 113; 101]. Aus diesem Grund wurde für die in der Arbeit geschilderten Versuche die indirekte Exposition in einem reinen Salzpuffer gewählt, so dass die Interaktion von Ozon mit den Zellen im wässrigen Milieu stattfand.

4.2.1 Indigokarmin als Indikator der Ozonkonzentration

Indigokarmin wurde als Indikator gewählt, um die Ozonkonzentrationen, die tatsächlich in den Flaschen vorlagen, bestimmen zu können. Indigokarmin wurde benutzt, da diese Methode in der Literatur als sensitiv gilt und sehr gute Übereinstimmung mit der Kaliumiodid-Methode, die als Referenz gilt, zeigt [56]. Die Verwendung von Indigokarmin zur Abschätzung der Ozonkonzentrationen hatte allerdings einige Nachteile. Zum einen geht die Reaktion mit Ozon so schnell vonstatten, dass der Zeitraum zur Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten in den Flaschen in die Äquilibrierungsphase der Apparatur fällt. Zudem reagierte das durch Ozonolyse aus Indigokarmin entstehende Isatinsulfonat weiter mit Ozon, so dass die Kinetik nach kurzer Zeit nicht mehr stöchiometrisch verlief. Da Indigokarmin wesentlich schneller als Isatinsulfonat mit Ozon reagierte, wurde dies aber vernachlässigt. Laut Guicherit et al [56] verläuft die Reaktion bis zum 40%igen Ausbleichen der Lösung stöchiometrisch. Als großer Vorteil bei der Verwendung von Indigokarmin erwies sich die Tatsache, dass weder Indigokarmin selbst noch die durch Ozonierung entstandenen Produkte schädlich für die Zellen waren. Dadurch ist im Gegensatz zu anderen bekannten Methoden prinzipiell eine Bestimmung der Ozonkonzentration während des Versuchs mit lebenden Zellen möglich.

4.3 Ozonexposition

4.3.1 Morphologische Schäden an den Zellen

Bei der Betrachtung der Zellen mit dem Rasterelektronenmikroskop wurde festgestellt, dass bereits eine Exposition mit 0,100% w/w Ozon massive morphologische Schäden verursachte. Es bildeten sich mehrere zytoplasmatische Blasen, die manchmal 2/3 des Zellkörpervolumens einnahmen. Diese Blasenbildung wird als Indikator für allgemeinen Stress bei Hepatozyten in toxikologischen Test benutzt [15]. Die anfänglich reversible Blasenbildung ist ein Effekt von toxischen, oxidativen und durch Sauerstoffmangel hervorgerufene Schäden [72; 104; 83; 28] und wurde in verschiedenen *in vitro* [98; 30; 144] und *in vivo* [128; 32; 84] Systemen beobachtet. Sie gilt als Konsequenz von Schäden durch oxidativen Stress [97; 72]. Die Blasen wurden als frei von Zellorganellen beschrieben, enthalten aber freie Ribosomen und amorphes Material [149] und treten in verschiedenen Zelllinien auf [143; 144; 89]. Es konnte gezeigt werden, dass ein Verlust von intrazellulären Thiolen ein kritischer Schritt bei der Blasenbildung aufgrund von oxidativen Zellschäden in Hepatozyten ist [90; 73]. Einer Depletion des Glutathiongehalts folgt die Oxidation von Sulfhydrylgruppen im Zytoskelett der Zellen, bei der die Oxidation von Aktin eng verbunden mit der Entstehung von Blasen ist. Dadurch kommt es zu Veränderungen im Zytoskelett, welche eine Modifizierung der Proteinzusammensetzung im Zytoskelett, eine Depletion von Proteinthiolen und eine Vernetzung von Aktin und anderen Polypeptiden einschließt [97]. In vielen Zelllinien ist die Integrität des Aktinzytoskeletts eines der ersten Ziele der Toxizität von ROS [31]. Weitere Faktoren für die Blasenbildung könnten eine Verringerung des ATP-Gehalts [72] und Veränderungen im intrazellulären Ca^{2+} -Gehalt [83] sein. Einmal gebildet können sich diese Blasen entweder von der Zelloberfläche ablösen oder aufreißen und ihren Inhalt an das extrazelluläre Medium abgeben [51]. Möglicherweise ist die Blasenbildung ein Mechanismus, der die Zellen schützt, indem beschädigtes glattes endoplasmatisches Retikulum (SER) und Enzyme sequestriert und entfernt werden [149]. Die Blasenbildung bei Hepatozyten geht einer mitochondrialen Permeabilität voraus, welche wiederum den Verlust der Integrität der Zellmembran zur Folge hat [159].

In unserer Arbeit wurde erstmals nachgewiesen, dass auch eine Ozonexposition *in vitro* Blasenbildung an den Zellen verursacht. Dies könnte, ebenso wie bei Clara-Zellen, unter anderem auf eine Reduzierung des Glutathiongehalts und Oxidation von Thiolen aufgrund von oxidativem Stress zurückzuführen sein.

4.3.2 Vergleich der unterschiedlichen Toxizitätsparameter

In dieser Arbeit wurden unterschiedliche Toxizitätsparameter verwendet, die sich sowohl in ihrer Sensitivität als auch in ihrem Endpunkt unterschieden. Bemerkenswerter Weise stimmte aber das resultierende Gesamtbild im Hinblick auf die toxischen Ozonkonzentrationen gut überein.

Eine der sensitivsten Methoden stellt die Bestimmung der koloniebildenden Fraktion dar [62]. Zudem ist man mit diesem Assay in der Lage, verzögerte Zelltoxizität und Zytostase zu erkennen. Das Einstellen der Zellteilung ist einer der ersten Prozesse, die nach Exposition der Zellkultur mit einem Toxin abläuft.

Der Trypanblau-Test dagegen beruht auf einem Verlust der Membranintegrität der Zellen. Er setzt voraus, dass avitale Zellen die Integrität der Zellmembran verlieren, ist also eine indirekte Methode der Vitalitätsbestimmung. Lipidperoxidation und Veränderungen in der Membranpermeabilität zählen zu den wichtigsten Schäden nach einer Ozonexposition [103]. Daher ist es plausibel, dass der Trypanblau-Test zur Messung der Zellvitalität gut geeignet ist. Ein Vergleich der Ergebnisse des Trypanblau-Tests mit denen aus dem Assay der koloniebildenden Fraktion unterstützt diese Annahme, da bei beiden der Anteil der avitalen bzw. vitalen Zellen korrelierte. Der Nachteil beider Methoden ist die geringe Anzahl ausgezählter Zellen. Zudem können vollständig degenerierte Zellen durch den Trypanblau-Test nicht erfasst werden, da der Farbstoff nicht in den Zellen bleibt. Um die Toxizität nicht zu unterschätzen, muss man auch die Anzahl der vitalen Zellen bestimmen. Dies geschah in dieser Arbeit mittels des Neutralrot-Tests. Dieser besitzt zudem den Vorteil größere Zellmengen zu untersuchen als der Trypanblau-Test. Neutralrot tritt passiv in die Zellen ein. Im Lysosom wird das Molekül aufgrund des niedrigeren pH-Wert geladen und kann nicht mehr in das Zytoplasma diffundieren. Ein Verlust des pH-Gradienten oder der Membranintegrität führt zur Freisetzung des Farbstoffs bzw. Verhinderung einer Ansammlung [44]. Unspezifische Bindungen des Farbstoffs an die Zellkultur können zu unrichtigen Darstellungen führen. Das Ergebnis des Neutralrot-Tests ergänzte den Trypanblau-Test, es kann also davon ausgegangen werden, dass in beiden Tests tatsächlich die Vitalität richtig bestimmt und nicht durch Artefakte verfälscht wurde. Da der Bereich der Ozonkonzentration, in dem die Zellen eine deutliche Wirkung zeigen, sehr klein ist, wirken sich im Konzentrationsbereich um 0,28% w/w kleine Konzentrationsunterschiede und eine unterschiedliche Robustheit der Zellen stark aus, was bei dieser Konzentration die relativ hohe Standardabweichung beim Trypanblau- und Neutralrot-Test erklärt.

Der Redoxstatus der Zelle ist ein wichtiger Parameter bezüglich der Wirkung von freien Radikalen und oxidativem Stress. Es wurde empfohlen, dass das GSSG/2GSH Paar, ein wichtiges Redoxpaar in der Zelle, ein angemessener Parameter ist, um diesen Status zu untersuchen [129]. In unter-

schiedlichen Zelltypen ist Glutathion eine der ersten zellulären Verteidigungen gegen oxidativen Stress, indem es als wichtigster intrazellulärer Redoxpuffer dient [33; 93]. Zudem kann Glutathion die Reparatur geschädigter Zellen und Geweben in die Wege leiten und somit die Lunge widerstandsfähiger machen [117].

In einigen Studien wurde bereits der Einfluss von Ozon auf den Glutathiongehalt untersucht. In Versuchen mit humanen Monozyten (THP-1), fiel nach einer 30 minütigen Exposition mit 0,5 ppm Ozon und anschließender 4 stündiger Inkubation der Gesamtglutathiongehalt um etwa 80% ab [49]. Auch eine Exposition von Rattenalveolarmakrophagen (0,45 ppm für 0-60 min) führte zu einer Freisetzung von reduziertem und oxidiertem Glutathion [8]. Die Exposition von L929 Zellen mit Ozon (10 $\mu\text{mol}/\text{min}$ für 0-80 min) führte ebenfalls zu einer Erniedrigung des Glutathiongehalts [146]. Hierbei stieg der Gehalt an oxidiertem Glutathion in den ersten 10 Minuten um etwa 40% an und fiel in den nächsten 40 Minuten wieder auf Ausgangsniveau ab. Der GSH-Gehalt nahm dagegen kontinuierlich ab. Dies deckt sich mit den Ergebnissen unserer Arbeit. Der Gesamtglutathiongehalt stieg in den ersten 30 Minuten erst leicht an und fiel dann wieder ab. Interessant war, dass ein direkter Kontakt der Zellen mit Ozon wie bei den Versuchen von Van der Zee et al. ähnliche Ergebnisse lieferte wie bei der indirekten Exposition. Auch Versuche mit A549 Zellen und Ozon (23 nmol/Petrischale für 2,5 h) führten zu einer Verringerung sowohl des GSH- als auch des GSSG-Gehalts um etwa 20-35%. Wurde der GSH-Gehalt vor Beginn des Versuchs verringert, erhöhte sich die Empfindlichkeit auf Ozon [122]. Es wurde angenommen, dass Glutathion Ozon direkt abfängt und/oder eine Voraussetzung für die Regeneration anderer Zellkomponenten ist.

In Clara-Zellen ist die Verringerung des Glutathiongehalts ein kritischer Schritt für die Blasenbildung nach Naphthalen-Exposition [110]. Es wird auch vermutet, dass das Glutathion-Redox-System die Produktion von Zytokinen wie IL-8 in menschlichen Epithelzellen der Luftwege (Calu-3 Zellen) steuert [141].

GSH ist in der Lage Typ-II-Alveolarepithelzellen vor einer Reihe von oxidativen Stressoren zu schützen [21; 71; 60] und eine Modulation des Glutathiongehalts kann die Toxizität einer Vielzahl von Lungenschadstoffen erhöhen bzw. unterdrücken. So wurde beispielsweise festgestellt, dass eine Behandlung mit Buthionin-Sulfoximin, einem γ -Glutamylcystein Synthetase-Hemmer, eine Ozon-induzierte Lungenfibrose bei Mäusen verschlimmert [137]. Ratten deren Glutathiongehalt durch Vorbehandlung mit Diethylmaleat reduziert wurde und anschließend mit Sauerstoff exponiert wurden, zeigten eine erhöhte Sterblichkeit [34]. Eine Verringerung des GSH-Gehalts hat also umfangreiche Konsequenzen auf den Schutz der Lunge vor oxidativem Stress und kann zu einer Verstärkung der Schäden bis hin zum Tod führen [69]

Ein weiterer oft in Toxizitätsstudien verwendeter Parameter ist der ATP-Gehalt der Zelle. Ozon ist in der Lage unterschiedliche funktionale Gruppen in Proteinen, Enzymen und Nukleinsäuren zu oxidieren [103]. Dadurch kommt es zu einem Verlust der Aktivität vor allem von zytoplasmatischen Enzymen, wie z.B. der Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase und der Pyruvatkinase. Mitochondriale und lysosomale Enzyme dagegen verlieren ihre Aktivität erst nachdem schon erhebliche Schäden an der Zellmembran stattgefunden haben [146]. Dies entsprach den Ergebnissen unserer Arbeit mit niedrigeren Ozonkonzentrationen. Der ATP-Gehalt nahm in dem Maß ab, wie die Zellen abstarben.

Eine Konsequenz der Verringerung des intrazellulären ATP-Gehalts ist die Bildung von Plasmamembran-Blasen [133; 83]. Monomeres Aktin besitzt vier Thiolgruppen, von denen drei durch ATP maskiert sind. Deshalb erhöht eine Reduzierung des intrazellulären ATP-Gehalts wahrscheinlich auch die Empfindlichkeit auf oxidativen Stress [97]. Dies könnte auch bei der Toxizität von Ozon eine Rolle spielen.

Ahmad et al [1] stellten fest, dass bei A549 Zellen bei Kurzzeitexpositionen mit Ozon erhöhte Mengen an ATP im Medium auftraten. Dieses extrazelluläre ATP moduliert wichtige Signalprozesse und spielt eine entscheidende Rolle für das Überleben der Zellen. Dieser Effekt könnte die erhöhte Abnahme des ATP-Gehalts bei höheren Ozonkonzentrationen und bei den L929 Zellen am Anfang der Expositionszeit erklären. Eine andere Erklärung wäre, dass die Zellen einen erhöhten Energiebedarf für die Entgiftung des Ozons bzw. notwendige zelluläre Reparaturprozesse haben.

4.3.3 Vergleich der beiden Zelllinien

Der Vergleich der beiden Zelllinien zeigt wenig Unterschiede in ihrer Reaktion auf Ozon. Dies trifft für alle untersuchten Parameter zu. Oxidative Schäden an Zellen entwickeln sich entsprechend eines generellen Musters in verschiedenen Zelllinien [95]. L929 Zellen zeigen zwar eine geringfügig höhere Empfindlichkeit, was durch den etwas niedrigeren Glutathiongehalt erklärt werden könnte. Allerdings sind die Unterschiede eher minimal. Plopper et al [109] untersuchten den Zusammenhang zwischen Glutathionkonzentration und Ozonempfindlichkeit bei Rhesusaffen. Sie stellten fest, dass sowohl die steady-state-Konzentration von Glutathion entscheidend für die Empfindlichkeit ist, als auch die Möglichkeit den GSH-Pool zu regulieren. Abweichungen in der Toxizität sind wahrscheinlich nicht auf Unterschiede in der Enzymaktivität für die Konjugation zurückzuführen [36], sondern auf die Befähigung einen verringerten GSH-Gehalt wiederherzustellen [37].

Malorni et al [89] inkubierten eine Vielzahl von Zelllinien unterschiedlicher Herkunft mit Menadion. Menadion generiert ROS und wirkt dadurch zytotoxisch. Auch hier waren die

zytopathologischen Veränderungen ähnlich in den verschiedenen Zelllinien. Lediglich zwischen adhärent wachsenden Zelllinien und nicht-adhären Zelllinien wurde ein quantitativer Unterschied festgestellt.

4.4 Spontanerholung

Ein wichtiger Punkt für eine mögliche therapeutische Intervention bei Ozonschäden war die Feststellung des Konzentrationsbereichs, in dem die Schäden noch reversibel sind. Deshalb wurde die Spontanerholung der Zellen am Parameter des Glutathiongehalts untersucht. Bei einer Konzentration von 0,2% w/w Ozon für 4 Stunden stieg der Glutathiongehalt innerhalb von 20 Stunden wieder auf den Kontrollwert an, nachdem das Kulturmedium gewechselt worden war. Ein Zusatz von Serum war während der Nachinkubationszeit nicht notwendig. Eine vergleichbare Erholung des Glutathiongehalts wurde auch bei THP-1 Zellen festgestellt [49]. Ob dies allerdings tatsächlich darauf zurückzuführen ist, dass sich die zuvor geschädigten Zellen wieder erholt haben, lässt sich nicht mit Sicherheit sagen. Es wäre auch möglich, dass lediglich die nicht geschädigten Zellen als Reaktion auf den oxidativen Stress vermehrt Glutathion produzierten und dadurch die toten Zellen kompensiert haben. Dies würde dem Verhalten von Clara-Zellen nach Exposition mit Naphthalen *in situ* entsprechen. Eine Subpopulation behielt ihren GSH-Pool, während eine andere Subpopulation ihren Pool sehr schnell verlor [156; 25].

Eine Studie bei Naphthalen-exponierten Clara-Zellen zeigte ferner, dass die zellulären Schäden irreversibel werden und zur Nekrose führen, wenn die intrazelluläre GSH-Konzentration unter einen bestimmten Schwellenwert fällt [110]. Bevor mehr als die Hälfte der Clara-Zellen nicht 75% ihrer ursprünglichen intrazellulären GSH-Konzentration eingebüßt hatten, waren die zellulären Veränderungen reversibel. Dies würde auch in etwa den von uns gemessenen Werten entsprechen, bei denen Spontanerholung noch möglich war. Frühere Studien an der ganzen Lunge zeigten ebenfalls, dass es einen GSH-Schwellenwert für Toxizität und kovalente Bindung von reaktiven Metaboliten gibt [153].

Auch bei den biochemischen Änderungen nach Ozonexposition in der Lunge wurde eine Reversibilität festgestellt [102; 27; 108].

Ob eine therapeutische Intervention bei höheren Ozonkonzentrationen, bei denen keine Spontanerholung mehr stattfand, einen Nutzen hat, wurde in unserer Arbeit nicht untersucht. Vorstellbar wäre beispielsweise eine Behandlung mit *N*-Acetylcystein [138] oder mit Nacystelyn, das in der Lage ist den intrazellulären Glutathiongehalt zu erhöhen [54].

4.5 Ausblick

Die hier geschilderten Versuche zeigen, dass die Apparatur auch für das Studium toxischer Effekte von Ozon *in vitro* verwendet werden kann. Allerdings sollten noch einige apparative Verbesserungen stattfinden. Man könnte zum Beispiel ein Durchlaufsystem entwickeln, bei dem es möglich ist, während des laufenden Prozesses Proben zu nehmen, ohne die Flaschen aus dem Testgasstrom zu entfernen. Eine weitere Verbesserung wäre die Verwendung eines Farbstoffes, der langsamer durch Ozon ausgebleicht wird und dessen Produkte nicht mehr mit Ozon reagieren. So könnten die Geschwindigkeitskonstanten genauer bestimmt werden, da die Probenentnahme nicht mehr in die Äquilibrierungsphase der Apparatur fällt und keine störenden Folgereaktionen stattfinden.

Um zu klären, in welchem Umfang Strukturen der Zellmembran betroffen sind und welche Vorgänge für eine gute Spontanerholung der Zellen wichtig sind, könnte die Glucoseaufnahme der Zellen mittels radioaktiv markierter Glucose untersucht werden. Korreliert dabei die Aufnahmefähigkeit der Zellen mit der Erholung der Zellen, spräche dies für einen echten Reparaturmechanismus, bei dem die zerstörten Transportsysteme durch funktionierende ausgetauscht werden.

5 Zusammenfassung

Ozon ist die Leitkomponente des Sommersmogs und wird industriell in hohen Konzentrationen in der Abwasserbehandlung und in der Trinkwasserdesinfektion eingesetzt. Die toxischen Wirkungen von hohen Ozonkonzentrationen in Zellen sind bisher nur unzureichend untersucht.

Das Ziel dieser Arbeit war es zu prüfen, ob die Expositionsapparatur für die Exposition der Zellen mit Ozon geeignet ist und die Wirkungen von hohen Ozonkonzentrationen bei indirekter Exposition auf zwei unterschiedlichen Zelllinien mittels verschiedener Parameter zu untersuchen. Zusätzlich wurde die Reversibilität der Schädigung überprüft.

Zunächst wurde untersucht, ob eine Exposition von Zellen mit Ozon mit der vorhandenen Expositionsapparatur technisch möglich war und ob ein geeigneter Indikator zur Bestimmung der Ozonkonzentration während des laufenden Versuchs zu finden war. Die Evaluation der Apparatur ergab, dass nach einer etwa 20 min. Äquilibrierungszeit die vier in Serie geschalteten Flaschen die gleiche Ozonkonzentration in der Gasphase erhielten und die Bedingungen gut reproduzierbar waren. Der aus der Literatur bekannte Farbstoff Indigokarmin wurde als Indikator für die Ozonkonzentration geprüft. Es wurde festgestellt, dass dieser zwar keine toxische Wirkung auf die Zellen hat, aber zu schnell durch die verwendeten hohen Konzentrationen ausbleicht. Deshalb ist er als Indikator für diese Versuchsanordnung nur bedingt geeignet.

Des Weiteren wurden zwei unterschiedliche Zelllinien (A549 und L929) mit verschiedenen Ozonkonzentrationen exponiert und die Wirkung auf mehrere Endpunkte untersucht.

Eine morphologische Untersuchung im Rasterelektronenmikroskop zeigte eine massive Blasenbildung („blebbing“) bei 0,1% w/w Ozon in der Gasphase. Zur Feststellung der Zytotoxizität wurden Farbstoff-Tests (Trypanblau- und Neutralrot-Assay) gemacht, deren Ergebnisse sich gegenseitig ergänzten. Bei 0,1% w/w Ozon war bei etwa 20-30% der Zellen, bei 0,28% w/w bei etwa 70% und bei 0,35% bei allen Zellen die Membranintegrität nicht mehr vorhanden. Es zeigte sich, dass alle Zellen, die nach der Exponierung noch intakt waren, voll teilungsfähig waren.

Die Untersuchung des Glutathiongehalts, der als Indikator für den Redoxstatus der Zelle verwendet wurde, und des ATP-Gehalts, der den Energiehaushalt widerspiegelt, ergab, dass beide mit Erhöhung der Ozonkonzentration abfielen.

Außerdem wurde im Vorgriff auf mögliche therapeutische Interventionen die Spontanerholung der durch Ozon geschädigten Zellen getestet. Dabei wurde festgestellt, dass nach einer Reduktion des Glutathiongehalts auf etwa 66% des Ausgangswertes nach 20 stündiger Nachinkubation im Brutschrank wieder der Glutathiongehalt nicht exponierter Kontrollzellen erreicht wurde. Nach

einer Reduktion des Glutathiongehalts auf etwa ein Drittel des Ausgangswertes war keine Spontanerholung mehr möglich.

Bemerkenswert war schließlich, dass die untersuchten Zelllinien aus Mensch (A549) und Maus (L929) kaum Unterschiede in der Empfindlichkeit gegenüber Ozon zeigten.

6 Anhang

Tabelle 6.1 zu Abbildung 3.3: Charakterisierung der Ozonapparatur

Zeit in Minuten	Ozonkonzentration (ohne Zellen) in % w/w	Mittelwert	Mittelwert in ppm	Ozonkonzentration (mit Zellen) in % w/w	Mittelwert	Mittelwert in ppm
5	0,009 0,017 0,017 0,013 0,002 0,005 0,011 0,005 0,005 0,006 0,007	0,009 ± 0,005	59,79 ± 32,81	0,016 0,01 0,006 0,011 0,013 0,006 0,006 0,008	0,010 ± 0,003	64,41 ± 23,49
10	0,047 0,053 0,056 0,044 0,037 0,037 0,051 0,037 0,04 0,045 0,038	0,044 ± 0,007	298,94 ± 44,92	0,055 0,049 0,042 0,043 0,047 0,046 0,045 0,043 0,036	0,045 ± 0,005	305,85 ± 33,44
15	0,053 0,059 0,063 0,06 0,046 0,044 0,06 0,047 0,052 0,056 0,048	0,053 ± 0,006	362,42 ± 42,52	0,063 0,054 0,054 0,054 0,059 0,059 0,056 0,05 0,055	0,056 ± 0,004	379,68 ± 24,34
20	0,056 0,061 0,065 0,066 0,052 0,047 0,062 0,049 0,056 0,05	0,056 ± 0,006	382,39 ± 44,06	0,065 0,058 0,059 0,061 0,061 0,062 0,055 0,06	0,060 ± 0,003	407,65 ± 18,70

Zeit in Minuten	Ozonkonzentration (ohne Zellen) in % w/w	Mittelwert	Mittelwert in ppm	Ozonkonzentration (mit Zellen) in % w/w	Mittelwert	Mittelwert in ppm
25	0,058 0,064 0,065 0,065 0,056 0,055 0,063 0,051 0,058 0,053	0,059 ± 0,005	398,66 ± 33,19	0,066 0,062 0,061 0,063 0,063 0,058 0,061	0,062 ± 0,002	420,36 ± 15,38
30	0,06 0,064 0,067 0,066 0,056 0,059 0,067 0,055 0,059 0,067 0,054	0,061 ± 0,005	415,43 ± 32,97	0,067 0,063 0,062 0,064 0,063 0,065 0,062 0,063 0,062	0,063 ± 0,002	430,15 ± 10,65
60	0,062 0,065 0,067 0,068 0,064 0,065 0,068 0,057 0,067 0,071 0,059	0,065 ± 0,004	439,47 ± 26,78	0,068 0,065 0,066 0,066 0,066 0,065 0,065 0,066	0,066 ± 0,001	446,63 ± 6,29
90	0,064 0,065 0,068 0,07 0,067 0,068 0,069 0,061 0,069 0,063	0,066 ± 0,003	450,19 ± 19,22	0,068 0,066 0,067 0,07 0,068 0,069 0,069 0,067 0,068	0,068 ± 0,001	461,04 ± 7,83

Zeit in Minuten	Ozonkonzentration (ohne Zellen) in % w/w	Mittelwert	Mittelwert in ppm	Ozonkonzentration (mit Zellen) in % w/w	Mittelwert	Mittelwert in ppm
120	0,068 0,067 0,069 0,071 0,069 0,068 0,072 0,064 0,071 0,064	0,068 ± 0,003	463,07 ± 17,69	0,07 0,072 0,073 0,072 0,073 0,073 0,071 0,073 0,069	0,072 ± 0,001	486,65 ± 9,47
240	0,072 0,073 0,078 0,073 0,076 0,075 0,078 0,072 0,076	0,075 ± 0,002	506,99 ± 15,25	0,075 0,077 0,076 0,076 0,079 0,078 0,075 0,077 0,074	0,076 ± 0,001	517,54 ± 10,11
Kurzschluss vor	0,105 0,098 0,102 0,106 0,106 0,103 0,106 0,11 0,11 0,1 0,102 0,104 0,108 0,11 0,104 0,105 0,108 0,106 0,11 0,105	0,105 ± 0,003	714,61 ± 22,32			
Kurzschluss nach	0,117 0,109 0,111 0,12 0,116 0,113 0,115 0,119 0,117 0,11 0,109 0,111	0,115 ± 0,004	778,57 ± 24,37			

Zeit in Minuten	Ozonkonzentration (ohne Zellen) in % w/w	Mittelwert	Mittelwert in ppm	Ozonkonzentration (mit Zellen) in % w/w	Mittelwert	Mittelwert in ppm
	0,12					
	0,116					
	0,113					
	0,115					
	0,119					
	0,117					

Tabelle 6.2 zu Abbildung 3.4: Geschwindigkeit des Ausbleichens von Indigokarmin bei 0,100% w/w Ozon in der 1. Flasche

Zeit in Minuten	Extinktion bei 610nm	Ln der Extinktion	Mittelwert
0	1,816	0,597	0,612
	1,877	0,630	
	1,784	0,579	
	1,863	0,622	
	1,884	0,633	
3	0,885	-0,122	-0,007
	0,94	-0,062	
	1,008	0,008	
	1,148	0,138	
	1,005	0,005	
6	0,485	-0,724	-0,560
	0,647	-0,435	
	0,485	-0,724	
	0,631	-0,460	
	0,633	-0,457	
9	0,312	-1,165	-1,152
	0,317	-1,149	
	0,328	-1,115	
	0,306	-1,184	
	0,317	-1,149	

Tabelle 6.3 zu Abbildung 3.5: Geschwindigkeit des Ausbleichens von Indigokarmin bei 0,100% w/w Ozon in der 4. Flasche

Zeit in Minuten	Extinktion bei 610nm	Ln der Extinktion	Mittelwert
0	1,816	0,597	0,579
	1,73	0,549	
	1,877	0,630	
	1,626	0,486	
	1,884	0,633	
3	1,106	0,101	0,060
	1,015	0,015	
	1,06	0,058	
	1,016	0,016	
	1,114	0,108	
6	0,629	-0,464	-0,450
	0,673	-0,396	
	0,657	-0,420	
	0,602	-0,507	
	0,628	-0,465	

Tabelle 6.4 zu Abbildung 3.6: Ausbleichen des Indigokarmins im Verlauf der Zeit bei A459 und L929 Zellen

Zeit in Minuten	Extinktion bei 610 nm (A549 Zellen)	Mittelwert	Ln	Extinktion bei 610 nm (L929 Zellen)	Mittelwert	Ln
0	1,65 1,64 1,631	1,64 ± 0,01	0,495	1,111 1,485	1,298 ± 0,187	0,261
30	1,60 1,56 1,567 1,58 1,59	1,58 ± 0,02	0,456	1,093 1,353 1,389	1,278 ± 0,132	0,246
60	1,56 1,60 1,538 1,55 1,57	1,56 ± 0,02	0,447	1,072 1,326 1,377	1,258 ± 0,133	0,230
120				1,053 1,209 1,323	1,195 ± 0,111	0,178
240	1,40 1,48 1,39 1,48	1,44 ± 0,04	0,361	0,981 1,188 1,233	1,134 ± 0,110	0,126
1440	0,87 0,88 1,114 0,86 1,04	0,95 ± 0,10	-0,050	0,648 0,852 0,822	0,774 ± 0,090	-0,256

Tabelle 6.5 zu Abbildung 3.7: Formazanbildung der Zellen nach Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen Indigokarmin in HBSS bei A549 und L929 Zellen

Indigokarminkonzentration in μM	Extinktion A549 $\Delta E (E_{450\text{nm}} - E_{690\text{nm}})$	Mittelwert	Extinktion L929 $\Delta E (E_{450\text{nm}} - E_{690\text{nm}})$	Mittelwert
0	3,140 3,143 3,148 3,126 3,130 3,143	3,138 ± 0,008	2,882 2,981 2,949 2,951 2,867 2,883	2,919 ± 0,043
3	3,146 3,178 3,171 3,077 3,159 3,135 3,072 2,963 2,498	3,044 ± 0,204	2,988 2,941 2,902 2,874 2,833 2,877 2,616 2,309 2,513	2,762 ± 0,217

Indigokarminkonzentration in μM	Extinktion A549 $\Delta E (E_{450\text{nm}}-E_{690\text{nm}})$	Mittelwert	Extinktion L929 $\Delta E (E_{450\text{nm}}-E_{690\text{nm}})$	Mittelwert
10	3,227 3,182 3,175 3,159 3,161 3,109 3,136 3,133 3,117 2,780 3,030	$3,110 \pm 0,115$	2,756 2,998 2,983 2,760 2,696 2,428	$2,770 \pm 0,192$
30	2,952 2,949 2,773 2,901 3,032 2,874 2,748 2,671 3,010	$2,879 \pm 0,117$	2,490 2,619 2,517 2,543 2,570 2,522	$2,543 \pm 0,042$
100	2,790 2,586 2,763 2,485 2,804 2,715 3,070 3,136 3,079 2,793	$2,822 \pm 0,203$	2,662 2,621 2,403 2,383	$2,581 \pm 0,141$
300	2,826 2,420 2,487 2,526 2,816 2,772 2,481 2,464 2,478 2,743	$2,601 \pm 0,157$	2,868 2,958 2,917 2,857 2,851 2,450 2,459 2,435 2,502	$2,700 \pm 0,216$
1000	2,712 2,932 2,899 2,910 2,721 2,932 2,610 2,755 2,509 2,717 2,333 2,626	$2,721 \pm 0,177$	3,003 2,878 2,890 2,673 2,868 2,690 2,728 2,781 2,429 2,514	$2,745 \pm 0,168$

Tabelle 6.6 zu Abbildung 3.8: Formazanbildung der Zellen nach Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen ozonierter Indigokarminlösung (0,100% w/w für 4 Stunden) in HBSS bei A549 und L929 Zellen

Ozonierte Indigokarminkonzentration in μM	Extinktion A459 $\Delta E (E_{450\text{nm}}-E_{690\text{nm}})$	Mittelwert	Extinktion L929 $\Delta E (E_{450\text{nm}}-E_{690\text{nm}})$	Mittelwert
0	2,598	$2,495 \pm 0,222$	1,597	$1,663 \pm 0,218$
	2,455		2,067	
	2,219		1,826	
	2,052		1,743	
	2,651		1,446	
	2,649		1,582	
	2,626		1,230	
	2,707		1,745	
			1,755	
			1,795	
10	2,564	$2,457 \pm 0,106$	1,611	$1,516 \pm 0,104$
	2,536		1,377	
	2,293		1,561	
	2,434			
30	2,642	$2,509 \pm 0,079$	1,734	$1,633 \pm 0,101$
	2,474		2,556	
	2,479		2,252	
	2,439		1,531	
100	2,662	$2,517 \pm 0,125$	1,528	$1,654 \pm 0,089$
	2,621		1,725	
	2,403		1,708	
	2,383			
300	2,618	$2,474 \pm 0,132$	2,056	$1,699 \pm 0,251$
	2,538		1,591	
	2,478		1,452	
	2,261			
1000	1,558	$1,697 \pm 0,110$	1,521	$1,557 \pm 0,088$
	1,743		1,455	
	1,635		1,694	
	1,850			

Tabelle 6.7 zu Abbildung 3.11: Trypanblau-Test der Zellen bei verschiedenen Ozonkonzentrationen

Ozonkonzentration in % w/w	Prozentsatz gefärbter A549 Zellen	Mittelwert	Prozentsatz gefärbter L929 Zellen	Mittelwert
0	6,50%	$6,91\% \pm 3,59\%$	4,00%	$9,95\% \pm 5,18\%$
	12,50%		7,00%	
	9,00%		7,50%	
	6,00%		10,00%	
	8,00%		4,50%	
	12,00%		7,50%	
	9,50%		15,00%	
	10,50%		22,50%	
	7,50%		3,00%	
	8,50%		9,00%	
	9,00%		23,50%	
	8,00%		22,50%	
	19,00%		23,50%	
	6,50%		22,50%	

Ozonkonzentration in % w/w	Prozentsatz gefärbter A549 Zellen	Mittelwert	Prozentsatz gefärbter L929 Zellen	Mittelwert
	4,00%		10,00%	
	4,00%		7,50%	
	6,00%		7,00%	
	3,50%		10,00%	
	5,00%		10,00%	
	4,00%		9,50%	
	10,00%		10,00%	
	5,00%		1,00%	
	3,00%		13,00%	
	5,50%		5,00%	
	5,00%		7,00%	
	4,00%		8,00%	
	10,00%		12,50%	
	4,00%		5,50%	
	2,00%		6,00%	
	10,50%		8,00%	
	4,00%		6,00%	
	1,00%		10,00%	
	5,00%		9,00%	
			9,00%	
			6,00%	
			7,00%	
			10,50%	
			8,00%	
			6,00%	
			9,50%	
			12,50%	
			12,00%	
			11,00%	
			9,00%	
			10,50%	
			9,00%	
			10,50%	
0,1 bzw. 0,08	22,00%	22,25% ± 9,92%	5,00%	26,65% 14,09%
	21,50%		4,50%	
	16,00%		5,50%	
	21,50%		6,50%	
	11,50%		32,50%	
	19,00%		28,50%	
	14,50%		31,00%	
	15,00%		30,00%	
	40,00%		36,00%	
	36,50%		42,50%	
	38,00%		31,50%	
	31,00%		51,50%	
	11,50%		57,50%	
	20,50%		61,50%	
	10,00%		46,00%	
	18,00%		27,50%	
	29,00%		31,50%	
	30,00%		24,50%	
	25,00%		39,50%	

Ozonkonzentration in % w/w	Prozentsatz gefärbter A549 Zellen	Mittelwert	Prozentsatz gefärbter L929 Zellen	Mittelwert
	39,00% 34,00% 31,00% 9,00% 16,00% 10,50% 8,50%		47,00% 33,50% 39,50% 47,00% 33,50% 17,50% 23,50% 17,00% 15,00% 23,00% 30,00% 20,00% 18,00% 20,00% 18,00% 16,00% 10,50% 16,00% 15,00% 15,00% 12,00% 20,00% 19,50%	
0,2	21,00% 21,50% 26,50% 32,00% 32,50% 30,00% 31,50% 15,00% 13,50% 12,50% 9,00%	22,00% ± 8,04%	28,00% 15,00% 21,00% 14,00% 26,50% 70,50% 69,50% 33,50% 19,00% 31,50% 29,00% 20,50% 13,00% 35,50% 39,50% 21,50% 13,00% 16,00% 14,00% 20,00%	27,53% ± 16,13%

Ozonkonzentration in % w/w	Prozentsatz gefärbter A549 Zellen	Mittelwert	Prozentsatz gefärbter L929 Zellen	Mittelwert
0,28	61,00% 71,50% 73,50% 56,00% 77,00% 68,00% 86,00% 68,00% 100,00% 100,00% 96,00% 95,00% 82,00% 84,00% 54,00% 63,50% 100,00% 89,50% 20,00% 19,50% 58,00% 60,00%	71,93% ± 22,19%	93,50% 96,00% 91,50% 84,00% 85,00% 100,00% 97,50% 94,50% 36,00% 39,50% 36,50% 64,00% 59,00% 35,00% 50,50%	70,83% ± 24,94%
0,35	99,50% 100,00% 98,50% 100,00% 100,00% 100,00% 100,00% 100,00% 100,00% 99,00% 100,00% 99,50%	99,71% ± 0,48%	100,00% 100,00% 98,50% 90,00% 100,00% 100,00% 100,00% 99,50%	98,50% ± 3,25%

Tabelle 6.8 zu Abbildung 3.12: Trypanblau-Test in Abhängigkeit der Expositionsdauer bei 0,1% w/w bzw. 0,08% w/w Ozonexposition

Zeit in Stunden	Prozentsatz gefärbter A549 Zellen	Mittelwert	Prozentsatz gefärbter L929 Zellen	Mittelwert
0	6,50% 12,50% 9,00% 6,00% 8,00% 12,00% 9,50% 10,50% 7,50% 8,50% 9,00% 8,00% 19,00% 6,50%	6,91% ± 3,59%	4,00% 7,00% 7,50% 10,00% 4,50% 7,50% 15,00% 22,50% 3,00% 9,00% 23,50% 22,50% 23,50% 22,50%	9,95% ± 5,18%

Zeit in Stunden	Prozentsatz gefärbter A549 Zellen	Mittelwert	Prozentsatz gefärbter L929 Zellen	Mittelwert
	4,00%		10,00%	
	4,00%		7,50%	
	6,00%		7,00%	
	3,50%		10,00%	
	5,00%		10,00%	
	4,00%		9,50%	
	10,00%		10,00%	
	5,00%		1,00%	
	3,00%		13,00%	
	5,50%		5,00%	
	5,00%		7,00%	
	4,00%		8,00%	
	10,00%		12,50%	
	4,00%		5,50%	
	2,00%		6,00%	
	10,50%		8,00%	
	4,00%		6,00%	
	1,00%		10,00%	
	5,00%		9,00%	
			9,00%	
			6,00%	
			7,00%	
			10,50%	
			8,00%	
			6,00%	
			9,50%	
			12,50%	
			12,00%	
			11,00%	
			9,00%	
			10,50%	
			9,00%	
			10,50%	
0,5	15,00%	11,40% ± 4,95%	22,50%	12,08% ± 6,13%
	13,50%		26,00%	
	2,00%		15,00%	
	11,00%		6,00%	
	15,50%		6,00%	
			13,00%	
			6,00%	
			10,50%	
			7,50%	
			10,50%	
			10,50%	
			11,50%	

Zeit in Stunden	Prozentsatz gefärbter A549 Zellen	Mittelwert	Prozentsatz gefärbter L929 Zellen	Mittelwert
1	18,50% 14,00% 8,00% 6,00% 17,00% 20,00%	13,92% ± 5,25%	14,00% 23,00% 16,00% 18,50% 12,00% 9,00% 11,50% 14,00% 15,00% 20,50% 10,00% 17,50%	15,08% ± 4,06%
2	23,50% 13,00% 15,00% 9,00% 25,00%	17,10% ± 6,17%	20,00% 17,00% 30,00% 20,50% 17,00% 17,50% 10,00% 25,00% 18,50% 11,50% 16,50% 24,00%	18,96% ± 5,32%
4	22,00% 21,50% 16,00% 21,50% 11,50% 19,00% 14,50% 15,00% 40,00% 36,50% 38,00% 31,00% 11,50% 20,50% 10,00% 18,00% 29,00% 30,00% 25,00% 39,00% 34,00% 31,00% 9,00% 16,00% 10,50% 8,50%	22,25% ± 9,92%	5,00% 4,50% 5,50% 6,50% 32,50% 28,50% 31,00% 30,00% 36,00% 42,50% 31,50% 51,50% 57,50% 61,50% 46,00% 27,50% 31,50% 24,50% 39,50% 47,00% 33,50% 39,50% 47,00% 33,50% 17,50% 23,50% 17,00% 15,00%	26,65% 14,09%

Zeit in Stunden	Prozentsatz gefärbter A549 Zellen	Mittelwert	Prozentsatz gefärbter L929 Zellen	Mittelwert
			23,00%	
			30,00%	
			20,00%	
			18,00%	
			20,00%	
			18,00%	
			16,00%	
			10,50%	
			16,00%	
			15,00%	
			15,00%	
			12,00%	
			20,00%	
			19,50%	

Tabelle 6.9 zu Abbildung 3.13: Trypanblau-Test in Abhängigkeit der Expositionsdauer bei 0,28% w/w Ozonexposition:

Zeit in Stunden	Prozentsatz gefärbter A549 Zellen	Mittelwert	Prozentsatz gefärbter L929 Zellen	Mittelwert
0	6,50%	6,91% ± 3,59%	4,00%	9,95% ± 5,18%
	12,50%		7,00%	
	9,00%		7,50%	
	6,00%		10,00%	
	8,00%		4,50%	
	12,00%		7,50%	
	9,50%		15,00%	
	10,50%		22,50%	
	7,50%		3,00%	
	8,50%		9,00%	
	9,00%		23,50%	
	8,00%		22,50%	
	19,00%		23,50%	
	6,50%		22,50%	
	4,00%		10,00%	
	4,00%		7,50%	
	6,00%		7,00%	
	3,50%		10,00%	
	5,00%		10,00%	
	4,00%		9,50%	
	10,00%		10,00%	
	5,00%		1,00%	
	3,00%		13,00%	
	5,50%		5,00%	
	5,00%		7,00%	
	4,00%		8,00%	
	10,00%	12,50%		
	4,00%	5,50%		
	2,00%	6,00%		
	10,50%	8,00%		
	4,00%	6,00%		
	1,00%	10,00%		
	5,00%	9,00%		
		9,00%		

Zeit in Stunden	Prozentsatz gefärbter A549 Zellen	Mittelwert	Prozentsatz gefärbter L929 Zellen	Mittelwert
			6,00% 7,00% 10,50% 8,00% 6,00% 9,50% 12,50% 12,00% 11,00% 9,00% 10,50% 9,00% 10,50%	
0,5	23,00% 16,50% 37,00% 23,50% 13,00% 10,00%	20,50% ± 8,85%	17,00% 17,50% 10,50% 13,00% 13,00% 13,50% 22,00% 14,50%	15,13% ± 3,35%
1	32,00% 26,50% 17,00% 26,00% 20,50% 14,00%	22,67% ± 6,12%	21,00% 17,00% 17,00% 10,00% 20,50% 15,00% 25,00% 16,00%	17,69% ± 4,22%
2	66,00% 56,00% 43,00% 27,00% 47,00% 27,50%	44,42% ± 14,13%	30,00% 19,00% 23,00% 17,00% 24,00% 22,50% 28,00% 39,00%	25,31% ± 6,52%
4	61,00% 71,50% 73,50% 56,00% 77,00% 68,00% 86,00% 68,00% 100,00% 100,00% 96,00% 95,00% 82,00% 84,00% 54,00%	71,93% ± 22,19%	93,50% 96,00% 91,50% 84,00% 85,00% 100,00% 97,50% 94,50% 36,00% 39,50% 36,50% 64,00% 59,00% 35,00% 50,50%	70,83% ± 24,94%

Zeit in Stunden	Prozentsatz gefärbter A549 Zellen	Mittelwert	Prozentsatz gefärbter L929 Zellen	Mittelwert
	63,50%			
	100,00%			
	89,50%			
	20,00%			
	19,50%			
	58,00%			
	60,00%			

Tabelle 6.10 zu Abbildung 3.14: Neutralrot-Test bei verschiedenen Ozonkonzentrationen

Ozonkonzentration in % w/w	Extinktion bei 540nm	Mittelwert	Prozentsatz gefärbter A549 Zellen	Extinktion bei 540nm	Mittelwert	Prozentsatz gefärbter L929 Zellen
0	0,400 0,379 0,571 0,650 0,600 0,600 0,639 0,652 0,753 0,558 0,767	0,597 ± 0,116	100% ± 19,52%	0,639 0,824 0,973 0,908 0,752	0,819 ± 0,117	100% ± 14,31%
0,2	0,579 0,473 0,365 0,338 0,523 0,329 0,376 0,337 0,410 0,672 0,225 0,287 0,452 0,440	0,414 ± 0,115	69,40% ± 19,32%	0,579 0,547 0,470 0,544 0,543	0,536 ± 0,036	65,46% ± 4,36%
0,28	0,381 0,380 0,414 0,311 0,031 0,074 0,068	0,236 ± 0,158	39,61% ± 26,52%	0,381 0,380 0,180 0,210	0,287 ± 0,093	35,07% ± 11,39%
0,35	0,031 0,048 0,048	0,041 ± 0,008	6,95% ± 1,37%	0,038 0,071 0,002 0,091	0,050 ± 0,034	6,08% ± 4,13%

Tabelle 6.11 zu Abbildung 3.15: Bestimmung der koloniebildenden Fraktion bei A549 Zellen in Abhängigkeit der Expositionsdauer bei 0,1% w/w Ozonexposition

Zeit in Stunden	Flasche	Koloniebildende Fraktion	Mittelwert
0,5	Kontrolle	0,366	0,437 ± 0,071
		0,508	
0,5	Probe	0,376	0,464 ± 0,088
		0,551	
1	Kontrolle	0,444	0,460 ± 0,016
		0,476	
1	Probe	0,388	0,445 ± 0,057
		0,501	
2	Kontrolle	0,424	0,432 ± 0,008
		0,44	
2	Probe	0,237	0,356 ± 0,119
		0,475	
4	Kontrolle	0,362	0,389 ± 0,027
		0,416	
4	Probe	0,147	0,290 ± 0,143
		0,433	

Tabelle 6.12 zu Abbildung 3.16: Bestimmung der koloniebildenden Fraktion bei L929 Zellen in Abhängigkeit der Expositionsdauer bei 0,08% w/w Ozonexposition

Zeit in Stunden	Flasche	Koloniebildende Fraktion	Mittelwert
0,5	Kontrolle	0,484	0,582 ± 0,069
		0,634	
		0,628	
0,5	Probe	0,578	0,592 ± 0,015
		0,586	
		0,612	
1	Kontrolle	0,462	0,565 ± 0,080
		0,574	
		0,658	
1	Probe	0,541	0,561 ± 0,020
		0,588	
		0,553	
2	Kontrolle	0,636	0,576 ± 0,054
		0,506	
		0,586	
2	Probe	0,595	0,542 ± 0,038
		0,524	
		0,508	
4	Kontrolle	0,506	0,548 ± 0,030
		0,574	
		0,564	
4	Probe	0,496	0,518 ± 0,030
		0,56	
		0,498	

Tabelle 6.13 zu Abbildung 3.17: Bestimmung der koloniebildenden Fraktion bei A549 Zellen in Abhängigkeit der Expositionsdauer bei 0,28% w/w Ozonexposition

Zeit in Stunden	Flasche	Koloniebildende Fraktion	Mittelwert
0,5	Kontrolle	0,536 0,514 0,404	0,485 ± 0,058
0,5	Probe	0,51 0,461 0,398	0,456 ± 0,046
1	Kontrolle	0,506 0,454 0,362	0,441 ± 0,060
1	Probe	0,41 0,409 0,25	0,356 ± 0,075
2	Kontrolle	0,496 0,438 0,374	0,436 ± 0,050
2	Probe	0,091 0,299 0,201	0,197 ± 0,085
4	Kontrolle	0,446 0,366 0,362	0,391 ± 0,039
4	Probe	0 0,189 0	0,063 ± 0,089

Tabelle 6.14 zu Abbildung 3.18: Bestimmung der koloniebildenden Fraktion bei L929 Zellen in Abhängigkeit der Expositionsdauer bei 0,28% w/w Ozonexposition

Zeit in Stunden	Flasche	Koloniebildende Fraktion	Mittelwert
0,5	Kontrolle	0,574 0,416 0,634	0,541 ± 0,092
0,5	Probe	0,538 0,371 0,648	0,519 ± 0,114
1	Kontrolle	0,554 0,326 0,496	0,459 ± 0,097
1	Probe	0,4 0,398 0,503	0,434 ± 0,049
2	Kontrolle	0,456 0,52 0,614	0,530 ± 0,065
2	Probe	0,258 0,413 0,377	0,349 ± 0,066
4	Kontrolle	0,438 0,41 0,578	0,475 ± 0,073

Zeit in Stunden	Flasche	Koloniebildende Fraktion	Mittelwert
4	Probe	0,097 0,141 0,002	0,080 ± 0,058

Tabelle 6.15 zu Abbildung 3.19: Glutathiongehalt von A549 Zellen bei verschiedenen Ozonkonzentrationen

Ozonkonzentration in % w/w	GSX in nmol/mg Protein	Mittelwert
0	7,38 6,92 8,71 9,16 10,60 8,95 10,48 10,06 11,57 11,01 9,35 9,95 15,99 17,95 12,10 14,36 16,81 23,27 12,29 12,85 6,52 7,15 5,99 5,31 11,47 10,96 15,42 15,08 14,12 10,22 9,49 10,35 10,57 8,27 13,56 12,55 17,32 14,90 15,99 15,39 12,78 15,38 13,98 14,77 17,13 19,06	12,835 ± 4,465

Ozonkonzentration in % w/w	GSX in nmol/mg Protein	Mittelwert
	19,43	
	18,21	
	18,91	
	18,64	
	19,73	
	21,31	
	14,06	
	14,94	
	8,41	
	9,55	
	9,90	
	12,96	
	8,09	
	7,92	
	9,35	
	6,34	
	10,58	
	10,73	
	7,34	
	8,39	
	10,28	
	8,97	
	3,53	
	3,05	
	7,19	
	7,48	
	11,22	
	12,39	
	17,31	
	17,41	
	19,27	
	18,51	
	14,00	
	14,76	
	16,53	
	17,45	
	13,94	
	13,22	
	12,15	
	15,64	
	12,45	
	11,46	
	12,74	
	12,74	
	10,78	
	13,01	
	12,96	
	12,52	
	10,65	
	11,05	
	12,50	
	12,45	
	15,04	

Ozonkonzentration in % w/w	GSX in nmol/mg Protein	Mittelwert
	15,88 19,84 18,94 16,57 15,03 23,76 21,98 16,48 18,61 15,44 15,08 17,80 22,68 14,70 15,93 15,54 20,37 23,12 8,60 7,48 8,26 7,65 5,17 5,74 12,51 11,50 7,84 7,99 10,64 10,41 5,87 7,18 16,70	
0,1	6,14 9,84 4,75 3,43 7,33 5,89 4,24 3,19 15,63 12,91 11,43 15,63 12,71 9,42 6,41 7,52 7,79 8,01 10,25 12,75	8,421 ± 3,558

Ozonkonzentration in % w/w	GSX in nmol/mg Protein	Mittelwert
	14,19	
	7,68	
	0,69	
	1,21	
	3,44	
	8,37	
	10,86	
	11,53	
	11,76	
	10,36	
	8,43	
	8,94	
	9,63	
	6,36	
	7,13	
	9,61	
	8,25	
	8,10	
	8,86	
	8,75	
	8,93	
	8,77	
	8,43	
	8,93	
	9,17	
	11,42	
	10,10	
	10,55	
	11,38	
	8,70	
	9,00	
	10,55	
	10,27	
	10,01	
	11,36	
	10,65	
	9,15	
	8,80	
	9,13	
	2,55	
	2,35	
	2,18	
	2,90	
	2,05	
	1,64	
	1,96	
	1,48	
	6,81	
	7,43	
	10,02	
	10,91	
	12,50	
	10,99	

Ozonkonzentration in % w/w	GSX in nmol/mg Protein	Mittelwert
	12,02 13,62 13,81	
0,2	7,62 7,48 7,27 5,57 4,64 6,51 6,00 4,65 10,16 11,43 6,93 7,38 6,37 10,31 12,97 10,21 8,19 9,00 8,24 7,82 7,86 6,26 6,08	7,780 ± 2,062
0,28	4,08 3,68 4,97 4,81 1,88 1,28 2,05 8,24 8,69 8,06 7,52 5,81 3,35	4,956 ± 2,450
0,35	2,62 2,69 2,82 3,14 2,56 2,96 1,78 2,29 2,80 2,54 2,61	2,619 ± 0,343

Ozonkonzentration in % w/w	GSX in nmol/mg Protein	Mittelwert
0,5	0,97	0,705 ± 0,293
	0,59	
	0,76	
	0,81	
	1,17	
	0,18	
	0,39	
	0,76	
0,7	0,91	0,915 ± 0,162
	0,73	
	0,77	
	0,72	
	1,03	
	1,19	
	1,08	
	0,88	

Tabelle 6.16 zu Abbildung 3.20: Glutathiongehalt von L929 Zellen bei verschiedenen Ozonkonzentrationen

Ozonkonzentration in %w/w	GSX in nmol/mg Protein	Mittelwert
0	17,84	12,02 ± 3,32
	17,48	
	15,87	
	16,06	
	12,44	
	9,39	
	10,62	
	11,53	
	8,70	
	8,48	
	8,77	
	15,28	
	10,40	
	11,08	
	9,35	
	9,95	
	15,99	
	17,95	
	10,38	
	13,81	
	6,54	
	6,48	
	12,03	
	13,01	
15,09		
20,61		
15,84		
14,77		
10,14		
10,47		
8,09		
12,35		
11,65		
12,40		

Ozonkonzentration in %w/w	GSX in nmol/mg Protein	Mittelwert
	8,21	
	12,26	
	12,42	
	13,08	
	9,69	
	10,64	
	11,83	
	11,69	
	11,30	
	13,68	
	20,48	
	15,91	
	7,59	
	7,18	
	11,95	
	11,94	
	7,56	
	8,77	
	13,42	
	13,90	
	9,74	
	9,38	
	10,27	
	9,06	
	7,76	
	9,91	
	10,76	
	10,03	
	9,10	
	8,58	
	11,34	
	10,90	
	13,50	
	13,52	
	15,14	
	12,64	
	14,41	
	17,05	
	15,01	
	11,69	
	12,06	
	14,40	
	14,19	
	11,01	
	10,71	
	12,03	
	13,21	
	10,36	
	10,68	
	12,91	
	12,44	
	11,60	
	12,62	

Ozonkonzentration in %w/w	GSX in nmol/mg Protein	Mittelwert
	19,48	
	16,84	
	12,70	
	15,61	
	6,43	
	4,93	
	9,19	
	7,02	
	12,99	
	12,00	
	7,71	
	8,34	
	16,49	
	8,25	
	16,31	
	17,07	
	16,00	
	14,23	
	13,66	
	12,80	
	12,86	
	11,94	
	20,47	
	16,92	
	13,91	
	10,97	
	12,63	
	12,16	
	14,93	
	15,62	
	14,11	
	13,29	
	16,19	
	18,89	
	16,24	
	13,12	
	7,52	
	10,40	
	10,83	
	11,96	
	8,82	
	7,06	
	10,76	
	11,06	
	8,86	
	4,70	
	6,89	
	12,07	
	10,34	
	5,19	
	7,64	

Ozonkonzentration in %w/w	GSX in nmol/mg Protein	Mittelwert
0,1	15,46 13,44 6,87 5,05 9,58 9,04 9,17 8,87 9,22 8,05 7,03 6,21 5,55 6,56 7,77 7,56 4,63	8,24 ± 2,72
0,2	4,05 3,52 4,53 3,56 5,23 5,05 5,27 5,16 3,34 3,31 3,64 3,02 4,50 7,19 9,25 9,25 9,12 9,35 7,80 4,79 4,22 2,99 4,42 12,03 9,73 12,29 15,23 14,69 10,74 12,73 13,67 10,57 10,91 11,31 13,08 5,22	7,61 ± 3,58

Ozonkonzentration in %w/w	GSX in nmol/mg Protein	Mittelwert
	5,00 5,04 4,31 9,95 11,01 7,46 8,25 12,26 5,60 6,46	
0,28	8,56 7,78 9,03 7,90 2,93 3,87 7,34 3,91 1,25 1,91 2,25 2,73 3,22 2,54 8,21 8,17 7,79	5,26 ± 2,76
0,35	2,19 1,43 1,53 2,18 2,42 2,12 2,15 1,33 1,89 1,64 0,47 0,40 0,33 0,37	1,46 ± 0,74
0,5	1,07 1,55 1,00 2,51 1,35	1,83 ± 0,91
0,7	0,98 1,25 0,66 1,76 1,35 1,35	1,23 ± 0,34

Tabelle 6.17 zu Abbildung 3.21: Bestimmung des Glutathiongehalts in Abhängigkeit der Expositionsdauer bei 0,1% w/w bzw. 0,08% w/w Ozon

Zeit in Stunden	GSX in nmol/mg Protein (A549 Zellen)	Mittelwert	GSX in nmol/mg Protein (L929 Zellen)	Mittelwert
0	7,38	12,84 ± 4,47	17,84	12,02 ± 3,32
	6,92		17,48	
	8,71		15,87	
	9,16		16,06	
	10,60		12,44	
	8,95		9,39	
	10,48		10,62	
	10,06		11,53	
	11,57		8,70	
	11,01		8,48	
	9,35		8,77	
	9,95		15,28	
	15,99		10,40	
	17,95		11,08	
	12,10		9,35	
	14,36		9,95	
	16,81		15,99	
	23,27		17,95	
	12,29		10,38	
	12,85		13,81	
	6,52		6,54	
	7,15		6,48	
	5,99		12,03	
	5,31		13,01	
	11,47		15,09	
	10,96		20,61	
	15,42		15,84	
	15,08		14,77	
	14,12		10,14	
	10,22		10,47	
	9,49		8,09	
	10,35		12,35	
	10,57		11,65	
	8,27		12,40	
	13,56		8,21	
	12,55		12,26	
	17,32		12,42	
	14,90		13,08	
	15,99		9,69	
	15,39		10,64	
	12,78	11,83		
	15,38	11,69		
	13,98	11,30		
	14,77	13,68		
	17,13	20,48		
	19,06	15,91		
	19,43	7,59		
	18,21	7,18		
	18,91	11,95		
	18,64	11,94		

Zeit in Stunden	GSX in nmol/mg Protein (A549 Zellen)	Mittelwert	GSX in nmol/mg Protein (L929 Zellen)	Mittelwert
	19,73		7,56	
	21,31		8,77	
	14,06		13,42	
	14,94		13,90	
	8,41		9,74	
	9,55		9,38	
	9,90		10,27	
	12,96		9,06	
	8,09		7,76	
	7,92		9,91	
	9,35		10,76	
	6,34		10,03	
	10,58		9,10	
	10,73		8,58	
	7,34		11,34	
	8,39		10,90	
	10,28		13,50	
	8,97		13,52	
	3,53		15,14	
	3,05		12,64	
	7,19		14,41	
	7,48		17,05	
	11,22		15,01	
	12,39		11,69	
	17,31		12,06	
	17,41		14,40	
	19,27		14,19	
	18,51		11,01	
	14,00		10,71	
	14,76		12,03	
	16,53		13,21	
	17,45		10,36	
	13,94		10,68	
	13,22		12,91	
	12,15		12,44	
	15,64		11,60	
	12,45		12,62	
	11,46		19,48	
	12,74		16,84	
	12,74		12,70	
	10,78		15,61	
	13,01		6,43	
	12,96		4,93	
	12,52		9,19	
	10,65		7,02	
	11,05		12,99	
	12,50		12,00	
	12,45		7,71	
	15,04		8,34	
	15,88		16,49	
	19,84		8,25	
	18,94		16,31	
	16,57		17,07	

Zeit in Stunden	GSX in nmol/mg Protein (A549 Zellen)	Mittelwert	GSX in nmol/mg Protein (L929 Zellen)	Mittelwert
	15,03 23,76 21,98 16,48 18,61 15,44 15,08 17,80 22,68 14,70 15,93 15,54 20,37 23,12 8,60 7,48 8,26 7,65 5,17 5,74 12,51 11,50 7,84 7,99 10,64 10,41 5,87 7,18 16,70		16,00 14,23 13,66 12,80 12,86 11,94 20,47 16,92 13,91 10,97 12,63 12,16 14,93 15,62 14,11 13,29 16,19 18,89 16,24 13,12 7,52 10,40 10,83 11,96 8,82 7,06 10,76 11,06 8,86 4,70 6,89 12,07 10,34 5,19 7,64	
0,5	16,71 15,17 19,73 19,74	17,84 ± 1,97	14,74 12,25 12,44 11,63 13,36	12,88 ± 1,08
1	15,16 14,35 17,78 21,08	17,09 ± 2,63	9,36 7,27 13,93 13,48 11,11 12,08 9,41 10,90	10,94 ± 2,09

Zeit in Stunden	GSX in nmol/mg Protein (A549 Zellen)	Mittelwert	GSX in nmol/mg Protein (L929 Zellen)	Mittelwert
2	13,78 14,71 14,08 10,52 17,39 14,84 23,34 12,44 21,55 21,47 17,53 16,19 15,62 19,03 19,17 10,92 9,78 10,26 8,48 7,37 9,05 9,07 9,02 7,17 14,27 11,33 13,75 9,13 15,63 19,00 21,19 12,56 11,25 12,83 22,58 15,46	14,22 ± 4,50	7,53 5,68 12,04 12,16 9,79 9,45 6,75 11,02	9,30 ± 2,28
4	6,14 9,84 4,75 3,43 7,33 5,89 4,24 3,19 15,63 12,91 11,43 15,63 12,71 9,42 6,41 7,52	8,42 ± 3,56	10,53 10,63 10,33 5,73 6,06 5,13 5,53 6,18 6,90 6,60 9,45 9,40 9,26 8,54 9,82 6,10	7,89 ± 1,95

Zeit in Stunden	GSX in nmol/mg Protein (A549 Zellen)	Mittelwert	GSX in nmol/mg Protein (L929 Zellen)	Mittelwert
	7,79			
	8,01			
	10,25			
	12,75			
	14,19			
	7,68			
	0,69			
	1,21			
	3,44			
	8,37			
	10,86			
	11,53			
	11,76			
	10,36			
	8,43			
	8,94			
	9,63			
	6,36			
	7,13			
	9,61			
	8,25			
	8,10			
	8,86			
	8,75			
	8,93			
	8,77			
	8,43			
	8,93			
	9,17			
	11,42			
	10,10			
	10,55			
	11,38			
	8,70			
	9,00			
	10,55			
	10,27			
	10,01			
	11,36			
	10,65			
	9,15			
	8,80			
	9,13			
	2,55			
	2,35			
	2,18			
	2,90			
	2,05			
	1,64			
	1,96			
	1,48			
	6,81			
	7,43			

Zeit in Stunden	GSX in nmol/mg Protein (A549 Zellen)	Mittelwert	GSX in nmol/mg Protein (L929 Zellen)	Mittelwert
	10,02			
	10,91			
	12,50			
	10,99			
	12,02			
	13,62			
	13,81			

Tabelle 6.18 zu Abbildung 3.22: ATP-Gehalt der Zellen bei verschiedenen Ozonkonzentrationen

Ozonkonzentration in % w/w	ATP-Gehalt in nmol/well (A549 Zellen)	Mittelwert	ATP-Gehalt in nmol/well (L929 Zellen)	Mittelwert
0	0,00594	0,003925 ± 0,001108	0,006897	0,006939 ± 0,001771
	0,00512		0,005999	
	0,00321		0,004157	
	0,00354		0,008010	
	0,00335		0,002961	
	0,00324		0,006955	
	0,00363		0,007201	
	0,00618		0,006288	
	0,00390		0,006821	
	0,00403		0,006511	
	0,00279		0,011471	
	0,00234		0,008598	
	0,00376		0,010373	
			0,006285	
			0,005774	
			0,005632	
			0,006464	
			0,007237	
			0,008795	
			0,007509	
		0,008447		
		0,004815		
		0,005195		
		0,008984		
		0,008121		
		0,008470		
		0,004953		
		0,005433		
		0,006153		
		0,007675		

Ozonkonzentration in % w/w	ATP-Gehalt in nmol/well (A549 Zellen)	Mittelwert	ATP-Gehalt in nmol/well (L929 Zellen)	Mittelwert
0,1 bzw. 0,08	0,002350 0,002639 0,003864 0,004103 0,002938 0,003071	0,003161 ± 0,000628	0,009790 0,004504 0,005193 0,003887 0,004652 0,003415 0,006564 0,007056 0,002435 0,002243 0,004710 0,005590 0,004223 0,005894 0,006345 0,005924 0,005777	0,005188 ± 0,001757
0,28	0,000936 0,000497 0,000634 0,000954 0,000252 0,000143 0,000475 0,000450 0,001974 0,002122 0,001136 0,000715	0,000857 ± 0,000601	0,001730 0,002887 0,002631 0,001257 0,000218 0,000583	0,001551 ± 0,000982
0,35	0,000033 0,000032 0,000026 0,000080 0,000023 0,000013 0,000010 0,000017 0,000084 0,000072 0,000078 0,000093	0,000047 ± 0,000030	0,000061 0,000025 0,000224 0,000694 0,000054 0,000034 0,000035 0,000096	0,000153 ± 0,000213

Tabelle 6.19 zu Abbildung 3.23: Abnahme des ATP-Gehalts in Abhängigkeit der Expositionsdauer bei einer Ozonkonzentration von 0,1% w/w bzw. 0.08% w/w

Zeit in Stunden	ATP-Gehalt in nmol/well (A549 Zellen)	Mittelwert	ATP-Gehalt in nmol/well (L929 Zellen)	Mittelwert
0	0,00594 0,00512 0,00321 0,00354 0,00335 0,00324 0,00363 0,00618 0,00390 0,00403 0,00279 0,00234 0,00376	0,003925 ± 0,001108	0,006897 0,005999 0,004157 0,008010 0,002961 0,006955 0,007201 0,006288 0,006821 0,006511 0,011471 0,008598 0,010373 0,006285 0,005774 0,005632 0,006464 0,007237 0,008795 0,007509 0,008447 0,004815 0,005195 0,008984 0,008121 0,008470 0,004953 0,005433 0,006153 0,007675	0,006939 ± 0,001771
0,5	0,00340 0,00373 0,00272 0,00379	0,003408 ± 0,000424	0,005551 0,004722 0,005279 0,007627 0,006333 0,005984 0,004923 0,006657	0,005884 ± 0,000908
1	0,003188 0,003746 0,003558 0,003169	0,003415 ± 0,000246	0,004890 0,005368 0,004296 0,004828 0,006192 0,004553 0,005571 0,005792 0,005974	0,005274 ± 0,000625

Zeit in Stunden	ATP-Gehalt in nmol/well (A549 Zellen)	Mittelwert	ATP-Gehalt in nmol/well (L929 Zellen)	Mittelwert
2	0,002951 0,003381	0,003166 ± 0,000215	0,004820 0,005932 0,005019 0,005352 0,005475 0,004178	0,005129 ± 0,000551
4	0,002350 0,002639 0,003864 0,004103 0,002938 0,003071	0,003161 ± 0,000628	0,009790 0,004504 0,005193 0,003887 0,004652 0,003415 0,006564 0,007056 0,002435 0,002243 0,004710 0,005590 0,004223 0,005894 0,006345 0,005924 0,005777	0,005188 ± 0,001757

Tabelle 6.20 zu Abbildung 3.24: Abnahme des ATP-Gehalts in Abhängigkeit der Expositionsdauer bei einer Ozonkonzentration von 0,28% w/w

Zeit in Stunden	ATP-Gehalt in nmol/well (A549 Zellen)	Mittelwert	ATP-Gehalt in nmol/well (L929 Zellen)	Mittelwert
0	0,00594 0,00512 0,00321 0,00354 0,00335 0,00324 0,00363 0,00618 0,00390 0,00403 0,00279 0,00234 0,00376	0,003925 ± 0,001108	0,006897 0,005999 0,004157 0,008010 0,002961 0,006955 0,007201 0,006288 0,006821 0,006511 0,011471 0,008598 0,010373 0,006285 0,005774 0,005632 0,006464 0,007237 0,008795 0,007509 0,008447 0,004815 0,005195	0,006939 ± 0,001771

Zeit in Stunden	ATP-Gehalt in nmol/well (A549 Zellen)	Mittelwert	ATP-Gehalt in nmol/well (L929 Zellen)	Mittelwert
			0,008984 0,008121 0,008470 0,004953 0,005433 0,006153 0,007675	
0,5	0,003142 0,003351 0,002847 0,005598	0,003734 ± 0,001091	0,003724 0,004176 0,004312 0,003596 0,007189 0,007102	0,005016 ± 0,001525
1	0,002970 0,003053 0,003273 0,003246	0,003136 ± 0,000128	0,003903 0,003811 0,004215 0,004729 0,006370 0,003623	0,004442 ± 0,000932
2	0,000288 0,002054 0,002458 0,002733	0,001883 ± 0,000952	0,002336 0,003296 0,002874 0,005166 0,003760 0,003206	0,003440 ± 0,000885
4	0,000936 0,000497 0,000634 0,000954 0,000252 0,000143 0,000475 0,000450 0,001974 0,002122 0,001136 0,000715	0,000857 ± 0,000601	0,001730 0,002887 0,002631 0,001257 0,000218 0,000583	0,001551 ± 0,000982

Tabelle 6.21 zu Abbildung 3.25: Spontanerholung des Glutathiongehalts bei A549 Zellen nach 20stündiger Nachinkubation

Ozonkonzentration in % w/w	GSX in nmol/mg Protein (ohne Nachinkubation)	Mittelwert	GSX in nmol/mg Protein (mit Nachinkubation)	Mittelwert
0	7,38 6,92 8,71 9,16 10,60 8,95 10,48 10,06 11,57	12,84 ± 4,47	12,36 11,08 10,22 10,45 11,62 14,11 13,96 8,25 7,65	11,98 ± 4,96

Ozonkonzentration in % w/w	GSX in nmol/mg Protein (ohne Nachinkubation)	Mittelwert	GSX in nmol/mg Protein (mit Nachinkubation)	Mittelwert
	11,01		10,86	
	9,35		9,81	
	9,95		11,20	
	15,99		11,97	
	17,95		14,23	
	12,10		13,19	
	14,36		7,38	
	16,81		9,05	
	23,27		7,05	
	12,29		7,90	
	12,85		24,23	
	6,52		16,59	
	7,15		28,07	
	5,99			
	5,31			
	11,47			
	10,96			
	15,42			
	15,08			
	14,12			
	10,22			
	9,49			
	10,35			
	10,57			
	8,27			
	13,56			
	12,55			
	17,32			
	14,90			
	15,99			
	15,39			
	12,78			
	15,38			
	13,98			
	14,77			
	17,13			
	19,06			
	19,43			
	18,21			
	18,91			
	18,64			
	19,73			
	21,31			
	14,06			
	14,94			
	8,41			
	9,55			
	9,90			
	12,96			
	8,09			
	7,92			
	9,35			

Ozonkonzentration in % w/w	GSX in nmol/mg Protein (ohne Nachinkubation)	Mittelwert	GSX in nmol/mg Protein (mit Nachinkubation)	Mittelwert
	6,34			
	10,58			
	10,73			
	7,34			
	8,39			
	10,28			
	8,97			
	3,53			
	3,05			
	7,19			
	7,48			
	11,22			
	12,39			
	17,31			
	17,41			
	19,27			
	18,51			
	14,00			
	14,76			
	16,53			
	17,45			
	13,94			
	13,22			
	12,15			
	15,64			
	12,45			
	11,46			
	12,74			
	12,74			
	10,78			
	13,01			
	12,96			
	12,52			
	10,65			
	11,05			
	12,50			
	12,45			
	15,04			
	15,88			
	19,84			
	18,94			
	16,57			
	15,03			
	23,76			
	21,98			
	16,48			
	18,61			
	15,44			
	15,08			
	17,80			
	22,68			
	14,70			

Ozonkonzentration in % w/w	GSX in nmol/mg Protein (ohne Nachinkubation)	Mittelwert	GSX in nmol/mg Protein (mit Nachinkubation)	Mittelwert
	15,93 15,54 20,37 23,12 8,60 7,48 8,26 7,65 5,17 5,74 12,51 11,50 7,84 7,99 10,64 10,41 5,87 7,18 16,70			
0,2	7,62 7,48 7,27 5,57 4,64 6,51 6,00 4,65 10,16 11,43 6,93 7,38 6,37 10,31 12,97 10,21 8,19 9,00 8,24 7,82 7,86 6,26 6,08	7,780 ± 2,062	4,61 10,97 8,11 10,66 18,51 13,52 10,02	10,91 ± 4,02

Ozonkonzentration in % w/w	GSX in nmol/mg Protein (ohne Nachinkubation)	Mittelwert	GSX in nmol/mg Protein (mit Nachinkubation)	Mittelwert
0,28	4,08 3,68 4,97 4,81 1,88 1,28 2,05 8,24 8,69 8,06 7,52 5,81 3,35	4,956 ± 2,450	4,63 7,86 7,89 8,29 7,73 8,50 1,53 1,20 4,31 4,38 9,36 9,56	6,27 ± 2,81
0,35	2,62 2,69 2,82 3,14 2,56 2,96 1,78 2,29 2,80 2,54 2,61	2,619 ± 0,343	2,66 3,53 3,24 2,24 4,69 4,37 1,09 1,36 2,47	2,85 ± 1,16

Tabelle 6.22 zu Abbildung 3.26: Spontanerholung des Glutathiongehalts bei L929 Zellen nach 20stündiger Nachinkubation

Ozonkonzentration in % w/w	GSX in nmol/mg Protein (ohne Nachinkubation)	Mittelwert	GSX in nmol/mg Protein (mit Nachinkubation)	Mittelwert
0	17,84 17,48 15,87 16,06 12,44 9,39 10,62 11,53 8,70 8,48 8,77 15,28 10,40 11,08 9,35 9,95 15,99 17,95 10,38 13,81 6,54 6,48	12,02 ± 3,32	11,76 10,54 13,02 11,93 14,06 17,76 9,58 9,71 10,19 9,59 7,72 7,27 13,63 10,70 11,98 9,04 9,88	11,08 ± 2,48

Ozonkonzentration in % w/w	GSX in nmol/mg Protein (ohne Nachinkubation)	Mittelwert	GSX in nmol/mg Protein (mit Nachinkubation)	Mittelwert
	12,03			
	13,01			
	15,09			
	20,61			
	15,84			
	14,77			
	10,14			
	10,47			
	8,09			
	12,35			
	11,65			
	12,40			
	8,21			
	12,26			
	12,42			
	13,08			
	9,69			
	10,64			
	11,83			
	11,69			
	11,30			
	13,68			
	20,48			
	15,91			
	7,59			
	7,18			
	11,95			
	11,94			
	7,56			
	8,77			
	13,42			
	13,90			
	9,74			
	9,38			
	10,27			
	9,06			
	7,76			
	9,91			
	10,76			
	10,03			
	9,10			
	8,58			
	11,34			
	10,90			
	13,50			
	13,52			
	15,14			
	12,64			
	14,41			
	17,05			
	15,01			
	11,69			

Ozonkonzentration in % w/w	GSX in nmol/mg Protein (ohne Nachinkubation)	Mittelwert	GSX in nmol/mg Protein (mit Nachinkubation)	Mittelwert
	12,06			
	14,40			
	14,19			
	11,01			
	10,71			
	12,03			
	13,21			
	10,36			
	10,68			
	12,91			
	12,44			
	11,60			
	12,62			
	19,48			
	16,84			
	12,70			
	15,61			
	6,43			
	4,93			
	9,19			
	7,02			
	12,99			
	12,00			
	7,71			
	8,34			
	16,49			
	8,25			
	16,31			
	17,07			
	16,00			
	14,23			
	13,66			
	12,80			
	12,86			
	11,94			
	20,47			
	16,92			
	13,91			
	10,97			
	12,63			
	12,16			
	14,93			
	15,62			
	14,11			
	13,29			
	16,19			
	18,89			
	16,24			
	13,12			
	7,52			
	10,40			
	10,83			

Ozonkonzentration in % w/w	GSX in nmol/mg Protein (ohne Nachinkubation)	Mittelwert	GSX in nmol/mg Protein (mit Nachinkubation)	Mittelwert
	11,96 8,82 7,06 10,76 11,06 8,86 4,70 6,89 12,07 10,34 5,19 7,64			
0,2	4,05 3,52 4,53 3,56 5,23 5,05 5,27 5,16 3,34 3,31 3,64 3,02 4,50 7,19 9,25 9,25 9,12 9,35 7,80 4,79 4,22 2,99 4,42 12,03 9,73 12,29 15,23 14,69 10,74 12,73 13,67 10,57 10,91 11,31 13,08 5,22 5,00 5,04 4,31 9,95	7,61 ± 3,58	9,32 10,67 10,71 19,29 14,38 9,50 10,24 8,37	11,56 ± 3,36

Ozonkonzentration in % w/w	GSX in nmol/mg Protein (ohne Nachinkubation)	Mittelwert	GSX in nmol/mg Protein (mit Nachinkubation)	Mittelwert
	11,01 7,46 8,25 12,26 5,60 6,46			
0,28	8,56 7,78 9,03 7,90 2,93 3,87 7,34 3,91 1,25 1,91 2,25 2,73 3,22 2,54 8,21 8,17 7,79	5,26 ± 2,76	2,45 3,76 5,97 2,85 1,82 3,94	3,47 ± 1,33
0,35	2,19 1,43 1,53 2,18 2,42 2,12 2,15 1,33 1,89 1,64 0,47 0,40 0,33 0,37	1,46 ± 0,74	1,39 2,62 1,13 1,17 2,07 1,71 1,09 1,19 1,14	1,50 ± 0,50

7 Literaturverzeichnis

1. Ahmad S., Ahmad A., McConville G., Schneider B. K., Allen C. B., Manzer R., Mason R. J., White C. W.: *Lung epithelial cells release ATP during ozone exposure: signaling for cell survival*. Free Radic Biol Med. 2005. **39**. p. 213-226
2. Alink G. M., de Boer R. M., Mol J., Temmink J. H. : *Toxic effects of ozone on human cells in vitro, exposed by gas diffusion through teflon film*. Toxicol., 1980. **17**. p. 209-218
3. Alink G. M., van der Hoeven F. M. H., Debets W. S. M., van der Ven R., Koeman J. H.: *A new exposure model for in vitro testing of effects of gas pollutants on mammalian cells by means of gas diffusion through plastic films*. Chemosphere 1979. **2**. p. 63-73
4. Amos D.: *Specific spectrofluorimetric determination of atmospheric ozone using 2-diphenyl-acetyl-1,3-indandion-1-hydrazone*. Anal. Chem. 1970. **42**, 842-844
5. APHA-AWWA-WEF: *Standard Methods for the Examination of Water and Waste Water*. 1999. 20. Auflage. American Public Health Association, American Water Work Association, Water environment Federation. Washington DC
6. Babior B. M., Takeuchi C., Reudi J., Gutierrez A., Wentworth P. Jr.: *Investigating antibody-catalyzed ozone generation by human neutrophils*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A: 2003. **100**. p. 3031-3034
7. Bandman A. L. Vrednie chemichescie veshstva. Neorganicheskie soedinenia elementov V-VII groopp" (Hazardous substances. Inorganic substances containing V-VII group elements), Bandman A.L. et al., Chimia, 1989.
8. Banks M. A., Porter D. W., Martin W. G., Castranova V.: *Effects of in vitro ozone exposure on peroxidative damage, membrane leakage, and taurine content of rat alveolar macrophages*. Toxicol Appl Pharmacol. 1990. **105**. p. 55-65
9. Barnes I., Becker K. H.: *Bodennahes Ozon in der Troposphäre: Entstehungs- und Abbaumechanismen*. BIA-Report **8/95**. 1995. p. 15-24
10. Bascom R., Bromberg P. A., Costa D. A., Devlin R., Dockery D. W., Frampton M. W., Lambert W., Samet J. M., Speizer F. E., Utell M.: *Health Effects of outdoor Air Pollution. Committee of the Environmental and Occupational Health Assembly of the American Thoracic Society*. Am. J. Respir. Crit Care Med. 1996. **153**. p. 3-50
11. Beisenherz G. Boltze H. J, Bücher Th., Czok R., Garbade K. H., Meyer Arendt E., Pfeleiderer G.: *Diphosphofructose-Aldolase, Phosphoglyceraldehyd-Dehydrogenase, Milchsäure-Dehydrogenase, Glycerophosphat-Dehydrogenase und Pyruvat-Dehydrogenase aus Kaninchenmuskulatur in einem Arbeitsgang*. Zeitschrift für Naturforschung. 1953. **8B**. p. 555-577
12. Bell M. L., Dominici F., Samet J. M.: *A meta-analysis of time-series studies of ozone and mortality with comparison of the National Morbidity, Mortality, and Air Pollution Study*. Epidem. 2005. **16**. p. 436-445
13. Bersis D., Vassiliou E.: *A chemiluminescence method for determining of ozone*. Analyst. 1966. **91**. p. 499-505

14. Birdsall C. M., Jenkins A. C., Spadinger E.: *Iodometric determination of ozone*. Anal. Chem. 1952. **24**. p.662-664
15. Blatt A. M., Ferrari L.: *Manifestations of chemically induced liver damage*. Clin. Chem.1995. **41**. p. 1882-1887
16. Boelter E. D., Putnam C. L., Lash E.: *Iodometric determination of ozone of high concentration*. Anal Chem. 1950. **22**. p.1533-1535
17. Bolton D. C., Tarkington B. K., Zee Y. C., Osebold J. W.: *An in vitro system for studying the effects of ozone on mammalian cell cultures and viruses*. Environ. Res. 1982. **27**. p. 466-475
18. Bonsi P., Zucco F., Stamatii A.: *Two in vitro models for gas-phase exposure to volatile compounds*. Altern. Lab. Anim., 2002. **30**. p. 241-247
19. Broeckaert F., Arsalane K., Hermans C., Bergamaschi E., Brustolin A., Mutti A., Bernard A.: *Serum clara cell protein: a sensitive biomarker of increased lung epithelium permeability caused by ambient ozone*. Environ Health Perspect. 2000.**108**. p. 533-537
20. Bromberg P. A., Hazucha M. J.: *Is adaptation to ozone protective?* Am Rev. Respir. Dis., 1982. **125**. p. 489-490
21. Brown L. A., Bai C., Jones D. P.: *Glutathione protection in alveolar type II cells from fetal and neonatal rabbits*. Am. J. Physiol. 1992. **262**. p. L305-312
22. Buffle M. O., Schumacher J., Salhi E., Jekal M., von Gunten U.: *Measurement of the initial phase of ozone decomposition in water and wastewater by means of a continuous quench-flow system: Application to disinfection and pharmaceutical oxidation*. Water Res. 2006. **40**. p 1884-1894
23. Butterworth K. R., Hoosen J., Gaunt I. F., Kiss I. S., Grasso P.: *Long-term toxicity of indigo carmine in mice*. Food Cosmet Toxicol. 1975. **13**. p. 167-176
24. Cheng T. J., Kao H. P., Chan C. C., Chang W. P.: *Effects of ozone on DNA single-strand breaks and 8-oxoguanine formation in A549 cells*. Environ. Res. 2003. **93**. p. 279-284
25. Chichester C. H., Buckpitt A. R., Chang A., Plopper C. G.: *Metabolism and cytotoxicity of naphthalene and its metabolites in isolated murine Clara cells*. Mol. Pharmacol. 1994. **45**. p. 664-672
26. Chorvatovicova D., Hoet P. H. M., Tatrai E., Kovacicova Z.: *Ozone-induced micronuclei frequency in rat alveolar Type II cells*. Physiol. Res. 2000. **49**. p. 733-736
27. Chow C. K., Hussain M. Z., Cross C. E., Dungworth D. L., Mustafa M. G.: *Effect of low levels of ozone on rat lungs. I. Biochemical responses during recovery and reexposure*. Exp Mol Pathol. 1976. **25**. p. 182-188
28. Coakley W. T.: *Hyperthermia effects on the cytoskeleton and on cell morphology*. In Temperature and Animal Cells. 1987 (Bowler K. und Fuller B. J. Ed.) p. 187-211. For the Society of Experimental Biology by the Company of Biologists Limited, Cambridge
29. Criegee R.: *Course of ozonization of unsaturated compounds*. Rec. Chem. Progr., 1957. **18**. p. 111-120

30. Cross A., Dewey W. C., Bamburg J. R.: *Effects of hypothermia on Chinese hamster ovary cells analyzed in mitosis*. Cancer Res. 1979. **39**. p. 1911-1917
31. Dalle-Donne I., Rossi R., Milzani A., Di Simplicio P., Colombo R.: *The actin cytoskeleton response to oxidants: From small heat shock protein phosphorylation to changes in the redox state of actin itself*. Free Radic. Biol. Med. 2001. **31**. p. 1624-1632
32. Dancygier H. J., Runne U., Leushner U.: *Dacarbazine-induced liver cell damage: light and electron microscopy findings*. Hepat. Gastroenterol. 1983. **30**. p. 93-95
33. Deneke S. M., Fanburg B. L.: *Regulation of cellular glutathione*. Am. J. Physiol. 1989. **257**. p. L163-L173
34. Deneke S. M., Lynch B. A., Fanburg B. L.: *Transient depletion of lung glutathione by diethylmaleate enhances oxygen toxicity*. J. Appl. Physiol. 1985. **58**. p. 571-574
35. Dorta Schaeppi Y. und Treadwell W. D.: *Über eine kolorimetrische Bestimmung von hochverdünntem Ozon in Sauerstoff*. Helv. Chim. Acta. 1949. **32**. p. 356-364
36. Duan X., Buckpitt A. R., Plopper C. G.: *Variation in antioxidant enzyme activities in anatomic subcompartments within rat and rhesus monkey lung*. Toxicol. Appl. Pharmacol. 1993. **123**. p. 73-82
37. Duan X., Plopper C. G., Brennan P., Buckpitt A. R.: *Rates of glutathione synthesis in lung subcompartments of mice and monkeys: possible role in species and site selective injury*. J. Pharmacol. Exp. Ther. 1996. **277**. p. 1042-1049
38. Dumler K., Hanley Q. S., Baker C., Luchtel D. L., Altman L. C., Koenig J. Q.: *The effects of ozone exposure on lactate dehydrogenase release from human and primate respiratory epithelial cells*. Toxicol Lett. 1994. **70**. p. 203-209
39. Elstner E. F.: *Ozon in der Troposphäre - Bildung, Eigenschaften, Wirkungen*. Akademie für Technikerfolgeabschätzung in Baden Württemberg (Hrsg.). Stuttgart, 1996
40. Emmons K., Foster W. M.: *Smoking cessation and acute airway response to ozone*. Arch Environ. Health. 1991. **46**. p. 288-295
41. Europäische Umweltagentur: *Pressemitteilung: Im Sommer 2003 erreicht Ozonbelastung Rekordhöhen; Ozonwerte könnten auf Jahre hinaus wiederkehren*. Kopenhagen (Oktober 2003)
42. Eyer P., Podhradsky D.: *Evaluation of the micromethod for determination of glutathione using enzymatic cycling and Ellman's reagent*. Anal. Biochem. 1986. **153**. p. 57-66
43. Farrel B. P., Kerr H. D., Kulle T. J., Saunder L. R., Young J. L.: *Adaption in human subjects to the effects of inhaled ozone after repeated exposure*. Am. Rev. Respir. Dis. 1979. **119**. p. 725-730
44. Filman D. J., Brawn R. J., Dandliker W. B.: *Intracellular supravital stain delocalization as an assay for antibody-dependent complement-mediated cell damage*. J Immunol Methods. 1975. **6**. p. 189-207.

45. Fischer P. H., Brunekreef B., Lebrecht E.: *Air pollution related deaths during the 2003 heat wave in the Netherlands*. *Atm Environ.* 2004. **38**. p. 1083-1085
46. Folinsbee L. J., Bedi J. F., Horvath S. M.: *Respiratory responses in humans repeatedly exposed to low concentrations of ozone*. *Am Rev. Respir. Dis.* 1980. **121**. p. 431-439
47. Folinsbee L. J., Horstman D. H., Kehrl H. R., Harder S., Abdul-Salaam S., Ives P. J.: *Respiratory responses to repeated prolonged exposure to 0.12 ppm ozone*. *Am J. Rev. Crit. Care Med.* 1994. **149**. p. 98-105
48. Foster W. M., Costa D. L., Langenback E. G.: *Ozone exposure alters tracheobronchial mucociliary function in humans*. *J. Appl. Physiol.* 1987. **63**. p. 996-1002
49. Foucaud L., Bennisroune A., Klestadt D., Laval-Gilly P., Falla J.: *Oxidative stress induction by short time exposure to ozone on THP-1 cells*. *Toxicol in Vitro.* 2006. **20**. p. 101-108
50. Frampton M. W., Pryor W. A., Cueto R., Cox C., Morrow P. E., Utell M. J.: *Ozone exposure increases aldehyds in epithelial lining fluid in human lung*. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 1999. **159**. p. 1134-1137
51. Frederiks W. M., Vogels I. M. C., Fronik G. M.: *Plasma ornithine carbamyl transferase level as an indicator of ischaemic injury of rat liver*. *Cell Biochem. Funct.* 1984. **2**. p. 217-220
52. Gaunt I. F., Kiss I. S., Grasso P., Gangolli S. D.: *Short-term toxicity study on indigo carmine in the pig*. *Food Cosmet Toxicol.* 1969. **7**. p. 17-24
53. Gerrity T. R., Weaver R.A., Berntsen J., House D. E., O'Neil J. J.: *Extrathoracic and interthoracic removal of O₃ in tidal-breathing humans*. *J. Appl. Physiol.*, 1988. **65**: p. 393-400
54. Gillissen A., Jaworska M., Orth M., Coffiner M., Maes P., App E. M. Cantin A. M., Schultze-Werninghaus G.: *Nacystelyn, a novel lysine salt of N-acetylcysteine, to augment cellular antioxidant defense in vitro*. *Respir. Med.* 1997. **91**. p. 159
55. Guerrero R. R., Rounds D. E., Booher J., Olson R. S., Hackney J. D.: *Ozone sensitivity in aging WI-38 cells based on acid phosphatase content*. *Arch. Environ. Health.* 1979. **34**. p. 407-412
56. Guicherit R., Jelts R., Lindquist F.: *Determination of the ozone concentration in outdoor air near Delft, The Netherlands*. *Environ Pollut.* 1972. **3**. p. 91-110
57. Guicherit R.: *Ozone analysis by chemiluminescence measurement*. *Zeitschrift für Anal. Chem.* 1971. **256**. p. 177-182
58. Hackney J. D., Linn W. S., Mohler J. G., Collier C. R.: *Adaption to short-term respiratory effects of ozone in men exposed repeatedly*. *J. Appl. Physiol: Respir. Environ. Ex. Physiol.* 1977. **43**. 82-85
59. Hackney J. D., Linn W.S., Karuza S. K., Buckley R. D., Law D. C., Bates D. V., Hazucha M., Penegelly L. D., Silverman F.: *Effects of ozone exposure in Canadians and Southern Californians: Evidence for adaption?* *Arch. Environ. Health*, 1977. **31**. p. 110-116

60. Hagen T. M., Brown L. A., Jones D. P.: *Protection against paraquat-induced injury by exogenous GSH in pulmonary alveolar type-II cells*. *Biochem. Pharmacol.* 1986. **35**. p. 4537-4542
61. Hanst P. L., Stephens E., Scott W., Doerr R.: *Adsorption for the infrared determination of trace amounts of ozone*. *Anal. Chem.* 1961. **33**. p. 1113-1115
62. Harbell J. W., Koontz S. W., Lewis R. W., Lovell D., Acosta D.: *IRAG working group 4. Cell cytotoxicity assays. Interagency Regulatory Alternatives Group*. *Food Chem. Toxicol.* 1997. **35**. p. 79-126
63. Hay R., et al., ed. *Mammalian cell lines*. 7. Auflage ed. Catalogue of cell lines & hybridomas. 1992. American Type Culture Collection: Rockville, MD:
64. Hazucha M., J., Folinsbee L. J., Seal E. Jr.: *Effects of steady-state and variable ozone concentration profiles on pulmonary function*. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 1992. **146**. p. 1487-1493
65. Hersh P., Deuringer R.; *Galvanic monitoring of ozone in air*. *Anal. Chem.* 1963. **35**. p. 897-899
66. Horstman D. H., Folinsbee L. J., Ives P. J., Abdul-Salaam S., McDonnell W.: *Ozone concentration and pulmonary response relation: Ships for 6.6 hour exposure with five hours of moderate exercise to 0.08, 0.10 and 0.12 ppm*. *Am. J. Respir. Dis.*, 1990. **142**. p. 1158-1163
67. Horvath S. M., Gliner J. A., Folinsbee L. J.: *Adaption to ozone: Duration of the effect*. *Am Rev. Respir. Dis.* 1981. **123**. p. 496-499
68. Hu S. C., Ben-Jebria A., Ultman, J. S.: *Simulation of ozone uptake distribution in the human airways by orthogonal collaction in finite elements.*, *Comput. Biomed. Res.*, 1992. **25**. p. 264-278
69. Jain A., Martensson J., Mehta T., Krauss A. N., Auld P. A. Meister A.: *Ascorbic acid prevents oxidative stress in glutathione-deficient mice: effect on lung type II cell lamellar bodies, lung surfactant and skeletal muscle*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1992. **89**. p. 5093-5097
70. Jaspers I., Chen L. C., Flescher E.: *Induction of interleukin-8 by ozone is mediated by tyrosine kinase and protein kinase A, but not by protein kinase C*. *J. Cell Physiol.* 1998. **177**. p. 313-323
71. Jenkinson S. G., Lawrence R. A., Zamora C. A., Deneke S. M.: *Induction of intracellular glutathione in alveolar type II pneumocytes following BCNU exposure*. *Am. J. Physiol.* 1994. **266**. p. L125-L130
72. Jewell S. A., Bellomo G., Thor H. Orrenius S., Smith M. T.: *Bleb formation in hepatocytes during drug metabolism is caused by disturbance in thiol and calcium ion homeostasis*. *Science* 1982. **217**. p. 1257-1259
73. Jewell S. A., Di Monte D., Richelmi P., Bellomo G., Orrenius S.: *tert-butylhydroperoxide - Induced toxicity in isolated hepatocytes: Contribution of thiol oxidation and lipid peroxidation*. *J. Biochem. Toxicol.* 1986. **1**. p. 13-22

74. Kafoury R. M., Pryor W.A., Squadrito G. L., Salgo M. G., Zou X., Friedman M.: *Induction of inflammatory mediators in human airway epithelial cells by lipid ozonation products*. Am. J. Respir. Crit. Care Med., 1999. **160**. p. 1934-1942
75. Kangas L., Gronroos M., Nieminen A. L.: *Bioluminescence of cellular ATP: a new method for evaluating cytotoxic agents in vitro*. Med Biol. 1984. **62**. p. 338-343.
76. Keller R., Baltzer P., Keller-Wossidlo H., Gamp R., Ragaz A., Schaub T.: *Akute Auswirkungen der natürlichen atmosphärischen Ozonbelastung auf die Lungenfunktion von klinisch gesunden Rauchern und Nichtrauchern*. Schweiz. Med. Wschr. 1990. **120**. p. 1724-1730.
77. Kerr H. D., Kulle T. J., McIlhany M. L., Swidersky P.: *Effects of ozone on pulmonary function in normal subjects*. Am. Rev. Respir. Dis., 1975. **111**. p. 763-773
78. Koenig J. Q., Covert D. S., Marshall S. G., Belle G. V., Pierson W. E.: *The effects of ozone and nitrogen dioxide on pulmonary function in health and in asthmatic adolescents*. Am. Rev. Respir. Dis., 1987. **136**. p. 1152-1157
79. Langford S. D., Bidani A., Postlethwait E. M.: *Ozone-reactive Absorption by Pulmonary Epithelial Lining Fluid Constituents*. Toxicol. Appl. Pharmacol., 1995. **132**. p. 122-130
80. Laval-Gilly P., Falla J., Klestadt D., Henryon M.: *A new approach to evaluate toxicity of gases on mobile cells in culture*. J. Pharmakol. Toxicol. Meth. 2000. **44**. p. 483-488
81. Layton R. F., Kinman R. N.: *A new analytical method for ozone*. National Speciality Conference on Desinfection. 1970. p. 285. Am. Soc. Civil Engrs
82. Leikauf D., Driscoll K.: *Cellular approaches in respiratory tract toxicology*. 1993. 2. Auflage. Toxicology of the lung. New York. Raven Press. p. 335-370
83. Lemasters J. J., DiGuseppi J., Nieminem A. L., Herman B.: *Blebbing, free Ca²⁺ and mitochondrial membrane potential preceding cell death in hepatocytes*. Nature 1987. **325**. p. 78-81
84. Lemasters J. J., Ji S., Thurman R. G.: *Centrilobular injury following hypoxia in isolated, perfused rat liver*. Science. 1981. **213**. p. 661-663
85. Lew D. S., Holland M. R., Falla N.: *The potential impact of ozone on materials*. 1996. Athm. Environ. **30**. p. 1053-1065
86. Lewry A.: *The effect of ozone on organic materials*. BRE Report N72/91. BRE, Westford, UK
87. Linn W. S., Jones M. P., Bachmayer E. A., Spier C. E., Mazur S. F., Avol E. L., Hackney J. D.: *Short-term respiratory effects of polluted ambient air: A laboratory study of volunteers in a high-oxidant community*. Am Rev. Respir. Dis., 1980. **121**. p. 243-252
88. Magnussen H., Novak D., Jörres R.: *Experimentelle Schadstoffeffekte bei Gesunden und Asthmatikern*. Pneumologie, 1994. **48**. p. 85-88
89. Malorni W., Iosi F., Mirabelli F., Bellomo G.: *Cytoskeleton as a target in menadione-induced oxidative stress in cultured mammalian cells: Alterations underlying surface bleb formation*. Chem Biol. Interact. 1991. **80**. p. 217-236

90. Maridonneau-Parini I., Mirabelli F., Richelmi P., Bellomo G.: *Cytotoxicity of phenazine methosulfate in isolated rat hepatocytes is associated with superoxide anion production, thiol oxidation and alterations in intracellular calcium ion homeostasis.* Toxicol. Lett. 1986. **31**. p. 175-181
91. McDonnell W. F., Kehrl H. R., Abdul-Salaam S., Ives P. J., Folinsbee L. J., Devlin R. B., O'Neil J. J., Horstman D. H.: *Respiratory response of humans exposed to low levels of ozone for 6.6 hours.* Arch. Environ. Health, 1991. **46**. p. 145-150
92. McManus M. S., Gong H., Clark J. J.: *Tolerance to repeated daily ozone exposures in asthmatic subjects.* Am Rev. Respir. Dis. 1990. **141**. A70
93. Meister A.: *Glutathione metabolism and its selective modification.* J. Biol. Chem. 1988. **263**. p. 17205-17208
94. Meunier L., Canonica S., von Gunten U.: *Implications of sequential use of UV and ozone for drinking water quality.* Water Res. 2006. **40**. p. 1864-1876
95. Michiels C., Toussaint O., Remacle J.: *Comperative study of oxygen toxicity in human fibroblasts and endothelial cells.* J. Cell Physiol. 1990. **144**. p. 295-302
96. Miller F. J., Overton J. H. Jr., Jaskot R. H., Menzel D. B.: *A model of the regional uptake of gaseous pollutants in the lung: I. the sensitivity of the uptake of ozone in the human lung to lower respiratory tract secretions and exercise.*, Toxicol. Appl. Pharmacol, 1985. **79**. p. 11-27
97. Mirabelli F., Salis A., Marinoni V., Finardi G., Bellomo G., Thor H., Orrenius S.: *Menadione-induced bleb formation in Hepatocytes is associated with the oxidation of thiol groups in actin.* Arch. Biochem Biophys. 1988. **264**. p. 261-269
98. Moore M., Thor H., Moore G., Nelson S., Moldeus P., Orrenius S.: *The toxicity of acetoaminophen and N-acetyl-p-benzoquinone imine in isolated hepatocytes is associated with thiol depletion and increased cytosolic calcium.* J. Biol. Chem. 1985. **26**. p. 13035-13040
99. Mosman T.: *Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays.* J Immunol Methods. 1983. **65**. p. 55-63
100. Mückter H., Zwing M., Bäder S., Marx T., Doklea E., Liebl B., Fichtl B., Georgieff M.: *A novel apparatus for the exposure of cultured cells to volatile agents.* J. Pharmacol. Toxicol. Meth. 1998. **40**. p. 63-69
101. Mudway I. S., Kelly F. J.: *Ozone and the lung: a sensitive issue.* Mol Aspects Med. 2000. **21**. p. 1-48
102. Mustafa M. G., Lee S. D.: *Pulmonary biochemical alterations resulting from ozone exposure.* Ann Occup Hyg. 1976. **19**. p. 17-26
103. Mustafa M. G.: *Biochemical basis of ozone toxicity.* Free Radic. Biol. Med. 1990. **9**. p. 245-265
104. Orrenius S., Jewell S. A., Thor H., Bellomo G., Eklow L., Smith M. T.: *Drug-induced alterations in the surface morphology of isolated hepatocytes.* In Isolation, Characterization and Use of Hepatocytes. 1983. (Harris R. A.; Cornell N. W. Ed.) p. 333-340. Elsevier

105. Pace D. M., Landolt P. A., Aftonomos B. T.: *Effects of ozone on cells in vitro*. Arch. Environ. Health. 1969. **18**. p. 165-170
106. Pace D. M., Thompson J. R., Aftonomos B. T., Holck H. G. O.: *The effects of NO₂ and salts of NO₂ upon established cell lines*. Can. J. Biochem. Physiol. 1961. **39**. p. 1247-1255
107. Philipps R. J., Denas S. M., Sielczak M. W., Wanner A.: *Effects of 0,5 ppm ozone on glycoprotein secretion, ion and water fluxes in sheep trachea*. J. Appl. Physiol. 1986. **60**. p. 918-927
108. Plopper C. G., Chow C. K., Dungworth D. L., Brummer M., Nemeth T. J.: *Effect of low level of ozone on rat lungs. II. Morphological responses during recovery and re-exposure*. Exp Mol Pathol. 1978. **29**. p. 400-411
109. Plopper C. G., Hatch G. E., Wong V., Duan X., Weir A. J., Tarkington B. K., Devlin R. B., Becker S., Buckpitt A. R.: *Relationship of inhaled ozone concentration to acute tracheobronchial epithelial injury. Site-specific ozone dose, and glutathione depletion in rhesus monkeys*. Am J. Respir. Cell Mol. Biol. 1998. **19**. p. 387-399
110. Plopper C. G., Van Winkle L. S., Fanucchi M. V., Malburg S. R. C. Nishio S. J.: *Early events in naphthalene-induced acute Clara Cell toxicity - Comparison of Glutathione Depletion and histopathology by airway location*. Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol. 2001. **24**. p. 272-281
111. Postlethwait E. M., Langford S. D., Bidani A.: *Determinants of inhaled ozone absorption in isolated rat lungs*. Toxicol. Appl. Pharmacol., 1994. **125**. p. 77-89
112. Pryor W. A., Church D. F.: *Aldehyds, hydrogen peroxide and organic radicals as mediators of ozone toxicity*. Free Rad. Bio. Med., 1991. **11**. p. 41-46
113. Pryor W. A., Squadrito G. L., Friedman M.: *The cascade mechanism to explain ozone toxicity: The role of lipid ozonation products*. Free Rad. Bio. Med., 1995. **19**. p. 935-941
114. Pryor W. A.: *How far does ozone penetrate into pulmonary air/tissue boundary before it reacts*. Free Rad. Biol. Med., 1992. **12**. p. 83-88
115. Pryor W. A.: *Mechanisms of radical formation from reactions of ozone with target molecules in the lung*. Free Radical. Biol. Med. 1994. **17**. p. 451-465
116. Puck T. T., Marcus P. I.: *Action of X-Rays on Mammalian cells*. J. Exp. Med. 1956. **103**. p. 653-666
117. Rahman I., MacNee W.: *Regulation of redox glutathione levels and gene transcription in lung inflammation. Therapeutic approaches*. Free Radic. Biol. Med. 2000. **28**. p. 1405-1420
118. Rahman I., Bel A., Mulier B., Donaldson K., MacNee W.: *Differential regulation of glutathione by oxidants and dexamethasone in alveolar epithelial cells*. Am. J. Physiol. 1998. **275**. p. L80-L86
119. Rahman I. Li X. Y., Donaldson K., Harrison D. J., MacNee W.: *Glutathione homeostasis in alveolar epithelial cells in vitro and in vivo under oxidative stress*. Am. J. Physiol. 1995. **269**. p. L285-L292

120. Rasmussen R. E.: *In vitro systems for exposure of lung cells to NO₂ and O₃*. J. Toxicol. Environ. Health. 1984. **13**. p. 397-411
121. Richtlinie 2002/3/EG des Europäischen Parlaments und des Rates vom 12. Februar 2002 über den Ozongehalt der Luft. Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften
122. Rietjens I. M. C. M., Alink G. M., Vos R. M. E. : *The role of glutathione and changes in thiol homeostasis in cultured lung cells exposed to ozone*. Toxicol. 1985. **35**. p. 207-217
123. Rithidech K, Hotchkiss J. A., Griffith W. C., Henderson R. F., Brooks A. L.: *Chromosome damage in rat pulmonary alveolar macrophages following ozone inhalation*. Mutat. Res. 1990. **241**. p. 67-73
124. Ritter D., Knebel J. W., Aufderheide M.: *In vitro exposure of isolated cells to native gaseous compounds - development and validation of an optimized system for human lung cells*. Exp. Toxicol. Pathol. 2001. **53**. p. 373-386
125. Sachs L.: *Statistische Entscheidungstechnik..* 1991. 7. Auflage. Angewandte Statistik.. p. 188 Springer, Heidelberg
126. Samet J. M., Hatch G. E., Horstman D., Steck-Scott S., Arab L., Bromberg P. A., Levine M., McDonnell W. F., Devlin R. B.: *Effect of antioxidant supplementation on ozone-induced lung injury in human subjects*. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 2001. **164**. p. 819-825
127. Santrock J., Hatch G. E., Slade R., Hayes J. M.: *Incorporation and disappearance of oxygen-18 in lung from mice exposed to 1 ppm ¹⁸O₃*, Toxicol. Appl. Pharmacol., 1989. **98**. p. 75-80
128. Sato T., Tanaka J., Kono Y.: *Hepatic cellular injury following lethal Escherichia coli bacteriemia in rats*. Lab Invest. 1982. **47**. p. 304-310
129. Schafer F. Q., Buettner G. R.: *Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple*. Free Radic Biol Med. 2001. **30**. p. 1191-1212
130. Schelege E. S., Adams W. C., Giri S. N., Siefkin A. D.: *Acute ozone exposure increases plasma prostaglandin F2a.*, Am. Rev. Respir. Dis., 1989. **140**. p. 211-216
131. Schönbein C. F.: *Recherches sur la nature de l'odeur qui se manifeste dans certaines actions chimiques*. Comptes Rendus Acad. Sciences, 1840. **10**: p. 705-710
132. Schweisfurth H.: *Umweltschadstoff Ozon*. Dtsch. Med. Wschr. 1994. **119**. p. 351-355
133. Scott R. E., Perkins R. G., Zschunke M. A., Hoerl B. J., Maerklein P. B.: *Plasma membrane vesiculation in 3T3 and SV3T3 cells: I Morphological and biochemical characterization*. J. Cell Sci. 1979. **35**. p. 229-243
134. Shechter H.: *Spectrophotometric method for determination of ozone in aqueous solutions*. Water Res. 1973. **7**. p. 729-739
135. Stedman J. R.: *The predicted number of air pollution related deaths in the UK during the August 2003 heatwave*. Atm Environ. 2004. **38**. p. 1087-1090

-
136. Stenfors N., Pourazar J., Blomberg A., Krishna M. T., Mudway I., Helleday R., Kelly F. J., Frew A. J., Sandstorm T.: *Effect of ozone on bronchial mucosal inflammation in asthmatic and healthy subjects*. *Respir. Med.* 2002. **96**. p. 352-358
137. Sun J. D., Pickrell J. A., Harkema J. A., McLaulin S. I., Hahn F. F., Henderson R. F.: *Effects of buthionine sulfoximine on the development of ozone-induced pulmonary fibrosis*. *Exp. Mol. Path.* 1988. **49**. p. 254-266
138. Suter P. M., Domebighett G., Schaller M. D., Laverriere M. C., Ritz R., Peter C.: *N-acetylcysteine enhances recovery from acute lung injury in man*. *Chest*. 1994. **105**. p. 190-194
139. Tennant J. R.: *Evaluation of the trypan blue technique for determination of cell viability*. *Transplant*. 1964. **12**. p. 685-694
140. Tietze F.: *Enzymatic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: application of mammalian blood and other tissues*. *Anal. Biochem.* 1969. **27**. p. 502-522
141. Todokoro M., Mochizuki H., Tokuyama K., Utsugi M., Dobashi K., Mori M., Morikawa A.: *Effect of ozone exposure on intrazellular glutathione redox state in cultured human airway epithelial cells*. *Inflam.* 2004. **28**. p. 105-114
142. Toth K. M., Berger E. M., Beehler C. J., Repine J.: *Erythrocytes from cigarette smokers contain more glutathione and catalase and protect endothelial cells from hydrogen peroxide better than do erythrocytes from nonsmokers*. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 1986. **134**. p. 281-284
143. Trump B. F., Berezsky I., Laiho K. U. 1980 in *Scanning Electron Microscopy* (O'Hare A. F. M., Ed.) p. 431-462. SEM, Inc. Chicago
144. Trump B. F., Berezsky I., Phelps P. C. 1981 in *Scanning Electron Microscopy* (O'Hare A. F. M., Ed.) p. 435-454. SEM, Inc. Chicago
145. Umweltbundesamt: *Kurzbericht – Ozonsituation 2003 in der Bundesrepublik Deutschland*, Berlin (Dezember 2003)
146. Van der Zee J., Dubbelman T. M., Raap T. K., Van Steveninck J.: *Toxic effects of ozone on murine L929 fibroblasts. Enzyme inactivation and glutathione depletion*. *Biochem. J.* 1987a. **242**. p. 707-712
147. Van der Zee J., Dubbelman T. M., Van Steveninck J.: *Toxic effects of ozone on murine L929 fibroblasts. Damaging action on transmembrane transport systems*. *Biochem. J.* 1987b. **245**. p. 301-304
148. Van der Zee J., Van Beek E., Dubbelman T. M., Van Steveninck J.: *Toxic effects of ozone on murine L929 fibroblasts. Damage to DNA*. *Biochem. J.* 1987c. **247**. p. 69-72
149. Van Winkle L. S., Johnson Z. A., Nishio S. J., Brown C. D., Popper C. G.: *Early events in naphthalene-induced acute Clara Cell toxicity - Comparison of membrane permeability and ultrastructure*. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 1999. **21**. p. 44-53
150. Wallaert B., Fahy O., Tsicopoulos A., Gosset P., Tonnel A. B.: *Experimental systems for mechanistic studies of toxicant induced lung inflammation*. *Toxicol. Lett.* 2000. **112-113**. p. 157-163

151. Wallaert B., Gosset P., Boitelle A., Tonnel A.B.: *In vitro assessment of environmental toxicology using alveolar cells as target*. 1996. Cell Biol. Toxicol. **12**. p. 251-256
152. Wallaert B., Voisin C.: *In vitro study of gas effects on alveolar macrophages*. Cell Biol. Toxicol, 1992. **8**. p. 151-156
153. Warren D. L., Brown D. Jr., Buckpitt A. R.: *Evidence for cytochrome P-450 mediated metabolism in the bronchiolar damage by naphthalene*. Chem. Biol. Interact. 1982. **40** p. 287-303
154. Wegenke M: *Wirkungen und Wirkschwellen von Ozon beim Menschen*. Berichte aus dem Bayrischen Landesamt für Umweltschutz, 1994. **6**. p. 23-31
155. Wenzel D. G., Kotek M. S., Morgan D. L., Wrobel W. J.: *An ozone-generating system and chamber for testing injury to cultured cells*. Arch. Environ. Health. 1979. **34**. p. 454-460
156. West J. J. A., Chichester C. H., Buckpitt A. R., Tyler N. K., Brennan P., Helton C., Plopper C. G.: *Heterogeneity of Clara cell glutathione: a possible basis for differences in cellular responses to pulmonary cytotoxicants*. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 2000. **23**. p. 27-36
157. Weymer A. R., Gong H. Jr., Lyness A., Linn W. S.: *Pre-exposure to ozone does not enhance or produce exercise-induced asthma*. Am. J. Respir. Crit. Care Med., 1994. **149**. p. 1413-1419
158. Yamauchi T., Shima M., Kuwaki T., Ando M., Ohmichi M., Fukuda Y., Adachi M.: *Acute effects of ozone exposure on lung function in mice sensitized to ovalbumin*. Toxicol. 2002. **172**. p. 69-78
159. Zahrebelski G., Nieminen A. L., al-Ghoul K., Quian T., Herman B., Lemasters J. J.: *Progression of subcellular changes during chemical hypoxia to cultured rat hepatocytes: a laser scanning confocal microscopic study*. Hepatology. 1995. **21**. p. 1361-1372

8 Lebenslauf

Name:	Kerstin Reinelt
Geburtsdatum:	18.07.1979
Geburtsort:	Dachau
01/2004 bis 01/2008	Promotion am Walther-Straub-Institut für Pharmakologie und Toxikologie der LMU Thema: Wirkungen von Ozon auf A549 und L929 Zellen <i>in vitro</i>
10/1998 bis 12/2004	LMU, München, Studiengang Biologie Abschluss als Diplom-Biologin, Note: sehr gut Hauptfach: Genetik Nebenfächer: Mikrobiologie, Immunologie, Pharmakologie und Toxikologie, Biochemie Thema der Diplomarbeit: „Der Transformationsapparat von <i>Acinetobacter</i> sp. BD413: Lokalisation, Identifikation und funktionelle Interaktionen“
09/1989 bis 08/1998	Josef-Effner-Gymnasium Dachau Abschluss der allgemeinen Hochschulreife, Note: gut
09/1985 bis 08/1989	Grundschule Erdweg