

Aus dem Walther-Straub-Institut
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Vergleich der Zytotoxizität der Bipyridine Diquat und Paraquat in-vitro

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

vorgelegt von Christian Juretschke
aus
Georgsmarienhütte

2017

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

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

Mitberichterstatter: PD. Dr. med. Kai Kehe

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter:

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 19.01.2017

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abkürzungsverzeichnis	III
1 Einleitung	1
1.1 Bipyridine als Pflanzengifte	1
1.2 Mechanismus der Vergiftung	2
1.3 Zelluläre Schäden	4
1.4 Verlauf der Bipyridin-Vergiftung.....	5
1.5 Pathomechanismus der Paraquat-induzierten Lungenfibrose.....	6
1.6 Weitere Besonderheiten der Paraquat-Vergiftung.....	7
1.7 Management der Vergiftung.....	7
1.8 Erprobung von Antioxidantien	8
1.9 Fragestellungen der Arbeit	9
2 Material und Methoden	10
2.1 Verwendete Chemikalien und Gase.....	10
2.2 Verwendete Nährmedien und Pufferlösungen.....	10
2.3 Verwendete Geräte und Verbrauchsmaterialien	11
2.4 Zellkultur	11
2.5 Vergleichende Expositionsversuche mit Bipyridinen	12
2.6 Erholungsversuche.....	14
2.7 Versuche mit Antioxidantien.....	15
2.8 Biochemische Tests	16
2.9 Verwendete Software und Statistik	19
3 Ergebnisse	20
3.1 Vorversuche.....	20
3.2 Vergleichende Expositionsversuche mit Bipyridinen	22
3.3 Erholungsversuche.....	35
3.4 Versuche mit Antioxidantien.....	37
3.5 Anwendbarkeit der Haber'schen Regel	40
4 Diskussion	43
4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse.....	43
4.2 Vergleich der Bipyridin-Exposition in-vitro	43
4.3 Einfluss der Veränderung des Sauerstoffpartialdrucks.....	48

4.4 Wirkung der Antioxidantien	51
5 Zusammenfassung	55
Anhang	56
1 Abbildungsverzeichnis	56
2 Tabellenverzeichnis	63
Literaturverzeichnis	68
Eidesstattliche Versicherung	IV
Danksagung	V

Abkürzungsverzeichnis

ARDS	Acute Respiratory Distress Syndrome
ATCC	American Type Culture Collection
BE	Bipyridin-Entfernung
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DQ	Diquat
DTNB	5,5'-Dithobis-(2-nitrobenzoat)
EC ₅₀	mittlere effektive Konzentration
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
GSH	reduzierte Form von Glutathion
GSSG	oxidierte Form von Glutathion
GSX	Gesamtglutathion
HBSS	Hanks's Balanced Salt Solution
HWZ	Halbwertszeit
KG	Körpergewicht
LPO	Lipidperoxidation
MW	Mittelwert
NAC	N-Acetylcystein
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NFκB	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PQ	Paraquat
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
SD	Standardabweichung
TNB	2-Nitro-5-thiobenzoat
XTT	2,3-Bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfohenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilid
ZNS	Zentralnervensystem

1 Einleitung

1.1 Bipyridine als Pflanzengifte

Bipyridin-Verbindungen sind Inhibitoren der Photosynthese und werden als Herbizide (Unkrautbekämpfungsmittel) verwendet. Am häufigsten werden die strukturell verwandten Moleküle Diquat (1,1'-Ethylen-2,2'-bipyridyldiylidiniumdibromid) (DQ) und Paraquat (1,1'-Dimethyl-4,4'-bipyridiniumdichlorid) (PQ) eingesetzt. Die Strukturformeln beider Moleküle sind in Abbildung 1.1 dargestellt. Vor allem PQ ist durch tödlich verlaufende Vergiftungen (Lungenfibrose) bekannt geworden.

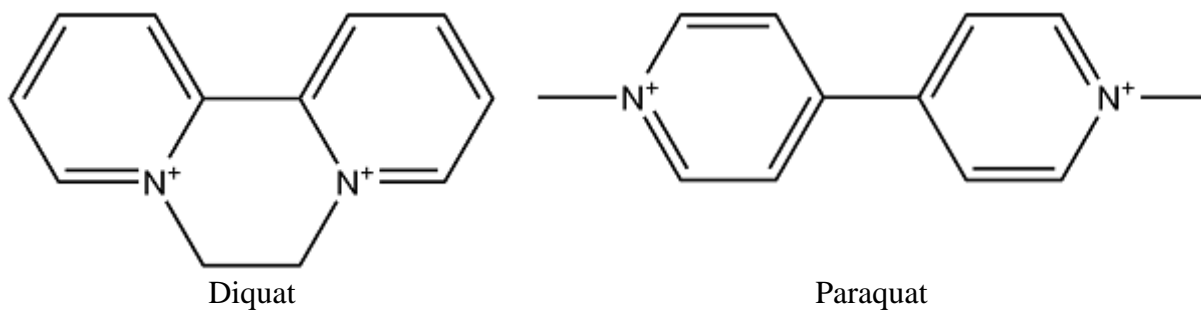


Abb. 1.1: Die Strukturformeln von DQ und PQ.

DQ ist seit den 1950er Jahren im Handel erhältlich, PQ folgte 1962 [1, 2]. Beide Herbizide werden unter zahlreichen Namen vertrieben. Bekannte Beispiele sind Reglone® (200g/L; DQ) und Gramoxone® (200g/L; PQ) vom Hersteller Syngenta. Beide werden durch Adsorption an Lehmteilchen inaktiviert und gelangen nicht ins Grundwasser [1, 2]. DQ und PQ werden unter anderem in der Vorernte von Früchten, Gemüse und Kartoffeln eingesetzt. Besonders PQ gilt als sehr effektiv, da es Unkräuter schnell vernichtet und kostengünstig ist [1, 2].

Vergiftungen durch PQ wurden erstmals 1966 beschrieben [3]. Seitdem ist es für tausende von Todesfällen verantwortlich [4]. Im Vergleich dazu sind Intoxikationen durch DQ selten. In den Jahren von 1968 bis 1999 wurden 30 Fälle in der Literatur beschrieben [2]. Besonders in Ländern der Dritten Welt wurden beide Bipyridine als Suizidmittel missbraucht [2, 5, 6]. Zusätzlich gab es tragische pädiatrische Fälle akzidenteller Ursache [7-9]. Von 2002 bis 2013 wurden im süddeutschen Raum jeweils vier Vergiftungsfälle mit DQ oder PQ gezählt.

In der Europäischen Union ist PQ seit 2007 verboten [4], DQ ist frei erhältlich. Weltweit werden jedoch beide weiterhin eingesetzt. Die Sicherheitsbestimmungen im Umgang mit den

Herbiziden divergieren erheblich. In den USA müssen Arbeiter beim Ausbringen Overalls, Augen- und Atemschutz tragen. In Afrika, Asien und Lateinamerika tragen die Arbeiter, wenn überhaupt, Schals oder Tücher als provisorischen Mundschutz (siehe Abbildung 1.2).



Abb. 1.2: Chinesische Plantagenarbeiterin beim Versprühen von PQ. Eine Schutzausrüstung für Atemwege, Augen und Haut kommt nicht zum Einsatz [10].

Von der United States Environmental Protection Agency wurde DQ als nicht karzinogen für den Menschen eingestuft [11]. PQ könnte ein Risikofaktor für das Maligne Melanom [12] und für Morbus Parkinson sein [13].

Seit 2000 erschienen zu PQ jährlich mehr als 130 Publikationen [4]. Schwerpunkte sind die Suche nach einem Antidot, die Pulmotoxizität und der Zusammenhang mit dem Morbus Parkinson. An DQ wird vergleichsweise wenig geforscht.

1.2 Mechanismus der Vergiftung

Der zentrale Wirkmechanismus der Bipyridine ist ein autokatalytischer Redoxzyklus. Dies gilt für pflanzliche Zellen [1, 14], sowie für Säugerzellen [1, 2]. Beide Substanzen pro-

duzieren auf gleiche Weise sehr effektiv Radikale [1, 2, 15]. Nach Aufnahme in die Säugerzelle interagieren die Herbizide mit der Cytochrom P450 Reduktase. Das Enzym überträgt ein Elektron auf das Bipyridin. Kofaktor der Reaktion ist $\text{NAD(P)H} + \text{H}^+$. Es entsteht ein reaktionsfreudiges Kation-Radikal. Dieses Radikal reagiert mit zellulärem Sauerstoff. Es entsteht die Ausgangsverbindung und ein Superoxid-Anion. Das Bipyridin steht wieder zur Verfügung und startet die oben genannte Reaktion erneut. Ein autokatalytischer Redoxzyklus ist die Folge [1, 16, 17]. Abbildung 1.3 zeigt eine schematische Darstellung am Beispiel von PQ.

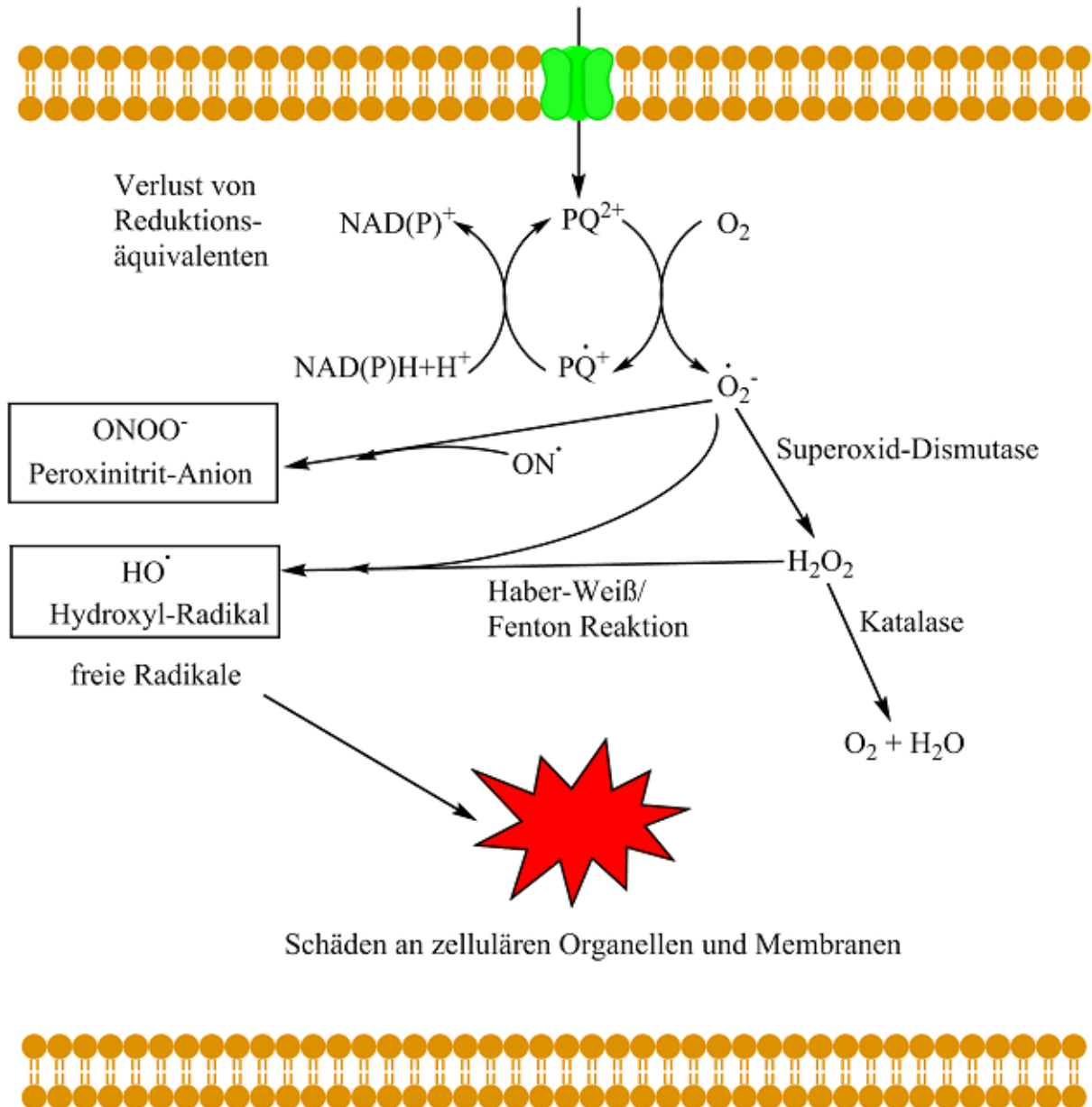


Abb. 1.3: Intrazellulärer Redoxzyklus von PQ und Radikalentstehung. DQ reagiert ebenso.

Das gebildete Superoxid-Anion wird von der Superoxid-Dismutase zu Wasserstoffperoxid umgewandelt. H_2O_2 zerfällt entweder spontan oder wird von der Katalase zu O_2 und H_2O

umgewandelt oder reagiert wiederum mit einem Superoxid-Anion zu einem Hydroxyl-Radikal. Die letztgenannte Reaktion ist unter dem Namen Haber-Weis-Reaktion bekannt [18]. Spontan läuft sie nur langsam ab. In Anwesenheit von Metall-Ionen wird sie katalysiert (Fenton-Reaktion). Das entstandene Hydroxyl-Radikal gehört zu den reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) [1, 16]. Auch intrazelluläres Stickstoffmonoxid reagiert mit dem Superoxid-Anion. Dabei entstehen Peroxinitrit-Anionen. Hydroxyl-Radikale und Peroxinitrit-Anionen führen zu Zellschäden [1, 17, 19, 20].

In Pflanzenzellen erfolgt die Hemmung der Photosynthese durch Störung des Elektronenflusses. Die durch den Redoxzyklus produzierten Superoxid-Anionen schädigen Membranen und Organellen [1, 14].

1.3 Zelluläre Schäden

Die Hydroxyl-Radikale und Peroxinitrit-Anionen werden zunächst von den Schutzmechanismen der Zelle abgefangen. Die Zelle hat dafür die Glutathionperoxidase, die Katalase und die Superoxid-Dismutase zur Verfügung [1, 17]. Glutathion ist das wichtigste Antioxidans der Zelle. Beim Abfangen von Radikalen geht es in seine oxidierte Form (GSSG, ein Dimer) über. Die Rückführung in die reduzierte Form erfolgt enzymatisch und benötigt $\text{NADPH} + \text{H}^+$ als Kofaktor. Der zusätzliche GSSG-Verlust durch die Bipyridine wirkt sich kritisch aus [21]. Bei Überlastung dieser Systeme reagieren die ROS mit anderen zellulären Strukturen und führen zu Schäden [1].

Bei der Lipidperoxidation (LPO) von Membranen handelt es sich – chemisch betrachtet – um eine radikalische Substitution. Der ungesättigte Teil der Fettsäuren (zum Beispiel Phosphatidylcholin) überträgt ein Elektron auf das angreifende Hydroxyl-Radikal (Initiation). Es entsteht ein Fettsäure-Radikal und Wasser. Dieses Radikal ist sehr instabil und reagiert mit Sauerstoff zu einem Fettsäure-Peroxyradikal. Durch die Aufnahme eines Elektrons einer weiteren Fettsäure entstehen ein Fettsäure-Hydroperoxid und ein neues Fettsäure-Radikal (Prolongation). Die Reaktion endet, wenn zwei Radikale miteinander reagieren (Termination). Als Folge wird die Membran durchlässig und die Zelle geht in die Apoptose [1, 17, 22]. Einige Beispiele betroffener Membranen sind die der Zelle, der Mitochondrien und des endoplasmatischen Retikulums.

Mitochondrien sind ein weiterer Angriffspunkt der Bipyridine. PQ wird von Komplex I (NADH-Ubichinon-Oxidoreduktase) der Atmungskette reduziert und generiert Superoxid-Anionen. Die beobachtete Membrandepolarisation wird vermutlich durch LPO der inneren Mitochondrienmembran bedingt [17, 23].

Die Radikale reagieren auch mit der DNS und den Proteinen in der Zelle. Es kommt zu Strangbrüchen und chromosomalen Schäden. In Proteinen sind es vor allem Thiolgruppen, die verändert (oxidiert) werden. Wenn Schlüsselenzyme des Zellmetabolismus betroffen sind, kann die Zelle ihre Homöostase nicht aufrechterhalten. Eine mögliche Folge ist der Zelltod durch Apoptose oder Nekrose [1, 17].

Der Transkriptionsfaktor NFκB (nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells) wird durch ROS aktiviert. Dieser Signalweg hat eine wichtige regulatorische Bedeutung. Er induziert Apoptose und Entzündungsreaktionen. Nach Aktivierung kommt es zur Synthese (Transkription) von pro-inflammatorischen Enzymen, Zytokinen und Chemokinen. Diese Entzündungsmediatoren könnten bei der Lungenfibrose eine Rolle spielen, die nach PQ-Exposition beobachtet wird [17, 24].

1.4 Verlauf der Bipyridin-Vergiftung

Bipyridin-Vergiftungen werden in drei Schweregrade eingeteilt. Eine leichte Intoxikation liegt vor, wenn die verschluckte DQ-Menge <50mg/kg KG beträgt. Bei der moderaten beträgt die Menge >50mg/kg KG, aber <200mg/kg KG. Ab >200mg/kg KG handelt es sich um eine schwere Vergiftung. Bei PQ sind die aufgenommenen Mengen geringer. 20 bis 30mg/kg KG (leicht), 40 bis 55mg/kg KG (moderat) und >55mg/kg KG (schwer) [3].

Nach der oralen Aufnahme kommt es an der Mukosa zu korrosiven Schäden bis zur Ulzeration [3, 17]. Der gesamte gastrointestinale Trakt ist betroffen [25, 26]. Zusätzlich kann sich ein Pharynx- und Zungenödem ausbilden [27]. Intensive dermale Exposition führt zu einer Kontaktdermatitis und ausgedehnten Epitheldefekten, die einer Verbrennung dritten Grades ähneln [28, 29]. Beim Kontakt mit dem Nagelbett kommt es zu Wachstumsstörungen der Fingernägel [28, 30]. Die Inhalation von den Bipyridinen führt bei Patienten zu Epistaxis, Halsschmerzen und Entzündungen der Nasenschleimhaut [26, 31]. An den Augen kommt es zur Konjunktivitis und zu Erosionen der Kornea [32, 33].

Systemisch reagieren die Patienten mit Nausea, Emesis, Diarrhoe und Abdominalschmerzen [3]. Bei der moderaten Vergiftung ist die Ausbildung eines paralytischen Ileus und eines hypovolämischen Schocks beschrieben, bei schwerer Vergiftung sehr wahrscheinlich [3]. Bei moderaten und schweren Vergiftungen ist ein akutes Leberversagen möglich [1, 3]. Nephrotoxisch sind die Bipyridine in Form von leichter Proteinurie bis zum akuten Nierenversagen [25]. Mikroskopisch sind Tubulusnekrosen erkennbar [1, 2]. Die Lungen neigen zur Ödem- bildung. Beim Menschen ist in schweren Fällen ein tödliches Lungenversagen durch PQ unausweichlich. Es kommt zur massiven Fibrosierung in den Lungen [3, 17]. Bei Patienten mit DQ-Vergiftung wurde keine Lungenfibrose beschrieben [3]. Kardiotoxisch zeigen sich die Herbizide in Form von ventrikulären Arrhythmien [3, 34]. Viele Patienten wurden im klini- schen Verlauf komatös oder erlitten Krampfanfälle [2, 17]. Zusätzlich wurden bei DQ Hirn- stamminfarkte sowie pontine und intrakranielle Blutungen beobachtet [3]. Patienten mit schwerer Vergiftung verstarben meist an einem Multiorganversagen [17]. Bei PQ enden mehr als 50% der Vergiftungsfälle letal.

Eine Patientin mit paranoider Schizophrenie applizierte sich DQ unter Halluzinationen vaginal. Auch sie entwickelte die oben beschriebenen systemischen Reaktionen [35].

1.5 Pathomechanismus der Paraquat-induzierten Lungenfibrose

Der Pathomechanismus der Lungenfibrose ist in zwei Phasen gegliedert. In der destruktiven Phase kommt es zur akuten Alveolitis. Beide Alveolarepithelzell-Typen schwellen an. Mito- chondrien und endoplasmatisches Retikulum gehen zugrunde. Irreversibel geschädigte Zellen gehen in die Apoptose. Die Folge ist eine Inflammation mit Ausschüttung von Interleukin 8 und Tumornekrosefaktor α [36]. Die destruktive Phase erstreckt sich ungefähr über fünf Tage. Danach zeigen die Patienten eine kurzzeitige Verbesserung. An Stelle der Alveolar- epithelzellen wandern Fibroblasten in den Alveolarraum ein und proliferieren. Diese pro- liferative Phase dauert ungefähr zwei bis drei Wochen [37, 38]. Nach ausgebildeter Lungen- fibrose kann der Sauerstoff nicht mehr ausreichend diffundieren. Die Patienten versterben an der respiratorischen Insuffizienz [1].

1.6 Weitere Besonderheiten der Paraquat-Vergiftung

Beide Bipyridine zeigen zahlreiche Gemeinsamkeiten, aber bei der Vergiftung durch PQ gibt es zwei Besonderheiten.

PQ akkumuliert in der Lunge. Grund dafür ist ein Polyamin-Transporter. Es werden nur Moleküle befördert, die mindestens zwei positiv geladene Stickstoffatome haben. Zwischen den Ladungen muss sich eine nicht-polare Gruppe befinden. DQ wird von dem Transporter nicht erkannt, da sich die beiden Stickstoffatome zu nahe beieinander befinden (siehe Abbildung 1.1) [1].

PQ gilt als Auslöser für Morbus Parkinson [13]. In Mäusen kam es zum Verlust dopaminerger Neurone in der Substantia nigra [39]. Trotz neurotoxischer Effekte wird DQ bislang nicht mit der Entstehung von Morbus Parkinson in Zusammenhang gebracht [40].

1.7 Management der Vergiftung

Für die Intoxikation durch DQ oder PQ gibt es kein einheitliches Therapieregime. Ein Antidot ist nicht bekannt [1, 2, 17]. Zum Verhindern weiterer Absorption des Giftes wurde die Gabe von Aktivkohle oder Walkerde empfohlen [1, 2]. Die Durchführung einer Magenspülung wird aufgrund möglicher Komplikationen (Darmperforation) nicht empfohlen [1-3]. Oft sind nur symptomorientierte, unterstützende Maßnahmen durchführbar. Eine ausreichende Volumensubstitution ist wegen des hohen Flüssigkeitsverlustes zu gewährleisten [1, 17]. Bei drohendem Nierenversagen wird in der Regel dialysiert [2, 41]. Epileptische Anfälle (bei DQ-Intoxikation) werden mit Benzodiazepinen behandelt. Von einer Sauerstoffgabe wird abgeraten. Diese erfolgt nur in palliativen Fällen [17]. Die Patienten werden mit Opioiden analgetisch behandelt [17].

Bei der PQ-Vergiftung wird zur genauen Abklärung die Computertomographie der Lunge empfohlen. Frühe Anzeichen einer Lungenfibrose können erkannt werden [17]. Typische Zeichen sind milchglasartige Verschattungen in den zentralen Arealen der Lunge. Die Fibrose im Spätstadium zeigt sich radiologisch in Form eines Honigwabenmusters [42].

Der Lungenfibrose geht eine Entzündungsreaktion (siehe 1.5) voraus [1, 36]. Es wurde versucht mit Immunsuppressiva eine Verbesserung der Prognose zu erzielen. Eingesetzt wurden Cyclophosphamid mit MesNa, Prednisolon und Dexamethason. Mit Dexamethason be-

handelte Ratten hatten eine bessere Prognose als nicht behandelte Tiere [43]. Die Kombination von Cyclophosphamid mit einem Glukokortikoid erhöhte die Überlebensrate vergifteter Patienten [44, 45]. Eine Senkung der Mortalität wurde beobachtet, wenn Patienten mit allen drei genannten Substanzen therapiert wurden [46].

1.8 Erprobung von Antioxidantien

Die bei der Vergiftung durch PQ entstehende Lungenfibrose trägt maßgeblich zur infausten Prognose bei. Um dem entgegenzuwirken wurden viele Substanzen ausprobiert. Große Hoffnung wurde in Antioxidantien gesetzt. Die Ergebnisse erprobter Testsubstanzen (Ascorbinsäure, N-Acetylcystein (NAC) und α -Tocopherol) waren in-vitro vielversprechend und in-vivo aufbaufähig [17]. Die Forschung konzentrierte sich bisher vor allem auf die Intoxikation mit PQ. Experimentelle Antioxidantien (U-74006F und U-78517G) wurden bei DQ erprobt. Die Gabe vor Intoxikation hatte einen schützenden Effekt, aber die Behandlung nach Vergiftung war erfolglos [47].

Ascorbinsäure (Vitamin C) wurde bereits bei Patienten mit PQ-Intoxikation gegeben. Die Patienten erhielten fünf Tage hintereinander in aufsteigender Dosierung (maximal 3000mg) den Radikalfänger. Bis zu 1000mg Vitamin C wurden problemlos vertragen. Hong et al schlossen aus ihren Ergebnissen einen Nutzen von Ascorbinsäure bei Vergiftung mit PQ [48].

Dimethylsulfoxid (DMSO) ist ein direkter Radikalfänger. Des Weiteren wirkt es entzündungshemmend. Es ist Schleppersubstanz und ein Penetrationsmittel für andere Wirkstoffe [49]. DMSO wirkt erst in hohen Konzentrationen (>5%) als Zellgift. Die Caco2/TC7 Zelllinie tolerierte Konzentrationen bis zu 10% [50]. In der Literatur gab es keinen Hinweis auf den Einsatz von DMSO bei Bipyridin-Vergiftung.

Bei der PQ-Vergiftung wurde Hoffnung in NAC gesetzt. In-vitro wurde es als Quelle für Thiolgruppen verwendet [51]. Zusätzlich fungiert es als direkter Radikalfänger [52]. NAC war in der Lage, Entzündungsmediatoren und ROS zu verringern. Alveolarepithelzellen Typ II reagierten mit einer Erhöhung des Glutathiongehaltes. Trotz mehrerer in-vitro und in-vivo Untersuchungen wurde von einer humanen Applikation bei Bipyridin-Vergiftung bisher abgesehen [17]. NAC ist bereits als Arzneimittel zugelassen.

Durch PQ vergiftete Ratten bekamen α -Tocopherol (Vitamin E). Liposomal formuliert konnte es die Progression der LPO im Lungengewebe verhindern. Besonders in den Lungen war die

Glutathionmenge (gemessen mit dem Tietze-Assay) größer als im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe [53].

1.9 Fragestellungen der Arbeit

DQ und PQ sind strukturverwandte Bipyridin-Verbindungen, die nicht nur die Photosynthese von Pflanzen stören, sondern auch in tierischen Organismen und beim Menschen bis in die jüngste Gegenwart zu einer Reihe von tödlichen Vergiftungen geführt haben. Ein Antidot ist nicht bekannt. Trotz der Gemeinsamkeiten der beiden Stoffe gilt DQ als Lebergift und PQ als Lungengift [17]. Für die toxikologische Forschung ist von Interesse, ob diese Organotropie für Untersuchungen ein wichtiges Merkmal darstellt oder ob bei der Untersuchung der beiden Stoffe mithilfe von Zellkulturen mit DQ in Lungenzellen ähnliche Befunde wie mit PQ in Leberzellen erhalten werden. Dabei sollte sowohl die akute und subakute Zytotoxizität der beiden Giftstoffe als auch das Verhalten der beiden Substanzen gegenüber Antioxidantien geprüft werden, die der Entstehung und Wirkung von ROS entgegenstehen.

2 Material und Methoden

2.1 Verwendete Chemikalien und Gase

- 5,5'-Dithobis-(2-nitrobenzoat) (DTNB); Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim
- Carbogen® (95% O₂ / 5% CO₂); Fa. Linde, Pullach
- Cell Proliferation Kit II (XTT); Fa. Roche, Mannheim
- Dimethylsulfoxid; Fa. Merck, Darmstadt
- Diquat-dibromid; Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim
- Glutathionreduktase aus Bäckerhefe; Fa. Sigma-Aldrich, Taufkirchen
- N-Acetylcystein; Fa. Fluka Chemika, Buchs, CH
- NADPH; Fa. Roche, Mannheim
- Natriumbromid; Fa. Fluka Chemika, Buchs, CH
- Oxidiertes Glutathion (GSSG); Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim
- Paraquat-dichlorid; Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim
- Perchlorsäure (70-72%); Fa. Merck, Darmstadt
- Triethanolamin; Fa. Merck, Darmstadt
- Triton X-100; Fa. Roth, Karlsruhe

2.2 Verwendete Nährmedien und Pufferlösungen

- Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM); Fa. Invitrogen, Karlsruhe; versetzt mit 2, 5 oder 10% fötalem Kälberserum, 2mM Glutamin, 100U/mL Penicillin und 100µg/mL Streptomycin
- Hanks's Balanced Salt Solution (HBSS); Fa. Invitrogen, Karlsruhe
- K₂HPO₄; Fa. Merck, Darmstadt
- KH₂PO₄; Fa. Merck, Darmstadt
- Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) pH 7,4; Fa. Invitrogen, Karlsruhe
- Trypanblau-Lösung: 0,18% Trypanblau in PBS; Fa. Serva, Heidelberg
- Trypsin/EDTA-Lösung: Trypsin (50µg/mL) und EDTA (5mmol/L) in PBS; steril gefiltert (Filter 0.2µm), Fa. Sartorius, Göttingen

2.3 Verwendete Geräte und Verbrauchsmaterialien

- 96 Wellplatten; Fa. Nalge-Nunc, Roskilde, DK
- 96 Wellplattenlesegerät Victor³ 1420; Fa. Perkin Elmer Wallac, Turku, FI
- CO₂-Brutschrank für die Expositionskammer Typ B 5060 EC-CO₂; Fa. Heraeus, Hanau
- CO₂-Brutschrank; Heracell 240; Fa. Heraeus, Hanau
- Expositionsapparatur
- Lichtmikroskop Axiovert 135M; Fa. Zeiss, Göttingen
- Mikroreaktionsgefäße (1,5 und 2mL); Fa. Sarstedt, Nümbrecht
- Neubauer-Zählkammer; Fa. Brand, Wertheim
- Ozongenerator und Ozonanalysator Ozomat Com; Fa. Anseros, Tübingen
- Pipettenspitzen (10, 100 und 1000µL); Fa. Sarstedt, Nümbrecht
- Polypropylen-Zentrifugenröhrchen (15 und 50mL); Fa. Nalge-Nunc, Roskilde, DK
- Sterilbank LB-72-C Lamin Air; Fa. Heraeus, Hanau
- UV/VIS Spektrometer Biochrom 4060; Pharmacia LKB, Beaconsfield, UK
- Zellkulturflaschen (50 und 250mL); Fa. Nalge-Nunc, Roskilde, DK
- Zellkulturröhrchen (10mL); Fa. Nalge-Nunc, Roskilde, DK
- Zentrifuge Rotanta RP; Fa. Hettich, Tuttlingen

2.4 Zellkultur

2.4.1 Verwendete Zellen

Bei der A549 Zelllinie handelt es sich um alveoläre Adenokarzinomzellen einer menschlichen Lunge. Sie zeigt unter Standardkulturbedingungen typische Merkmale einer Alveolarepithelzelle Typ II und wird gern als In-vitro-Modell für die alveoläre Seite der Lunge herangezogen. Die A549 Zellen wurden von der American Type Culture Collection (ATCC) (Rockville, MD, USA) bezogen.

HepG2 Zellen sind humane hepatozelluläre Karzinomzellen. Sie agieren wie Hepatozyten und sezernieren verschiedene Plasmaproteine wie zum Beispiel Albumin, Plasminogen, Transferrin und mehr. Bipyridine gelten als hepatotoxisch, so dass die Wahl auf diese Zelllinie fiel. Bezugsquelle der HepG2 Zellen war die ATCC (Rockville, MD, USA).

Die L929 Zellen stammen aus dem Bindegewebe einer Maus und stellen anerkannte Indikatorzellen dar, die in zahlreichen Zulassungsstudien und toxikologischen Untersuchungen verwendet werden. Die L929 Zellen wurden ebenfalls von der ATCC bezogen (Rockville, MD, USA).

2.4.2 Zellpassage

Alle drei Zelllinien wurden in der Kultivierung gleich behandelt. Vor jeder Passage wurden die Zellen unter dem Lichtmikroskop kontrolliert. Das Nährmedium wurde abgesaugt. Die Zellen wurden mit 5mL HBSS gewaschen und nach Absaugen der Salzlösung mit 1,5mL Trypsin/EDTA inkubiert, bis sich die Zellen von der Unterlage ablösten. Zu dieser Zellsuspension wurde 2mL Nährmedium zur Inhibierung der Trypsinaktivität gegeben und die Suspension in ein Zellkulturröhrchen überführt. Dieses wurde 3min bei 250 x g zentrifugiert und der Überstand danach abgesaugt. Das vorhandene Pellet wurde in frischem DMEM resuspendiert und diese Zellsuspension wurde im Verhältnis 1:5 in neue Kulturflaschen überführt.

2.5 Vergleichende Expositionsversuche mit Bipyridinen

2.5.1 Exposition unter Standardbedingungen

Die Standardexposition von DQ und PQ war bei allen drei Zelllinien gleich. Nachdem der Zellrasen eine Konfluenz von ca. 85% erreicht hatte, wurden die Zellen wie unter 2.4.2 beschrieben gewaschen und abgelöst. Nach dem Zentrifugieren wurde das Pellet in 10mL DMEM resuspendiert. In jedes Well einer Mikrotiterplatte (mit Ausnahme der Reihe A) wurden 100µL dieser Zellsuspension pipettiert. Die Mikrotiterplatte wurde anschließend für 24h im Brutschrank bei 37°C inkubiert.

Für das Erstellen der Verdünnungsreihen wurde eine Stammlösung von jeweils 10mM DQ und PQ angesetzt. Beide Bipyridine wurden in DMEM gelöst. Aus dieser Stammlösung wurde eine Verdünnungsreihe mit Konzentrationen von 0,01mM bis 3mM erstellt. In jedes Well wurden 100µL gegeben. Die Positivkontrolle war DMEM ohne Herbizid, die Negativkontrolle war eine Triton-X-100 Lösung (siehe Abbildung 2.1). Die Platte wurde entsprechend der Expositionszeit (24h, 48h und 72h) im Brutschrank bei 37°C inkubiert.

Nach entsprechender Expositionszeit wurde die akute und subakute Zytotoxizität mithilfe des XTT-Tests ermittelt.

2.5.2 Einfluss des Sauerstoffpartialdrucks auf die Bipyridin-Toxizität

Um den Einfluss des Sauerstoffpartialdrucks auf die Bipyridin-Toxizität zu untersuchen, wurde das Gasgemisch Carbogen® (95% O₂ und 5% CO₂) verwendet. Es wurden konfluent bewachsene Kulturflaschen vorbereitet. Zu jeder Kultur wurde 5mL DQ- oder PQ-Lösung gegeben. Anschließend wurden die Flaschen auf die Expositionsapparatur montiert (siehe Abbildung 2.2). In der Kammer waren auf drei Reihen verteilt jeweils vier Flaschen hintereinander geschaltet. Die Begasung mit Carbogen® erfolgte 16h lang. Während der gesamten Expositionszeit wurden die Flaschen mithilfe einer Schaukelvorrichtung bewegt, um einen intensiveren Gas/Zell-Kontakt zu gewährleisten. Die Brutschrankkontrolle erhielt allein frisches DMEM und wurde während der gesamten Expositionsdauer im Brutschrank gelagert. Die Expositionskontrolle wurde ausschließlich mit Carbogen® exponiert.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	zellfrei Testsubstanz I (PQ)						zellfrei Testsubstanz II (DQ)					
B	Positivkontrolle						Negativkontrolle					
C	0,01 mM						0,01 mM					
D	0,03 mM						0,03 mM					
E	0,1 mM			Testsubstanz I			0,1 mM			Testsubstanz II		
F	0,3 mM			(PQ)			0,3 mM			(DQ)		
G	1 mM						1 mM					
H	3 mM						3 mM					

Abb. 2.1: Schematische Darstellung einer Mikrotiterplatte der Expositionsversuche unter Standardbedingungen.

Nach 16h wurde bei jeder Kultur der Zellüberstand verworfen. Die verbliebenen Zellen wurden mit Trypsin/EDTA abgelöst. Nach Zentrifugation wurde der Überstand abgesaugt und das Pellet in 2mL HBSS resuspendiert. Von jeder Probe wurden 600µL entnommen. Je

100 μ L wurden für den Trypanblau-Test verwendet und weitere 100 μ L auf eine Mikrotiterplatte gegeben (siehe Abbildung 2.1). Das XTT-Reagenz wurde hinzu pipettiert und die Platte für 3h im Brutschrank inkubiert. Die restlichen Zellen wurden erneut bei 250 x g für 3min zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurde das Pellet mit 2mL eiskalter Perchlorsäure zur späteren Quantifizierung des Glutathiongehalts extrahiert.

2.6 Erholungsversuche

Für die sogenannten Erholungsversuche wurde eine Mikrotiterplatte nach dem Schema in Abbildung 2.1 beladen. Das Erstellen der Verdünnungsreihe erfolgte wie in 2.5.1 beschrieben. Nach einer Exposition von 24h wurden die mit den Testsubstanzen exponierten Wells abgesaugt. Jedes abgesaugte Well erhielt 100 μ L frisches Nährmedium. Es folgte eine Nachinkubation von weiteren 24h. Mit dem XTT-Test wurde die Proliferationsfähigkeit der Zellen untersucht.

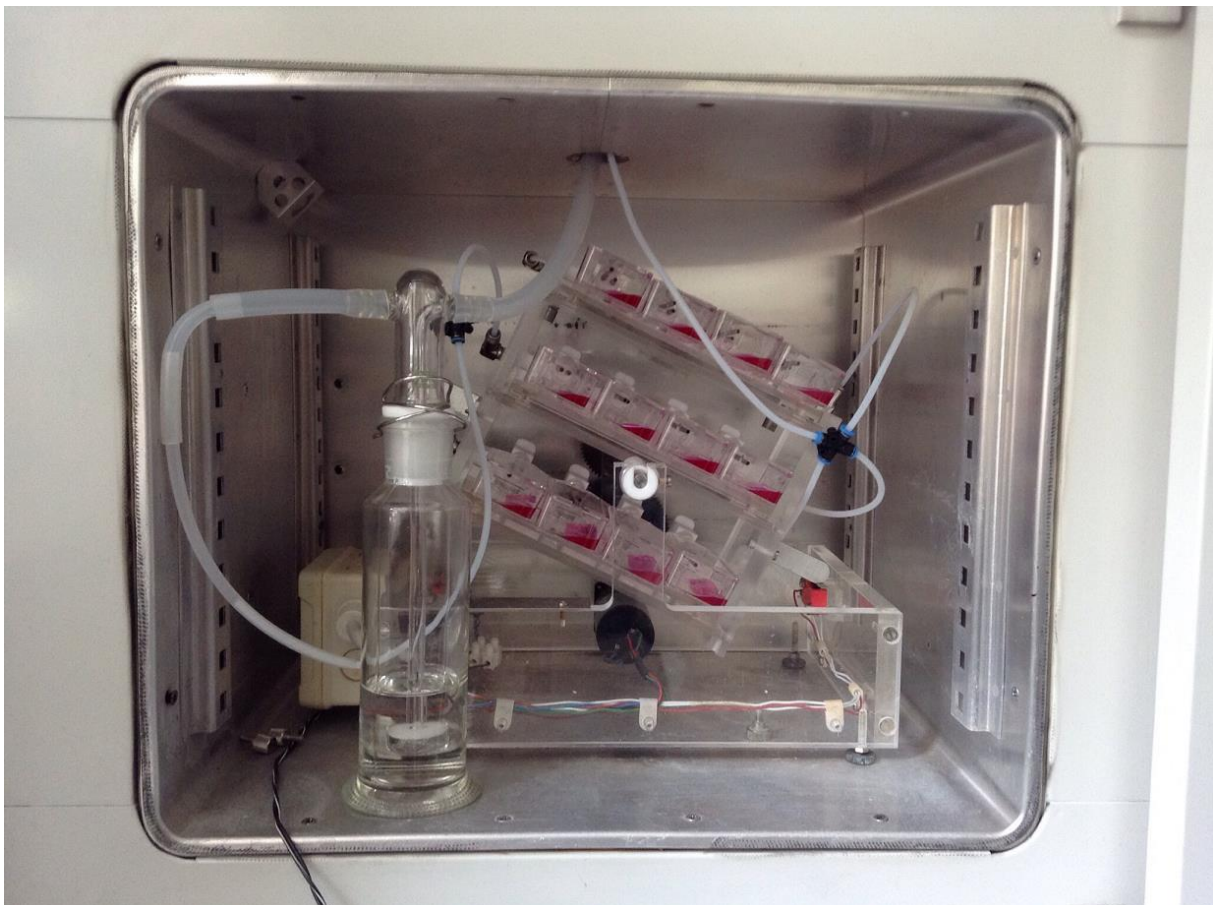


Abb. 2.2: Die Apparatur der Expositionsversuche von Bipyridin *plus* Carbogen®. Das Gasmisch wurde auf drei Reihen verteilt. Pro Reihe waren vier Kulturflaschen in Serie geschaltet. Die Anordnung der Flaschen erfolgte nach dem Zufallsprinzip.

2.7 Versuche mit Antioxidantien

Versuche zur Wirkung von Antioxidantien wurden an L929 Zellen durchgeführt. Eine mit Zellen inkubierte Mikrotiterplatte wurde nach dem Schema in Abbildung 2.3 beschickt. Die Platte wurde in vier Teile gegliedert. Im ersten Teil wurden die Zellen mit 100 μ L Bipyridin entsprechend der Verdünnungsreihe (siehe 2.5.1) für 16h beladen. Nach Entfernung des Bipyridins erfolgte die Gabe von 100 μ L NAC (in DMEM gelöst) für weitere 24h. Es wurden Konzentrationen von 10mM und 30mM NAC untersucht. Ein anderer Teil der Zellen bekam NAC zum Startzeitpunkt der Vergiftung (Bipyridin und NAC). Die Exposition erfolgte über 24h. In demselben Versuch wurde überprüft, ob NAC zytotoxisch wirkt. Hierfür wurden die Zellen mit dem Antioxidans für 24h bei 37°C exponiert. Für den Erhalt einer Referenz wurden die Zellen über 24h mit der jeweiligen Testsubstanz vergiftet. Der XTT-Test überprüfte die Proliferationsfähigkeit der Zellen.

Der beschriebene Versuch wurde unter gleichen Bedingungen mit 0,5% DMSO und der Kombination beider Antioxidantien durchgeführt.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	zellfrei Testsubstanz, z.B. DQ											
B	Positivkontrolle						Negativkontrolle					
C	NAC nach BE		NAC		NAC		NAC und DQ		0,01mM DQ			
D	NAC nach BE		NAC		NAC		NAC und DQ		0,03mM DQ			
E	NAC nach BE		NAC		NAC		NAC und DQ		0,1mM DQ			
F	NAC nach BE		NAC		NAC		NAC und DQ		0,3mM DQ			
G	NAC nach BE		NAC		NAC		NAC und DQ		1mM DQ			
H	NAC nach BE		NAC		NAC		NAC und DQ		3mM DQ			

Abb. 2.3: Schematische Darstellung einer Mikrotiterplatte der Versuche mit Antioxidantien am Beispiel DQ und NAC. Die Zellen der ersten Spalte bekamen das Antioxidans nach Bipyridin-Entfernung (BE). An zweiter Stelle wurde das Antioxidans untersucht. In der dritten Spalte bekamen die Zellen zum Startzeitpunkt der Bipyridin-Exposition das Antioxidans. Die Zellen der letzten Spalte erhielten das Bipyridin als Referenz.

2.8 Biochemische Tests

2.8.1 Glutathion-Bestimmung

Das zelluläre Glutathion wurde nach einer modifizierten Methode nach Tietze gemessen [54]. Das Gesamtglutathion (GSX) liegt intrazellulär in reduzierter Form (GSH) und oxidiertes Form (GSSG) vor. Die zentrale Komponente beim Tietze-Test ist DTNB. Dieses Molekül besteht aus zwei über eine Disulfidbrücke verbundene 2-Nitro-5-thiobenzoat (TNB) Resten. Das TNB-Anion hat ein Absorptionsmaximum bei 412nm. Beim Tietze-Test reagiert das GSH mit DTNB zu GSTNB. TNB wird dabei abgespalten. Mithilfe der Glutathionreduktase (GR) kann GSTNB unter Abspaltung von TNB wieder zu GSH zurückreagieren. Als Kofaktor wird $\text{NADPH}+\text{H}^+$ benötigt. Das regenerierte GSH steht dem Reaktionszyklus wieder zur Verfügung. Bei diesem Reaktionszyklus gilt: Je mehr GSH in der Probe vorhanden ist, desto schneller wird DTNB verbraucht. Diese Umsetzungsgeschwindigkeit lässt Rückschlüsse auf die vorhandene GSH Konzentration zu. Das in der Probe vorhandene oxidierte Glutathion reagiert ebenfalls mit der GR und $\text{NADPH}+\text{H}^+$ zu zwei Molekülen GSH. Zur Berechnung des DTNB Umsatzes wurde der in der Literatur gefundene molare dekadische Extinktionskoeffizient (13600L/mol) benutzt [55].

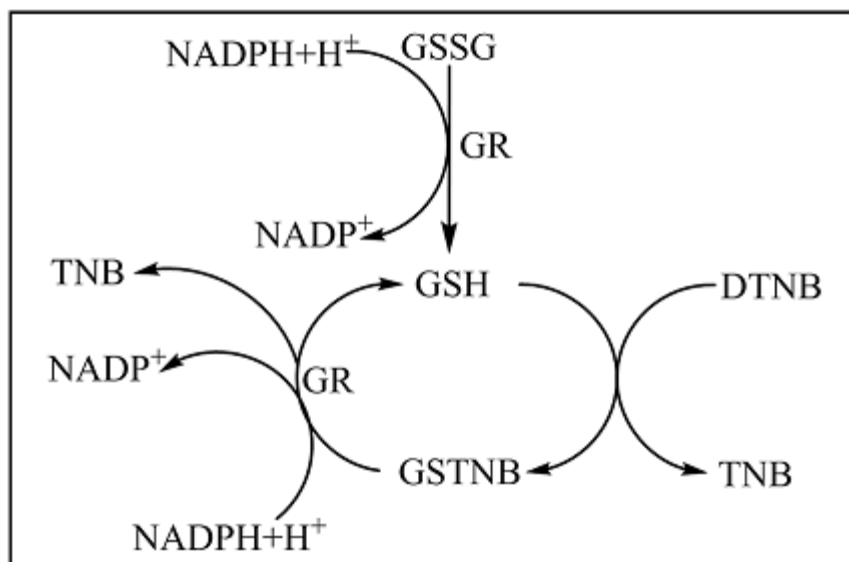
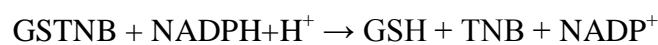
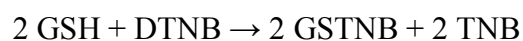
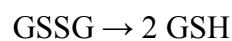


Abb. 2.4: Reaktionszyklus des Tietze-Tests.

Mithilfe einer Eichkurve, in der definierte Konzentrationen von GSSG (siehe Tabelle 2.1) vorgelegt wurden, ließ sich die aktuelle GSX Konzentration berechnen. Vor jeder Messreihe wurde diese Eichkurve erstellt.

Konzentration	GSSG (250 μ M)	Perchlorsäure (0,33M)
100 μ M	400 μ L	600 μ L
80 μ M	320 μ L	680 μ L
60 μ M	240 μ L	760 μ L
40 μ M	160 μ L	840 μ L
20 μ M	80 μ L	920 μ L
0 μ M	0 μ L	1000 μ L

Tab. 2.1: Verdünnungsreihe zur Erstellung der Eichkurve für die GSX-Bestimmung.

Für die Glutathionmessung wurde ein Kaliumphosphatpuffer benötigt. Der Puffer wurde auf pH 7,0 eingestellt. Darin waren enthalten:

6,81g KH_2PO_4 und 0,186g $\text{Na}_2\text{EDTA}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ad 500mL aqua bidest

11,41g $\text{K}_2\text{HPO}_4\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ und 0,186g $\text{Na}_2\text{EDTA}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ad 500mL aqua bidest

Die Zellen wurden mit 2mL eiskalter Perchlorsäure (0,33M) aufgeschlossen. Nach der Zentrifugation (3min bei 250 x g) wurde ein 200 μ L Aliquot entnommen. Um das perchlor-saure Milieu zu neutralisieren, wurde dem Aliquot 20 μ L einer 1:1 Mischung von Triethanolamin- und Kaliumphosphatpuffer zugegeben.

In die Messküvette wurde pipettiert:

DTNB (3g/mL)	20 μ L
NADPH+H ⁺ (4,1g/mL)	50 μ L
Kaliumphosphatpuffer	800 μ L
Probe	100 μ L

Die Reaktion wurde durch Zugabe von 30 μ L GR (20U/mL) gestartet. Die Extinktion bei 412nm wurde in Zeitintervallen von 30s bis 3min mithilfe des UV/VIS Spektrometers gemessen.

2.8.2 Trypanblau-Test

Der Trypanblau-Test ist ein einfacher und schnell durchführbarer Farbstoff-Test, der der Unterscheidung zwischen lebenden und toten Zellen dient. Der Farbstoff ist nicht membran-gängig. Es werden nur tote bzw. geschädigte Zellen angefärbt, deren Membranintegrität gestört ist. Trypanblau selbst ist zytotoxisch, so dass die Vitalitätsbestimmung innerhalb von 3min nach der Zugabe erfolgen sollte. Zu 100 μ L Zellsuspension wurden 20 μ L Trypanblau gegeben. Nach kurzem Durchmischen wurden von dieser Suspension 20 μ L in die Neubauer-Zählkammer pipettiert und die Zellen vor Ablauf von 3min unter dem Lichtmikroskop gezählt. Es wurden jeweils die Mittelwerte der gefärbten und nicht gefärbten Zellen von zwei Quadranten ermittelt.

2.8.3 XTT-Test

Der XTT-Assay diente der Bestimmung des Zellmetabolismus. Das Prinzip beruht auf der Umwandlung des gelben Tetrazoliumsalses in das orangefarbene Formazan. Die Reaktion ist in Abbildung 2.5 dargestellt. Essentieller Kofaktor der Reaktion ist NAD(P)H+H⁺. Nur metabolisch aktive Zellen sind in der Lage, diesen Reaktionsschritt in kurzer Zeit durchzuführen. Zur Herstellung der Lösung wurden 6mL HBSS, 5mL XTT-Reagenz und 80 μ L Elektronenkoppelungsreagenz in einem Zentrifugenröhrchen vermischt. Pro Aliquot wurden 100 μ L dieser Lösung zugesetzt. Anschließend wurden die Zellen 3h im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Die photometrische Messung erfolgte als Doppelmessung mit dem Mikrotiterplattenlesegerät Victor³. Die erste Messung wurde bei 450nm und die zweite Messung (zur Korrektur des Tyndall-Effekts) bei 690nm durchgeführt.

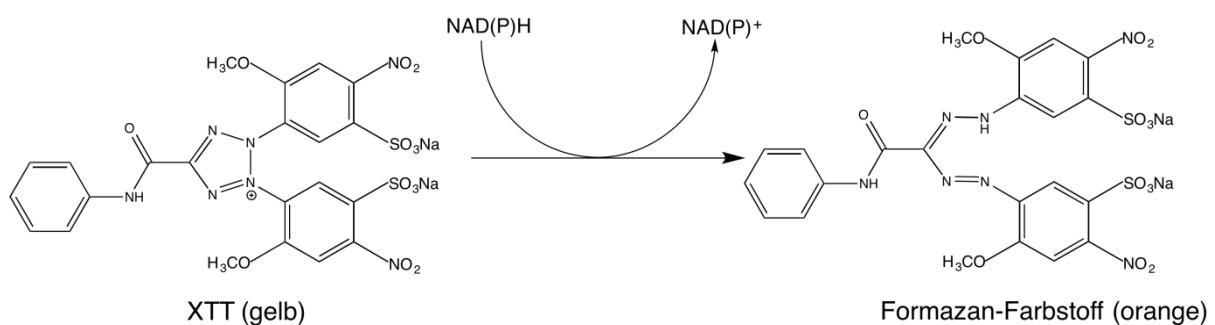


Abb. 2.5: Darstellung der dem XTT-Test zugrunde liegende Farbreaktion.

2.9 Verwendete Software und Statistik

2.9.1 Kurvenanpassung

Für das Erstellen von Konzentrations-Wirkungskurven und das Berechnen der mittleren effektiven Konzentration (EC_{50}) wurde das Programm pro Fit 6.2.14 (Fa. QuantumSoft, Uetikon am See, CH) verwendet. Initial wurde die Kurve mit dem Monte-Carlo-Algorithmus angepasst. Zur Optimierung wurde mit dem besten Parametersatz der Monte-Carlo-Anpassung der Levenberg-Marquardt-Algorithmus benutzt.

2.9.2 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm Prism 6.05 (Fa. GraphPad, La Jolla, USA). Die Daten sind, sofern nicht anders angegeben, als Mittelwert (MW) \pm Standardabweichung (SD) dargestellt. Als Signifikanzgrenze wurde $p \leq 0,05$ gesetzt. Zur Unterscheidung zweier Mittelwerte wurde der zweiseitige t-Test durchgeführt. Beim Vergleich mehrerer Gruppen wurde eine Varianzanalyse, gefolgt von einem post-hoc Test zum Vergleich aller Gruppen durchgeführt. Die Signifikanzgrenzen wurden nach folgendem Schema gegliedert:

* $\triangleq 0,05 \geq p > 0,01$

** $\triangleq 0,01 \geq p > 0,001$

*** $\triangleq 0,001 \geq p$

3 Ergebnisse

3.1 Vorversuche

3.1.1 Exposition mit Natriumbromid

PQ ist als Dichlorid im Handel. Im Unterschied dazu besitzt kommerziell verfügbares DQ zwei Bromid-Ionen. In Vorversuchen wurde deshalb mit Natriumbromid (NaBr) überprüft, ob Bromid-Ionen die Giftigkeit von DQ beeinflussen. Dazu diente wasserfreies NaBr als Vergleichssubstanz. Die zugehörigen EC_{50} Werte für die Formazanbildung aus XTT sind in Abbildung 3.1 dargestellt und in Tabelle 3.1 aufgelistet.

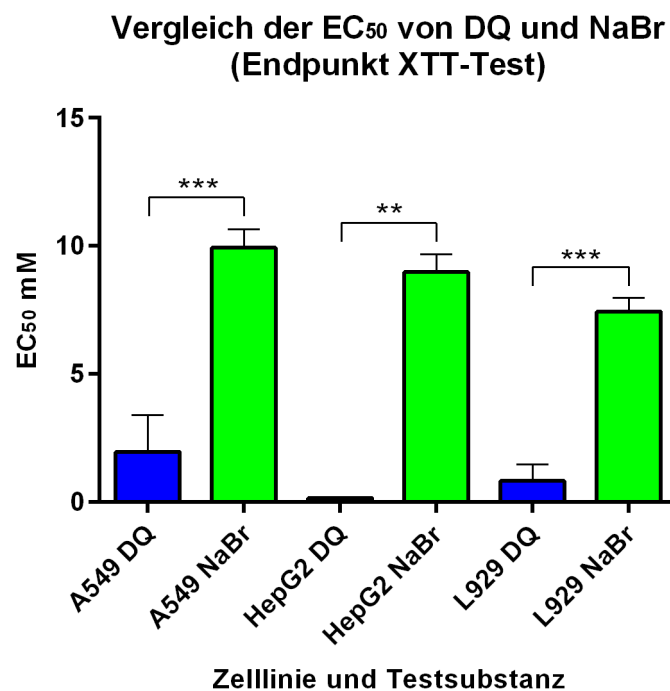


Abb. 3.1: Vergleich der EC_{50} von DQ und NaBr (Endpunkt XTT-Test). Die Expositionszeit betrug 24h. Balkenhöhe und Fehlerbalken repräsentieren jeweils MW + SD von mindestens drei unabhängigen Versuchen. Signifikante Unterschiede zwischen den Versuchspaaren wurden mit dem zweiseitigen t-Test ermittelt.

	Testsubstanz	A549	HepG2	L929
EC_{50} 24h	DQ	1,9mM ± 1,4	0,1mM ± 0,02	0,8mM ± 0,6
EC_{50} 24h	NaBr	9,9mM ± 0,7	8,9mM ± 0,6	7,4mM ± 0,5

Tab. 3.1: Die EC_{50} von DQ und NaBr (Endpunkt XTT-Test). Die Expositionszeit betrug 24h. Aufgelistet sind die MW ± SD von mindestens drei unabhängigen Versuchen.

Anhand der ermittelten EC_{50} Werte war DQ in A549 Zellen mindestens fünffach toxischer als NaBr. In HepG2 Zellen unterschieden sich die mittleren effektiven Konzentrationen um den Faktor 89. NaBr war auch in L929 Zellen die signifikant geringer toxische Substanz. Es war eine neunfach höhere Konzentration von NaBr nötig, um den halbmaximalen Effekt einzustellen.

Auf der Basis dieser Ergebnisse wurde entschieden, dass die Bromid-Ionen bei der Toxizität von DQ eine untergeordnete Rolle spielen.

3.1.2 Auswirkungen von Bromid-Ionen auf die Toxizität von Paraquat

Um ein homogenes Testprofil für den direkten Vergleich von DQ und PQ zu gewährleisten, musste untersucht werden, ob die Anwesenheit von Bromid-Ionen die Wirkung von PQ beeinflusst. In einer Mikrotiterplatte kultivierte L929 Zellen wurden mit PQ und PQ *plus* NaBr beschickt und über 24h bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Als Test für die Zytotoxizität wurde der XTT-Test verwendet. Nach Messung der Formazanbildung wurden die EC_{50} Werte ermittelt. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Giftigkeit der beiden Testsubstanzen (siehe Abbildung 3.2 und Tabelle 3.2).

	Testsubstanz	L929
EC_{50} 24h	NaBr	7,4mM \pm 0,5
EC_{50} 24h	PQ + NaBr	4,1mM \pm 0,4
EC_{50} 24h	PQ	2,5mM \pm 1,2

Tab. 3.2: Die EC_{50} von NaBr, PQ *plus* NaBr und PQ in L929 Zellen (Endpunkt XTT-Test). Die Expositionszeit betrug 24h. Aufgelistet sind die MW \pm SD von mindestens drei unabhängigen Versuchen.

Aus diesen beiden Vorversuchen ergab sich die Annahme, dass das Bromid-Ion keine Auswirkung auf die Toxizität hat. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde für die weiteren Versuche DQ unverändert verwendet.

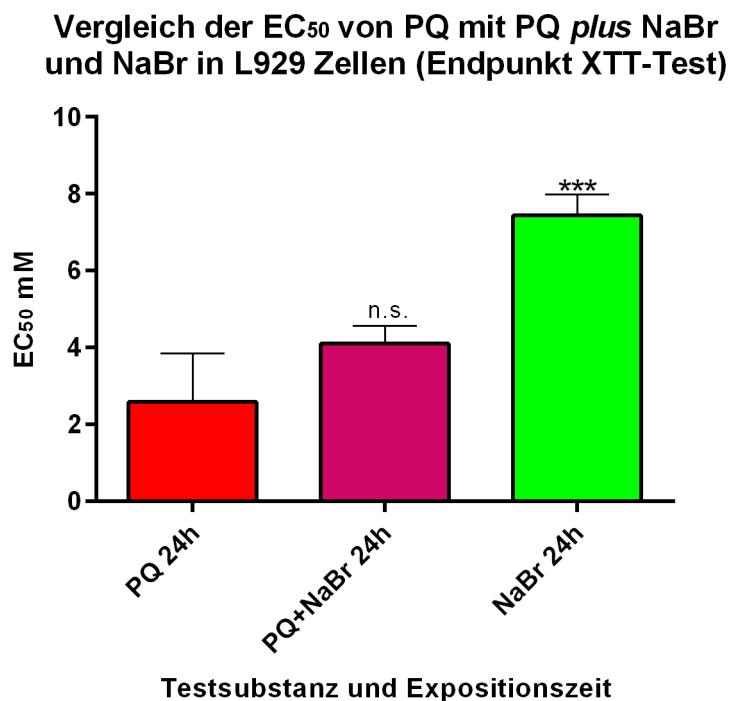


Abb. 3.2: Vergleich der EC₅₀ von PQ mit PQ *plus* NaBr und NaBr in L929 Zellen (Endpunkt XTT-Test). Die Expositionszeit betrug 24h. Balkenhöhe und Fehlerbalken repräsentieren jeweils MW + SD von mindestens drei unabhängigen Versuchen. Signifikante Unterschiede wurden mit dem post-hoc Test nach Dunnett ermittelt.

3.2 Vergleichende Expositionsversuche mit Bipyridinen

3.2.1 Exposition unter Standardbedingungen

Das Hauptinteresse galt dem direkten Vergleich der akuten und subakuten Toxizität von DQ und PQ in drei Testzelllinien. Die Zellen wurden 24h, 48h und 72h mit den Bipyridinen exponiert. Die EC₅₀ Werte sind in Tabelle 3.3 aufgelistet.

	Bipyridin	24h	48h	72h
EC ₅₀ A549	DQ	1,9mM ± 1,4	1,1mM ± 0,9	0,1mM ± 0,05
EC ₅₀ A549	PQ	4,6mM ± 1,3	2,7mM ± 1,1	0,6mM ± 0,2
EC ₅₀ HepG2	DQ	0,1mM ± 0,02	0,1mM ± 0,1	0,02mM ± 0,03
EC ₅₀ HepG2	PQ	0,1mM ± 0,07	0,1mM ± 0,07	0,05mM ± 0,08
EC ₅₀ L929	DQ	0,8mM ± 0,6	0,4mM ± 0,1	0,2mM ± 0,2
EC ₅₀ L929	PQ	2,5mM ± 1,2	2,0mM ± 0,5	1,1mM ± 0,5

Tab. 3.3: Die EC₅₀ beider Bipyridine in zeitlicher Abfolge (Endpunkt XTT-Test). Die Expositionszeit betrug 24h, 48h und 72h. Aufgelistet sind die MW ± SD von mindestens drei unabhängigen Versuchen.

3.2.1.1 Zelllinien

In A549 Zellen war DQ zu jeder Expositionszeit toxischer als PQ (siehe Abbildung 3.3). Im Vergleich zu PQ reichte bei jeder Expositionszeit eine um mehr als 50% geringere DQ-Konzentration aus, um den halbmaximalen Effekt zu erzielen.

Die Giftigkeit von DQ und PQ in HepG2 Zellen unterschied sich in allen drei Expositionszeiten nicht signifikant voneinander (siehe Abbildung 3.4). Allerdings reagierten HepG2 Zellen auf beide Bipyridine am empfindlichsten.

DQ erwies sich in L929 Zellen toxischer als PQ (siehe Abbildung 3.5). Zu allen drei Expositionszeiten reichte eine um mehr als 50% geringere Konzentration von DQ aus, um die Zellen zu schädigen.

Um die unterschiedliche Toxizität darzustellen, wurden Konzentrations-Wirkungskurven erstellt. Die Wirkung von DQ auf die Zelllinien ist in Abbildung 3.6 zu sehen. Die nicht abgebildeten Konzentrations-Wirkungskurven von PQ zeigten ähnliche Verläufe.

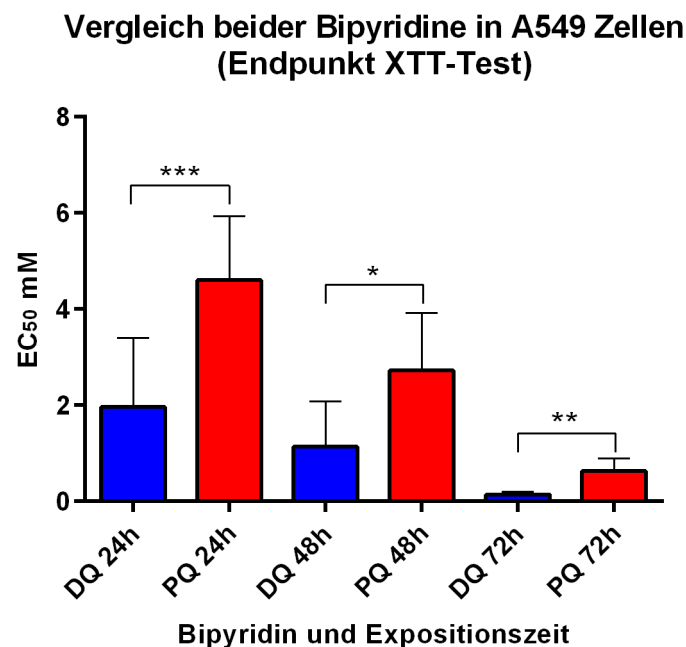


Abb. 3.3: Vergleich beider Bipyridine in A549 Zellen (Endpunkt XTT-Test). Die Expositionszeiten betragen 24h, 48h und 72h. Balkenhöhe und Fehlerbalken repräsentieren jeweils MW + SD von mindestens drei unabhängigen Versuchen. Signifikante Unterschiede zwischen den Versuchspaaren wurden mit dem zweiseitigen t-Test ermittelt.

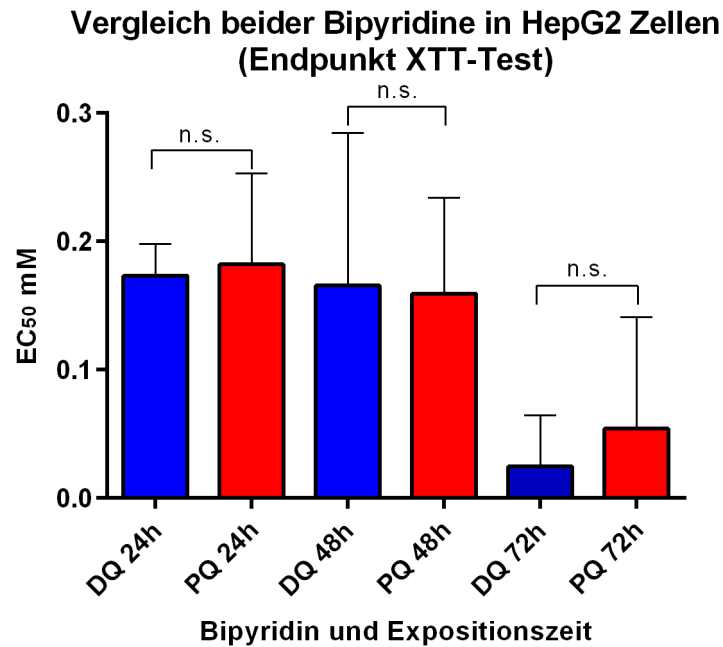


Abb. 3.4: Vergleich beider Bipyridine in HepG2 Zellen (Endpunkt XTT-Test). Die Expositionszeiten betragen 24h, 48h und 72h. Balkenhöhe und Fehlerbalken repräsentieren jeweils MW + SD von drei unabhängigen Versuchen. Signifikante Unterschiede zwischen den Versuchspaaren wurden mit dem zweiseitigen t-Test ermittelt.

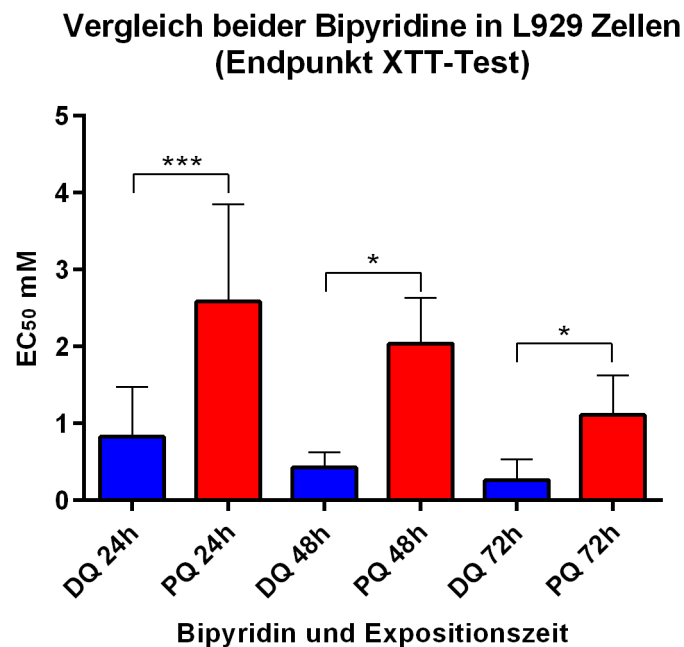


Abb. 3.5: Vergleich beider Bipyridine in L929 Zellen (Endpunkt XTT-Test). Die Expositionszeiten betragen 24h, 48h und 72h. Balkenhöhe und Fehlerbalken repräsentieren jeweils MW + SD von mindestens drei unabhängigen Versuchen. Signifikante Unterschiede zwischen den Versuchspaaren wurden mit dem zweiseitigen t-Test ermittelt.

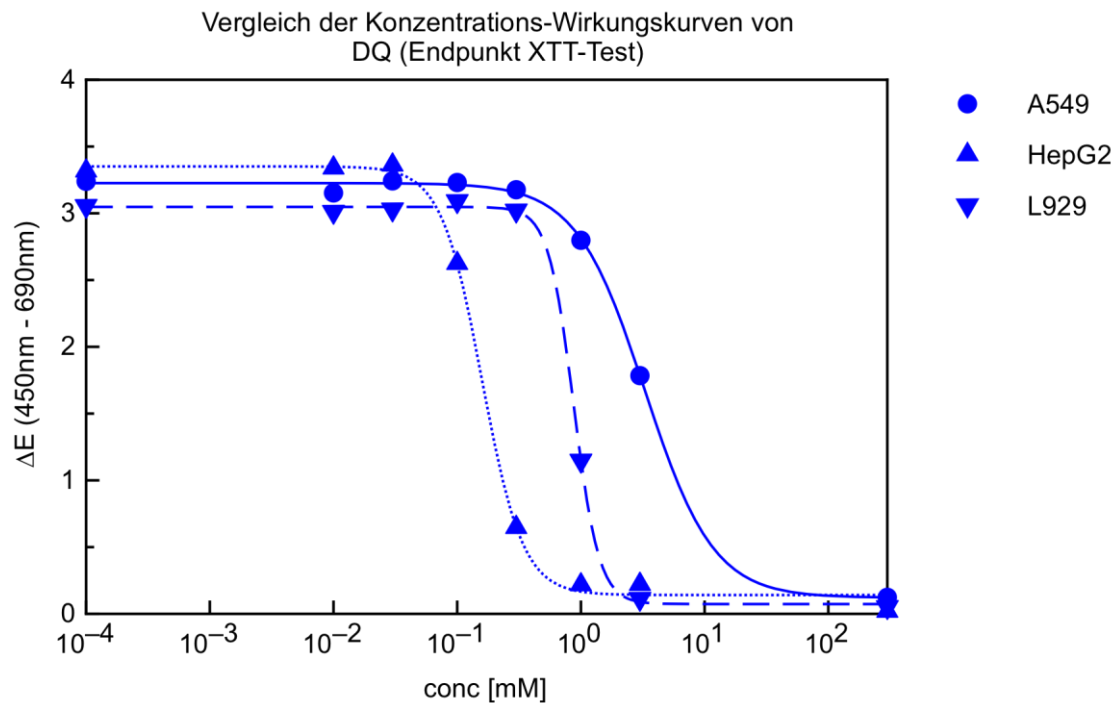


Abb. 3.6: Vergleich der Konzentrations-Wirkungskurven von DQ (Endpunkt XTT-Test). Die Expositionszeit betrug 24h. Dargestellt sind die Einzelwerte eines Versuches.

Von den Zelllinien tolerierten A549 Zellen die Exposition mit DQ bzw. PQ am besten. Weniger widerstandsfähig zeigten sich L929 Zellen. Noch anfälliger gegenüber den Herbiziden waren HepG2 Zellen.

3.2.1.2 Bipyridine

DQ war in A549- und L929 Zellen toxischer als PQ, obwohl die EC_{50} Werte alle in derselben Größenordnung lagen. Beide Testsubstanzen schädigten HepG2 Zellen nahezu identisch (siehe Abbildung 3.7 für die dazugehörigen Konzentrations-Wirkungskurven). Nach 72h Exposition war DQ leicht toxischer. Dieser Unterschied war nicht signifikant.

3.2.1.3 Zeit

Mit zunehmender Expositionsdauer nahm die Schädigung der Zellen zu. Die Abbildung 3.8 zeigt die Konzentrations-Wirkungskurven von DQ in A549 Zellen. Die nicht abgebildeten Konzentrations-Wirkungskurven von PQ zeigten ähnliche Verläufe.

Bei A549 Zellen verschoben sich die EC_{50} Werte von 24h zu 72h um eine 10er-Potenz nach links (als Ausdruck einer stärkeren Wirkung). Diese Linksverschiebung zeigte sich bei beiden Herbiziden gleichermaßen. Bipyridin-Konzentrationen ($\geq 0,1\text{mM}$ DQ und $\geq 1\text{mM}$ PQ), die bei kürzerer Wirkungszeit unbedenklich waren, waren nach 72h Exposition toxisch.

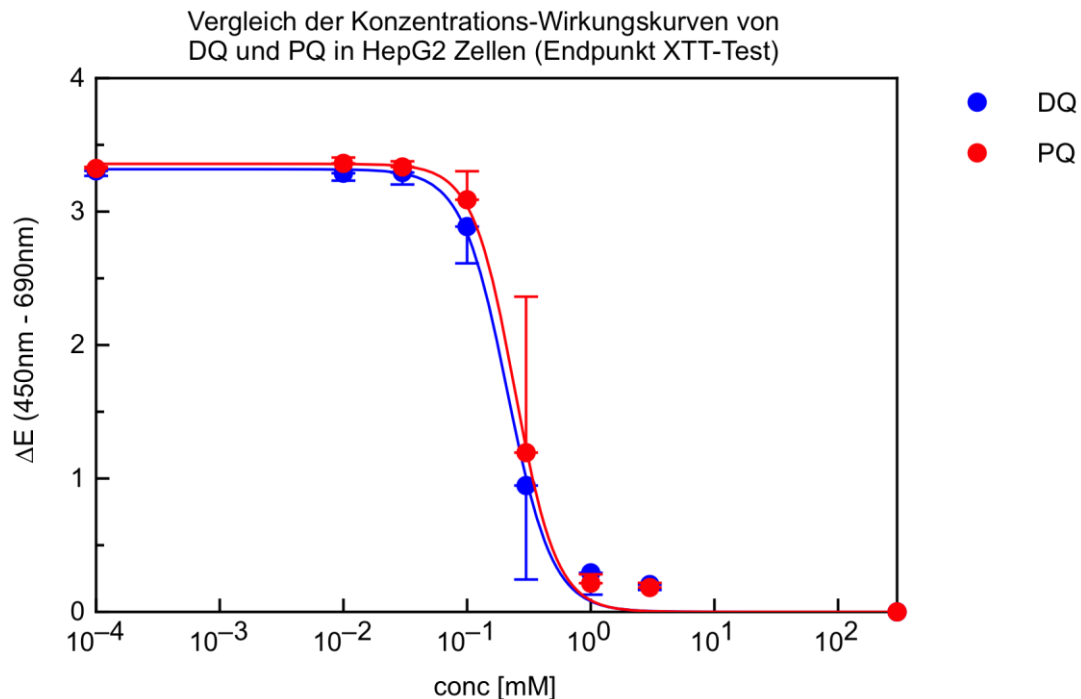


Abb. 3.7: Vergleich der Konzentrations-Wirkungskurven von DQ und PQ in HepG2 Zellen (Endpunkt XTT-Test). Die Expositionszeit betrug 24h. Punkte und Fehlerbalken repräsentieren jeweils MW + bzw. - SD von drei unabhängigen Versuchen.

In HepG2 Zellen waren die EC_{50} Werte nach 24h und 48h identisch (beide Herbizide). Erst nach 72h Exposition war jeweils eine um 50% geringere Konzentration nötig, die für die Hälfte der Zellen toxisch waren. Nach 72h waren Konzentrationen $\geq 0,1\text{mM}$ DQ und $\geq 0,3\text{mM}$ PQ für die Zellen schädlich.

Der EC_{50} Wert von DQ in L929 Zellen nach 48h verringerte sich um die Hälfte im Vergleich zur Exposition über 24h. Nach weiteren 24h halbierte sich der EC_{50} Wert erneut. Der EC_{50} Wert von PQ halbierte sich auch, allerdings über einen Zeitraum von insgesamt 48h. Vorher unbedenkliche Konzentrationen ($\geq 0,3\text{mM}$ DQ und $\geq 1\text{mM}$ PQ) schädigten die Zellen nach 72h.

A549 Zellen erwiesen sich über einen Zeitraum bis 48h am widerstandsfähigsten. Danach war diese Zelllinie in ihrer Proliferation am stärksten beeinträchtigt. Nach 72h tolerierten die L929

Zellen die Bipyridin-Exposition am besten. Die Zunahme der Giftigkeit beider Herbizide infolge der verlängerten Expositionszeit war in A549- und L929 Zellen in etwa gleich.

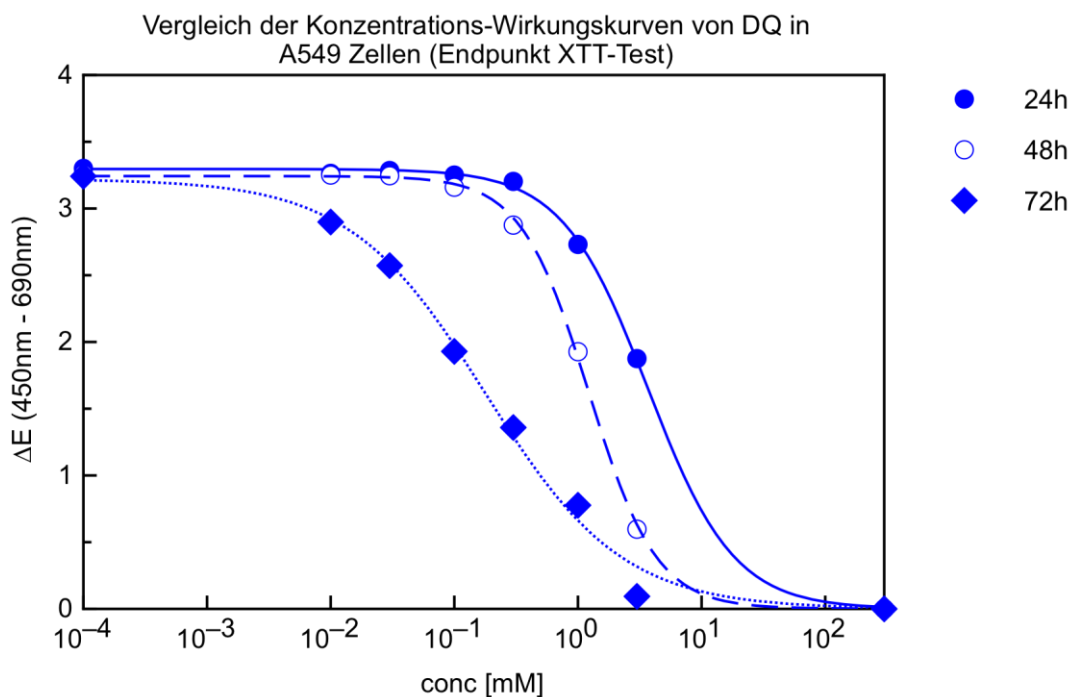


Abb. 3.8: Vergleich der Konzentrations-Wirkungskurven von DQ in A549 Zellen (Endpunkt XTT-Test). Die Expositionszeiten betragen 24h, 48h und 72h. Dargestellt sind die Einzelwerte eines Versuches.

3.2.1.4 Glutathion

Beide Herbizide (vor allem DQ) verringerten konzentrationsabhängig die Glutathionmenge der Zellen. Die aus den Glutathionmessungen ermittelten EC_{50} Werte sind in Abbildung 3.9 und Tabelle 3.4 dargestellt. Beide Herbizide unterschieden sich nicht signifikant voneinander. DQ war in allen drei Zelllinien toxischer.

	Bipyridin	A549	HepG2	L929
EC_{50} 24h	DQ	0,08mM \pm 0,07	0,2mM \pm 0,04	0,06mM \pm 0,01
EC_{50} 24h	PQ	1,4mM \pm 0,6	0,4mM \pm 0,1	0,9mM \pm 0,3

Tab. 3.4: Die EC_{50} beider Bipyridine (Endpunkt Glutathion). Die Expositionszeit betrug 24h. Aufgelistet sind die MW \pm SD von drei unabhängigen Versuchen.

A549 Zellen hatten, auf die Zellzahl bezogen, die größte Menge an Glutathion. Nach Exposition mit ≥ 1 mM DQ war das GSX um mehr als 50% erniedrigt. Erst 3mM PQ führte innerhalb von 24h zu einem Verlust an Glutathion. Allerdings unterschied sich dieser nicht signifikant von der Kontrolle.

HepG2 Zellen hatten eine geringere Menge an Glutathion. Die Zellen, die mit niedrigeren Herbizid-Konzentrationen ($\leq 0,1\text{mM}$) exponiert wurden, zeigten einen leichten Anstieg an GSX. Ab $0,3\text{mM}$ DQ bzw. 1mM PQ war die Menge des Antioxidans stark vermindert.

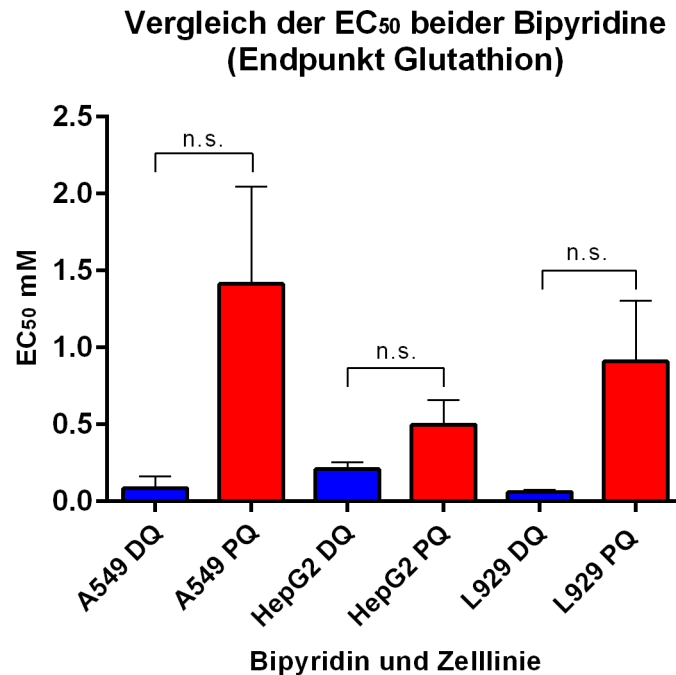


Abb. 3.9: Vergleich der EC_{50} beider Bipyridine (Endpunkt Glutathion). Die Expositionszeit betrug 24h. Balkenhöhe und Fehlerbalken repräsentieren jeweils MW + SD von drei unabhängigen Versuchen. Signifikante Unterschiede zwischen den Versuchspaaren wurden mit dem zweiseitigen t-Test ermittelt.

In L929 Zellen führten DQ-Konzentrationen ($\geq 0,1\text{mM}$) zur Reduktion von GSX um mehr als 50%. Bei den dem PQ ausgesetzten Zellen war ein Verlust an Glutathion ab 1mM zu erkennen. Dieser war ab 3mM signifikant.

Glutathion spielt für den Oxidationsschutz der Zelle eine tragende Rolle. Der Verlust ist ein indirekter Hinweis auf den durch ROS ausgelösten oxidativen Stress. Die Zellen wurden nach Zusammenbruch der Schutzmechanismen irreversibel geschädigt.

3.2.1.5 Schädigung der Zellmembran

Ein Vitalitätsverlust kann auch als Schädigung der Zellmembran in Erscheinung treten. Der Trypanblau-Test ist geeignet, dies festzustellen. Der prozentuale Anteil an Zellen mit intakter Zellmembran zur Gesamtzellzahl ist in Tabelle 3.5 aufgelistet. Anhand der Prüfung der Membranintegrität wurden für beide Herbizide die EC_{50} Werte ermittelt (Abbildung 3.10 und

Tabelle 3.6). Alle untersuchten Zelllinien zeigten eine dosisabhängige Schädigung. Beide Herbizide zeigten statistisch gesehen keinen Unterschied. Dennoch schädigte DQ die Zellen stärker.

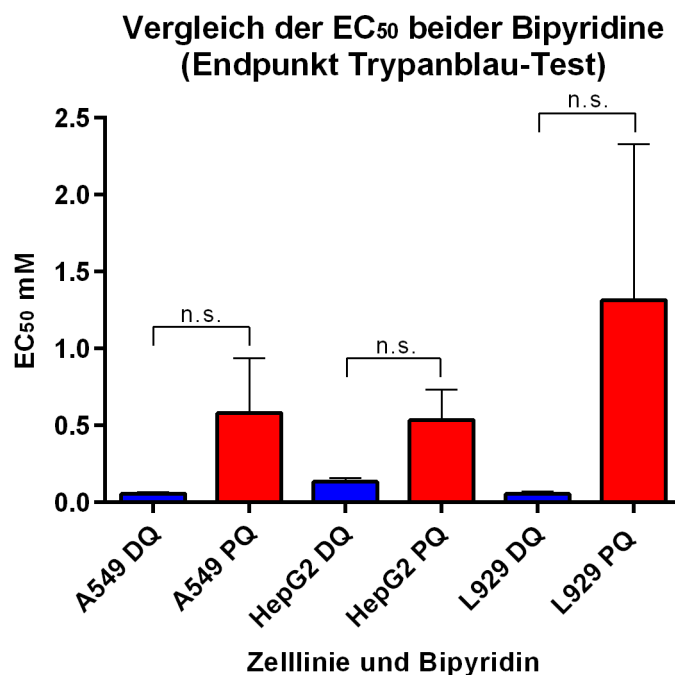


Abb. 3.10: Vergleich der EC₅₀ beider Bipyridine (Endpunkt Trypanblau-Test). Die Expositionszeit betrug 24h. Balkenhöhe und Fehlerbalken repräsentieren jeweils MW + SD von drei unabhängigen Versuchen. Signifikante Unterschiede zwischen den Versuchspaaren wurden mit dem zweiseitigen t-Test ermittelt.

	A549 DQ	A549 PQ	HepG2 DQ	HepG2 PQ	L929 DQ	L929 PQ
Kontrolle	86%	86%	87%	87%	92%	92%
0,01mM	90%	85%	88%	89%	89%	84%
0,03mM	88%	88%	91%	89%	89%	84%
0,1mM	33%	87%	81%	86%	53%	82%
0,3mM	2%	89%	6%	87%	13%	82%
1mM	1%	57%	1%	2%	2%	73%
3mM	0%	16%	0%	0%	0%	10%

Tab. 3.5: Anteil intakter Zellen zur Gesamtzellzahl nach Bipyridin-Exposition (Endpunkt Trypanblau-Test). Die Expositionszeit betrug 24h. Aufgelistet sind die MW von drei unabhängigen Versuchen.

Die Anzahl vitaler A549 Zellen nahm mit steigender Bipyridin-Konzentration ab. Eine DQ-Exposition bis einschließlich 0,03mM tolerierten die Zellen. Bei einer zehnfach höheren Konzentration waren nur noch tote Zellen vorhanden. Knapp 60% der Zellen waren bei 1mM PQ nach 24h noch vital – bei 3mM waren es 15%.

HepG2 Zellen vertrugen Konzentrationen bis einschließlich 0,1mM. Ab 0,3mM DQ und ab 1mM PQ hatten jeweils weniger als 10% der Zellen eine intakte Zellmembran.

L929 Zellen tolerierten eine Exposition mit DQ bis 0,03mM gut. Die Erhöhung der Konzentration um den Faktor 10 führte zu Zellschäden. Widerstandsfähiger waren die Zellen bei einer Exposition mit PQ. Erst eine Konzentration von 3mM führte zu einer Letalität der Zellen von 90%.

	Bipyridin	A549	HepG2	L929
EC ₅₀ 24h	DQ	0,05mM ± 0,008	0,1mM ± 0,02	0,05mM ± 0,01
EC ₅₀ 24h	PQ	0,5mM ± 0,3	0,5mM ± 0,1	1,3mM ± 1

Tab. 3.6: Die EC₅₀ beider Bipyridine (Endpunkt Trypanblau-Test). Die Expositionszeit betrug 24h. Aufgelistet sind die MW ± SD von drei unabhängigen Versuchen.

Abbildung 3.11 zeigt die Konzentrations-Wirkungskurven aller Zelllinien (am Beispiel von PQ). Die Kurven der A549- und L929 Zellen waren nahezu identisch. HepG2 Zellen erwiesen sich als empfindlicher gegenüber PQ. Die Kurven von DQ waren eine 10er Potenz nach links verschoben (alle drei Zelllinien).

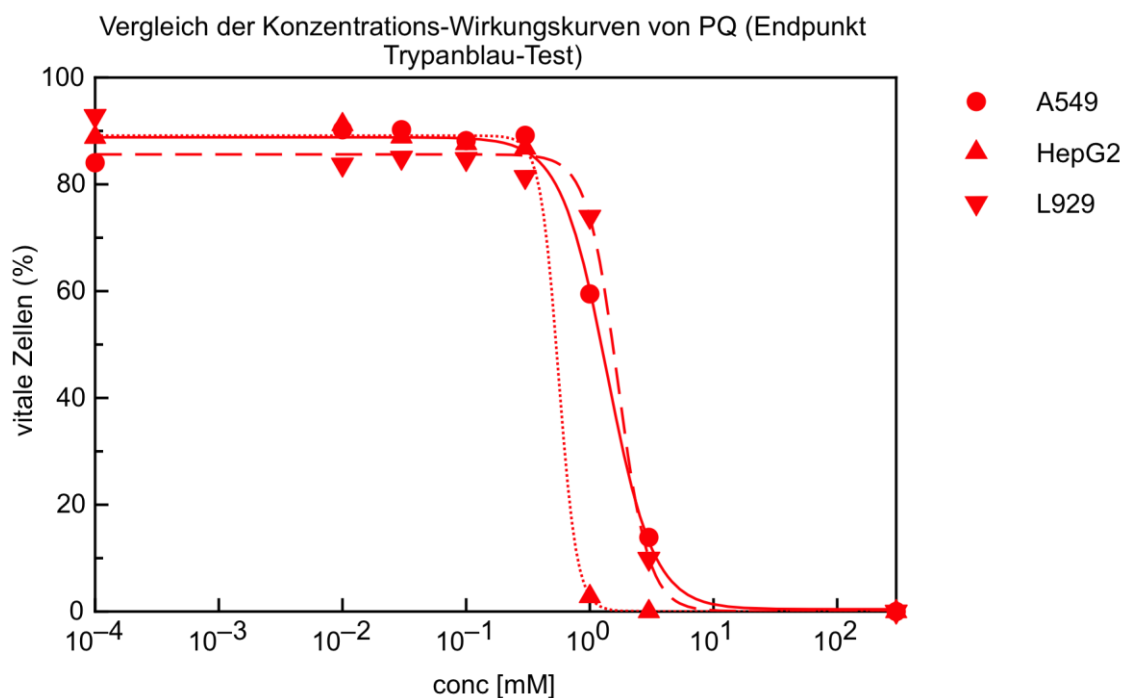


Abb. 3.11: Vergleich der Konzentrations-Wirkungskurven von PQ (Endpunkt Trypanblau-Test). Die Expositionszeit betrug 24h. Dargestellt sind die Werte eines Versuches.

3.2.2 Einfluss des Sauerstoffpartialdrucks auf die Bipyridin-Toxizität

Beide Herbizide vermögen Sauerstoff zu aktivieren [1, 2]. Um die Wirkungen einer erhöhten Sauerstoffkonzentration auf Bipyridin-exponierte Zellen zu untersuchen, wurde in dieser Arbeit Carbogen® verwendet. Die ermittelten EC_{50} Werte sind in Tabelle 3.7 aufgelistet. Den Vergleich der EC_{50} Werte zwischen normoxischen und hyperoxischen Bedingungen zeigen Abbildung 3.12 (DQ) und 3.13 (PQ). Die ausschließlich mit Carbogen® begasten Kontrollen unterschieden sich nicht von den unbehandelten Kontrollen im Brutschrank (Werte nicht gezeigt).

3.2.2.1 Zelllinien

Die A549- und L929 Zellen zeigten eine vergleichbare Reaktion auf die erhöhte Sauerstoffkonzentration. HepG2 Zellen reagierten bereits unter Normalluft sehr empfindlich auf beide Herbizide.

Die intensive Exposition von O_2 führte zu einer erhöhten Toxizität beider Bipyridine in A549 Zellen. Im Vergleich zu Normalluft-Bedingungen war der EC_{50} Wert von DQ eine 10er-Potenz niedriger, der von PQ halbiert.

In HepG2 Zellen waren die EC_{50} Werte beider Herbizide nahezu identisch mit denen unter normoxischen Bedingungen. Die Zellen erlitten aber den gleichen Schaden in einer kürzeren Zeitspanne (16h). Dieses Ergebnis spricht für eine Wirkverstärkung.

In L929 Zellen wirkten DQ und PQ bei einem Überangebot von Sauerstoff toxischer. Die EC_{50} Werte waren knapp um den Faktor 10 niedriger als unter Standardbedingungen.

3.2.2.2 Bipyridine

Die Toxizität beider Bipyridine wurde durch die Erhöhung des Sauerstoffpartialdrucks signifikant erhöht. In A549- und L929 Zellen war DQ mehr als zehnfach toxischer. In HepG2 Zellen gab es keinen Unterschied zwischen den Herbiziden.

Vergleich der EC₅₀ von DQ unter normoxischen und hyperoxischen Bedingungen (Endpunkt XTT-Test)

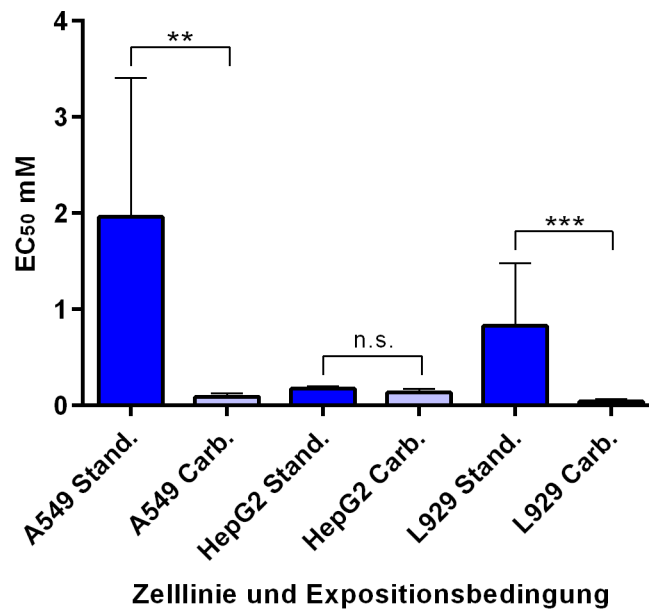


Abb. 3.12: Vergleich der EC₅₀ von DQ unter normoxischen und hyperoxischen Bedingungen (Endpunkt XTT-Test). Balkenhöhe und Fehlerbalken repräsentieren jeweils MW + SD von mindestens drei unabhängigen Versuchen. Signifikante Unterschiede zwischen den Versuchspaaren wurden mit dem zweiseitigen t-Test ermittelt.

Vergleich der EC₅₀ von PQ unter normoxischen und hyperoxischen Bedingungen (Endpunkt XTT-Test)

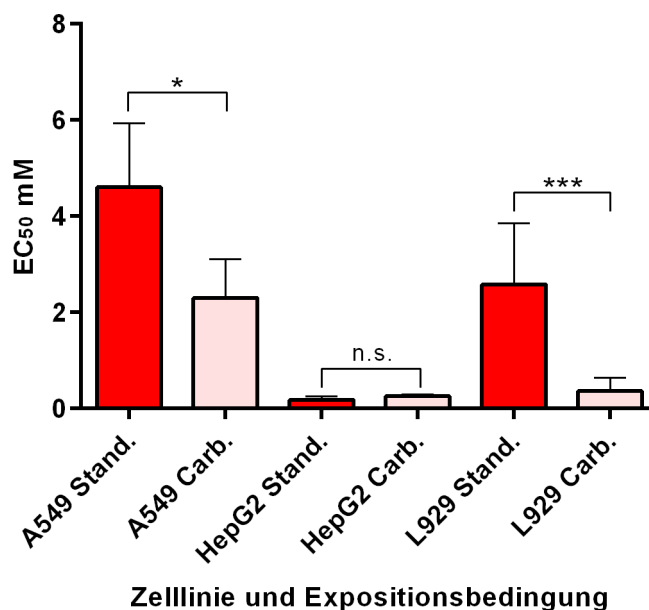


Abb. 3.13: Vergleich der EC₅₀ von PQ unter normoxischen und hyperoxischen Bedingungen (Endpunkt XTT-Test). Balkenhöhe und Fehlerbalken repräsentieren jeweils MW + SD von mindestens drei unabhängigen Versuchen. Signifikante Unterschiede zwischen den Versuchspaaren wurden mit dem zweiseitigen t-Test ermittelt.

	Testsubstanz	A549	HepG2	L929
EC ₅₀ 16h	DQ + Carbogen®	0,09mM ± 0,03	0,1mM ± 0,03	0,04mM ± 0,02
EC ₅₀ 16h	PQ + Carbogen®	2,3mM ± 0,8	0,2mM ± 0,04	0,3mM ± 0,2

Tab. 3.7: Die EC₅₀ beider Bipyridine *plus* Carbogen® (Endpunkt XTT-Test). Die Expositionszeit betrug 16h. Aufgelistet sind die MW ± SD von drei unabhängigen Versuchen.

3.2.2.3 Glutathion

Die GSX-Menge der Zellen wurde durch die Erhöhung des Sauerstoffpartialdrucks nicht beeinflusst. Die unter 3.2.1.4 beschriebenen Ergebnisse wurden auch unter hyperoxischen Bedingungen beobachtet. Die aus den Glutathionmessungen ermittelten EC₅₀ Werte sind in Tabelle 3.8 aufgelistet.

	Testsubstanz	A549	HepG2	L929
EC ₅₀ 16h	DQ + Carbogen®	0,3mM ± 0,3	0,3mM ± 0,3	0,1mM ± 0,1
EC ₅₀ 16h	PQ + Carbogen®	4,9mM ± 1,3	0,5mM ± 0,3	0,9mM ± 0,3

Tab. 3.8: Die EC₅₀ beider Bipyridine *plus* Carbogen® (Endpunkt Glutathion). Die Expositionszeit betrug 16h. Aufgelistet sind die MW ± SD von drei unabhängigen Versuchen.

Die Exposition von Bipyridin *plus* Carbogen® bewirkte in A549 Zellen keinen gesteigerten GSX-Verlust. Die EC₅₀ Werte (DQ) mit und ohne Gabe von Carbogen® unterschieden sich nicht. Allerdings war der EC₅₀ Wert von PQ *plus* Carbogen® signifikant höher.

In HepG2 Zellen unterschieden sich die EC₅₀ Werte für den GSX-Verlust (beide Herbizide) nicht signifikant von den Werten mit Normalluft.

Die EC₅₀ Werte beider Bipyridine waren in L929 Zellen nahezu identisch mit denen unter Standardbedingungen.

Der Verlust an Glutathion unter Standardbedingungen (24h) und die Bipyridin-Exposition *plus* Carbogen® (16h) unterschieden sich nicht signifikant voneinander. In einer um 8h kürzeren Expositionszeit kam es zu einem gleichwertigen Verlust. Dies spricht für eine Wirkzunahme beider Substanzen (in allen drei Zelllinien).

3.2.2.4 Schädigung der Zellmembran

Wie auch unter normoxischen Bedingungen war in allen Zelllinien ein konzentrationsabhängiger Membranschaden erkennbar. Den prozentualen Anteil intakter Zellen zur Gesamtzellzahl zeigt Tabelle 3.9. Die zugehörigen EC_{50} Werte sind in Tabelle 3.10 aufgelistet.

A549 Zellen zeigten keinen Unterschied zwischen normoxischen und hyperoxischen Bedingungen bei Bipyridin-Exposition. Das galt für die Membranintegrität sowie für die erhobenen EC_{50} Werte. Konzentrationen $\geq 0,3\text{mM}$ (DQ) und $\geq 1\text{mM}$ (PQ) waren zytotoxisch.

	A549 DQ	A549 PQ	HepG2 DQ	HepG2 PQ	L929 DQ	L929 PQ
Kontrolle	89%	89%	79%	79%	88%	88%
0,01mM	89%	89%	89%	83%	87%	89%
0,03mM	75%	89%	86%	83%	87%	84%
0,1mM	51%	86%	82%	87%	17%	81%
0,3mM	3%	71%	0%	83%	14%	86%
1mM	0%	44%	0%	1%	0%	29%
3mM	0%	10%	0%	0%	0%	0%

Tab. 3.9: Anteil intakter Zellen an der Gesamtzellzahl nach Bipyridin-Exposition *plus* Carbogen® (Endpunkt Trypanblau-Test). Die Expositionszeit betrug 16h. Aufgelistet sind die MW von drei unabhängigen Versuchen.

	Testsubstanz	A549	HepG2	L929
EC_{50} 16h	DQ + Carbogen®	0,09mM \pm 0,02	0,1mM \pm 0,004	0,04mM \pm 0,01
EC_{50} 16h	PQ + Carbogen®	0,5mM \pm 0,3	0,7mM \pm 0,08	0,6mM \pm 0,1

Tab. 3.10: Die EC_{50} beider Bipyridine *plus* Carbogen® (Endpunkt Trypanblau-Test). Die Expositionszeit betrug 16h. Aufgelistet sind die MW \pm SD von drei unabhängigen Versuchen.

In HepG2 Zellen war kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Expositionsbedingungen erkennbar. Ab 0,3mM DQ waren nur Zellfragmente zählbar, bei PQ waren Konzentrationen $\geq 1\text{mM}$ PQ schädlich für die Zellen. Die ermittelten EC_{50} Werte unterschieden sich nicht voneinander.

Auch in L929 Zellen zeigte die vermehrte Bereitstellung von O_2 keinen Unterschied zur Exposition mit Normalluft. Konzentrationen $\geq 0,1\text{mM}$ DQ waren zytotoxisch. Ausnahme waren die mit PQ exponierten Zellen. PQ-Konzentrationen $\geq 1\text{mM}$ waren toxischer für die Zellen als unter normoxischen Bedingungen. Die ermittelten EC_{50} Werte beider Herbizide waren kleiner als die unter Standardbedingungen. Statistisch unterschieden sie sich aber nicht.

In allen Zelllinien führte die Steigerung des Sauerstoffanteils zu ungefähr gleichen Zellmembranschäden. Trotz des fehlenden Unterschiedes darf von einer Wirkverstärkung ausgegangen werden. Für den gleichen Vitalitätsverlust reichte eine um 8h kürzere Expositionszeit aus.

3.3 Erholungsversuche

3.3.1 Zelllinien

Nach eingehenden Untersuchungen zur akuten Zytotoxizität der Bipyridine sollte die Reversibilität der Schäden geprüft werden. Zu diesem Zweck wurde nach Exposition untersucht, ob die Zellen nach einem Mediumwechsel mit vorausgegangener Auswaschprozedur noch fähig waren sich zu erholen. Der Vergleich der EC_{50} Werte von der Standardexposition und anschließender Nachinkubation sind in Abbildung 3.14 (DQ) und 3.15 (PQ) dargestellt. Für die Auflistung der Werte siehe Tabelle 3.11.

	Bipyridin	A549	HepG2	L929
EC_{50} nach 24h Erholung	DQ	1,8mM \pm 1,1	0,2mM \pm 0,1	0,2mM \pm 0,1
EC_{50} nach 24h Erholung	PQ	4,5mM \pm 1,5	0,1mM \pm 0,06	1,1mM \pm 0,8

Tab. 3.11: Die EC_{50} beider Bipyridine nach anschließender Nachinkubation (24h) mit DMEM (Endpunkt XTT-Test). Aufgelistet sind die MW \pm SD von mindestens drei unabhängigen Versuchen.

A549- und HepG2 Zellen reagierten nicht auf den Mediumwechsel. In beiden Zelllinien unterschieden sich die EC_{50} Werte (beide Bipyridine) nicht von denen unter Standardbedingungen. L929 Zellen waren nach der DMEM-Gabe signifikant stärker geschädigt.

Keine der Zelllinien zeigte Anzeichen einer (vorübergehenden) Erholung, so dass von einer irreversiblen Schädigung ausgegangen werden muss.

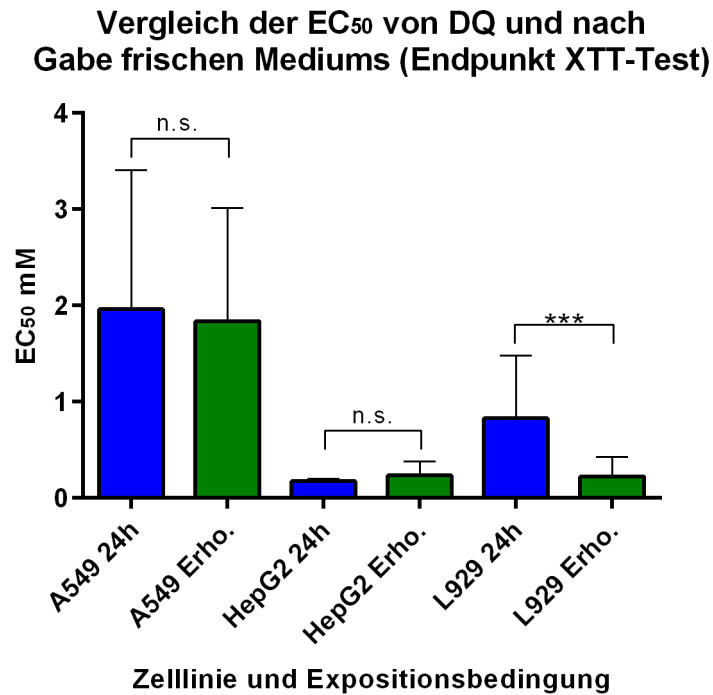


Abb. 3.14: Vergleich der EC₅₀ von DQ und nach Gabe frischen Mediums (Endpunkt XTT-Test). Balkenhöhe und Fehlerbalken repräsentieren jeweils MW + SD von mindestens drei unabhängigen Versuchen. Signifikante Unterschiede zwischen den Versuchspaaren wurden mit dem zweiseitigen t-Test ermittelt.

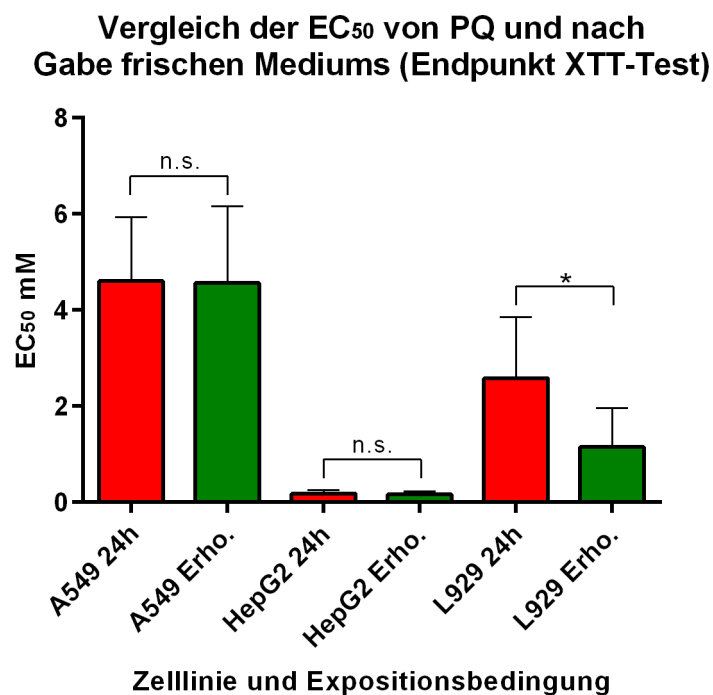


Abb. 3.15: Vergleich der EC₅₀ von PQ und nach Gabe frischen Mediums (Endpunkt XTT-Test). Balkenhöhe und Fehlerbalken repräsentieren jeweils MW + SD von mindestens drei unabhängigen Versuchen. Signifikante Unterschiede zwischen den Versuchspaaren wurden mit dem zweiseitigen t-Test ermittelt.

3.4 Versuche mit Antioxidantien

3.4.1 Gabe von Antioxidantien nach Bipyridin-Exposition

Als Nächstes wurde der Nutzen von Antioxidantien bei Bipyridin-Exposition untersucht. Wird das Verhältnis zwischen Oxidantien und Antioxidantien zugunsten von letzteren verschoben, könnte (zumindest kurzfristig) ein schützender Effekt entstehen. Als Antioxidantien wurden DMSO und NAC allein in Kombination verwendet. Die in XTT-Tests ermittelten EC_{50} Werte sind in Abbildung 3.16 dargestellt und Tabelle 3.12 aufgelistet.

3.4.1.1 Dimethylsulfoxid

Die Gabe von DMSO (Endkonzentration 0,5%) rund 24h nach Beginn der Exposition mit DQ oder PQ zeigte keinerlei positiven Effekt. Die Zellen waren bei den toxischen Konzentrationen 1mM und 3mM nicht mehr proliferationsfähig. Die EC_{50} Werte der 24h Exposition und der DMSO-Gabe unterschieden sich nicht signifikant. DMSO an sich war bis 0,5% v/v nicht zytotoxisch.

3.4.1.2 N-Acetylcystein

Die zweite überprüfte Substanz war NAC. Eine Konzentration von 10mM konnte die Zellen nicht schützen. Es war bei DQ und PQ kein signifikanter Unterschied zur Exposition unter Standardbedingungen zu erkennen. 30mM NAC war zytotoxisch. Der zytotoxische Effekt könnte durch osmotischen Stress der Zellen entstanden sein. Dies war bei beiden Bipyridinen der Fall.

	Bipyridin	DMSO	NAC	DMSO + NAC
EC_{50} Antioxidans	DQ	0,7mM \pm 0,6	0,3mM \pm 0,1	0,4mM \pm 0,3
EC_{50} Antioxidans	PQ	2,1mM \pm 1	2,3mM \pm 0,8	1,7mM \pm 0,5

Tab. 3.12: Die EC_{50} beider Bipyridine und anschließender Gabe von Antioxidantien in L929 Zellen (Endpunkt XTT-Test). Die Einwirkzeit betrug 24h. Aufgelistet sind die MW \pm SD von mindestens drei unabhängigen Versuchen.

3.4.1.3 Kombinierte Gabe

Auch die Kombination beider Antioxidantien hatte keinen schützenden Effekt. DMSO und 10mM NAC waren wirkungslos. 30mM NAC war, wie auch die Einzelgabe, in der Anwendung zytotoxisch. Dies war bei beiden Bipyridinen zu beobachten. Der vermutliche Grund dafür war die oben genannte Hyperosmolarität der Lösung. Nach erfolgter Exposition mit Bipyridin und anschließender Gabe von Antioxidantien war keine Verminderung der Schäden erkennbar. Beide Herbizide wirkten wie unter Standardbedingungen uneingeschränkt toxisch.

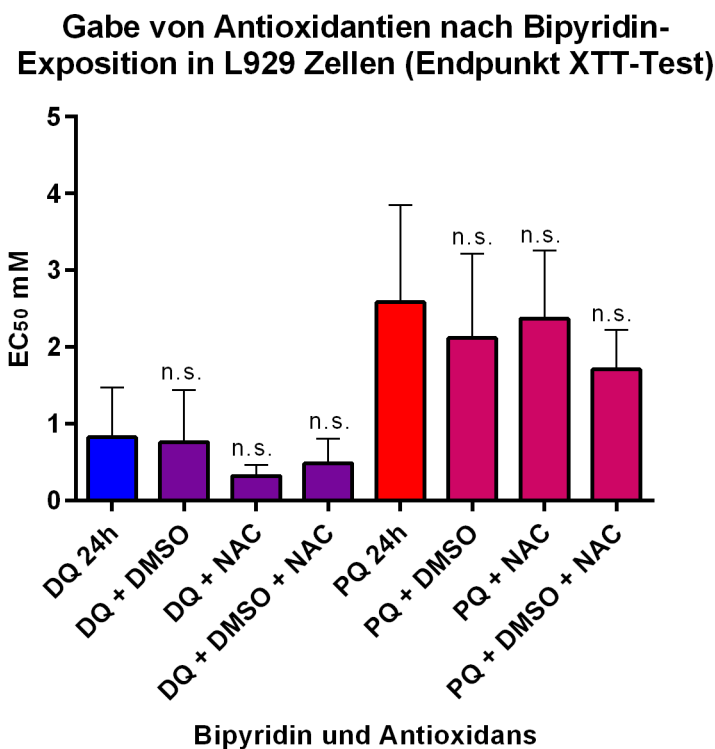


Abb. 3.16: Gabe von Antioxidantien nach Bipyridin-Exposition in L929 Zellen (Endpunkt XTT-Test). Die Zellen wurden 16h mit Bipyridinen exponiert. Nach BE wurden Antioxidantien für 24h verabreicht. Balkenhöhe und Fehlerbalken repräsentieren jeweils MW + SD von mindestens drei unabhängigen Versuchen. Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen wurden mit dem post-hoc Test nach Dunnett ermittelt.

3.4.2 Gleichzeitige Gabe von Antioxidantien und Bipyridin

In der gleichen Versuchsreihe wurden die Antioxidantien zum Startzeitpunkt der Bipyridin-Exposition gegeben. Die Intention war eine prophylaktische Gabe zum Zellschutz. Ziel war eine Verhinderung bzw. Verzögerung zellulärer Schäden. Die EC₅₀ Werte sind in Abbildung 3.17 dargestellt und in Tabelle 3.13 aufgelistet.

3.4.2.1 Dimethylsulfoxid

Auch eine gleichzeitige Gabe von 0,5% DMSO zum Startzeitpunkt der Bipyridin-Exposition zeigte keine signifikante Verbesserung. Die Proliferationsfähigkeit der Zellen war vergleichbar mit der von nicht behandelten Zellen. Diese Beobachtung war bei beiden Herbiziden zu machen. Vermutlich war DMSO nicht in der Lage die ROS abzufangen. Die alleinige Gabe von DMSO war nicht zytotoxisch.

	Bipyridin	DMSO	NAC	DMSO + NAC
EC ₅₀ Antioxidans	DQ	1,3mM ± 0,8	1,4mM ± 0,9	1,3mM ± 0,7
EC ₅₀ Antioxidans	PQ	3,1mM ± 1	2,6mM ± 1,3	2,9mM ± 1,7

Tab. 3.13: Die EC₅₀ beider Bipyridine bei gleichzeitiger Gabe von Antioxidantien in L929 Zellen (Endpunkt XTT-Test). Die Einwirkzeit betrug 24h. Aufgelistet sind die MW ± SD von mindestens drei unabhängigen Versuchen.

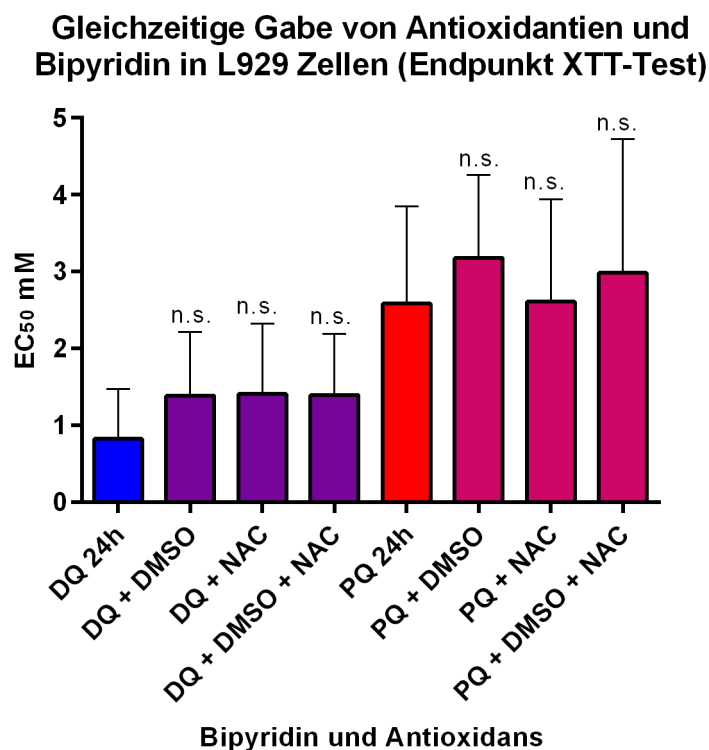


Abb. 3.17: Gleichzeitige Gabe von Antioxidantien und Bipyridin in L929 Zellen (Endpunkt XTT-Test). Die Expositionszeit betrug 24h. Balkenhöhe und Fehlerbalken repräsentieren jeweils MW + SD von mindestens drei unabhängigen Versuchen. Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen wurden mit dem post-hoc Test nach Dunnett ermittelt.

3.4.2.2 N-Acetylcystein

Die Gabe von NAC zum Startzeitpunkt der Bipyridin-Exposition zeigte ein äquivalentes Ergebnis wie die „therapeutische Gabe“. 10mM NAC waren nicht in der Lage die zytotoxischen Konzentrationen von DQ und PQ abzuschwächen. Eine Konzentration von 30mM war zytotoxisch. NAC war bei beiden Bipyridinen ohne Wirkung.

3.4.2.3 Kombinierte Gabe

Mit der kombinierten Gabe beider Radikalfänger war kein schützender Effekt erkennbar. 10mM NAC mit 0,5% DMSO zeigte keine signifikante Verbesserung der Proliferationsfähigkeit der Zellen. Die Kombination 30mM NAC und 0,5% DMSO war äquivalent zytotoxisch wie die solitäre Applikation. Die Anwesenheit von DMSO zeigte keine Abschwächung in der Toxizität. Ebenso hatte DMSO keine unterstützende Funktion. Es unterschieden sich beide Herbizide nicht voneinander. Der vermutliche Grund war wahrscheinlich das bereits oben beschriebene Überschreiten der Osmolarität.

In dem Bereich der zytotoxischen Konzentrationen konnte keiner der oben genannten Radikalfänger die Vergiftung abschwächen. DQ und PQ waren uneingeschränkt toxisch. Bei der gleichzeitigen Gabe von Antioxidantien war DQ weiterhin schädlicher als PQ.

3.5 Anwendbarkeit der Haber'schen Regel

Die Haber'sche Regel beschreibt den Zusammenhang zwischen der Konzentration eines Giftes und der Einwirkzeit (Expositionszeit). Für „klassische“ Gifte ist das Produkt aus beiden konstant. Für etliche Gifte gilt die Haber'sche Regel in modifizierter Form, weil sie eine Wirkschwelle zeigen. Bei Konzentrationen unterhalb dieser Schwelle kann die Expositionszeit beliebig ausgedehnt werden, ohne dass eine toxische Wirkung erkennbar wird. Die Zellen sind in der Lage auftretende Schäden effektiv zu reparieren. Die Regel gilt oft auch nicht bei höheren Giftkonzentrationen, wenn Transportprozesse limitierend sind oder durch andere Mechanismen zusätzliche Schäden entstehen, so dass die Wirkung überproportional steigt. Bei einem „klassischen“ Gift würde eine starke Giftkonzentration über eine kurze Wirkdauer zum gleichen Schaden führen wie eine geringe Konzentration über einen langen Wirkzeitraum [56].

Es gilt: $c \cdot t = \text{konstant}$ oder $c_1 \cdot t_1 = c_2 \cdot t_2$

Die Haber'sche Regel wurde anhand der ermittelten Konzentrationszeitprodukte angewendet. Verglichen wurde 3mM Bipyridin über 24h mit 1mM Bipyridin über 72h. Zur Erfassung der Zytotoxizität wurde der XTT-Test verwendet. Die Paare wurden in allen Zelllinien verglichen. Siehe Abbildung 3.18 für DQ und Abbildung 3.19 für PQ.

DQ erfüllte die Kriterien der Regel in allen Zelllinien. Die miteinander verglichenen Konzentrationszeitprodukte waren in HepG2- und L929 Zellen annähernd identisch. Die Formazanbildung der A549 Zellen war nach 24h Exposition besser als man anhand der Regel nach Haber erwartet hätte.

In HepG2- und L929 Zellen erfüllte PQ ebenfalls die Kriterien der Haber'schen Regel. Die Konzentrationszeitprodukte waren in der jeweiligen Zelllinie nahezu gleich. In A549 Zellen war die Regel für PQ nicht anwendbar. Wie bereits bei DQ beschrieben, war der Schaden nach 24h geringer ausgeprägt. Die Konzentrationszeitprodukte unterscheiden sich signifikant.

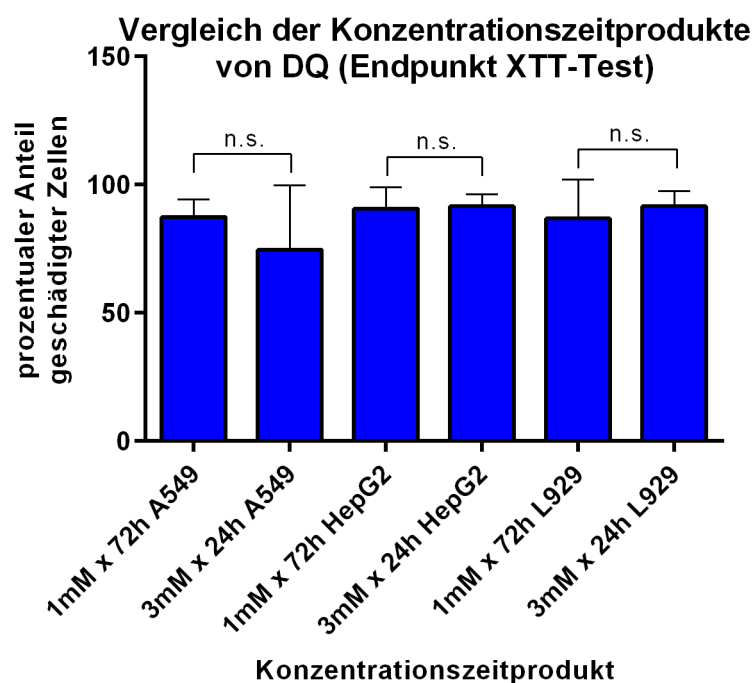


Abb. 3.18: Vergleich der Konzentrationszeitprodukte von DQ (Endpunkt XTT-Test). Balkenhöhe und Fehlerbalken repräsentieren jeweils MW + SD von mindestens drei unabhängigen Versuchen. Signifikante Unterschiede zwischen den Versuchspaaren wurden mit dem zweiseitigen t-Test ermittelt.

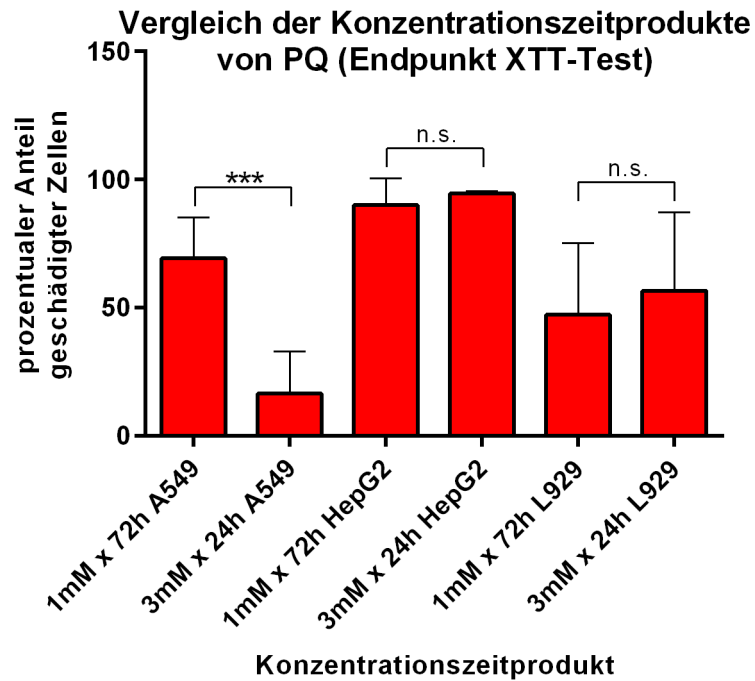


Abb. 3.19: Vergleich der Konzentrationszeitprodukte von PQ (Endpunkt XTT-Test). Balkenhöhe und Fehlerbalken repräsentieren jeweils MW + SD von mindestens drei unabhängigen Versuchen. Signifikante Unterschiede zwischen den Versuchspaaren wurden mit dem zweiseitigen t-Test ermittelt.

4 Diskussion

4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurde die akute und subakute Toxizität der beiden strukturell verwandten Bipyridine DQ und PQ in drei verschiedenen Zelllinien und für drei verschiedene Endpunkte verglichen. Entsprechend der aus In-vivo-Experimenten und Patientenfällen bekannten Organotropie beider Herbizide wurden humane Zelllinien aus Leber und Lunge verwendet. Zusätzlich wurden murine Fibroblasten eingesetzt, die oft als Indikatorzelllinie für toxikologische Untersuchungen verwendet werden [57, 58]. Die Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- In A549- und L929 Zellen war DQ die toxischere Substanz.
- In HepG2 Zellen gab es in der Giftigkeit keinen signifikanten Unterschied.
- Bei bekannter Hepatotropie war DQ auch in Lungenzellen (A549) toxisch.
- Bei bekannter Pulmotropie war PQ auch in Leberzellen (HepG2) toxisch.
- Die Haber'sche Regel war bei DQ anwendbar.
- In HepG2- und L929 Zellen war die Haber'sche Regel für PQ gültig.
- Eine Erhöhung des Sauerstoffpartialdrucks erhöhte die Toxizität beider Bipyridine in allen Zelllinien.
- Eine Erholung nach DMEM-Gabe war nicht vorhanden.
- Die Antioxidantien DMSO, NAC und deren Kombination waren wirkungslos.

4.2 Vergleich der Bipyridin-Exposition in-vitro

Das Interesse, ob die Organotropie beider Bipyridine einen entscheidenden Einfluss auf die Auswahl der zu verwendenden Zellen für die Untersuchung der Zytotoxizität hat, galt gleichermaßen für Versuche zum Vergiftungsmechanismus wie auch zur Erprobung von Antioxidantien. Zu diesem Zwecke wurden die akuten und subakuten zytotoxischen Effekte der Herbizide in drei unterschiedlichen Zelllinien verglichen.

4.2.1 Auswahl und Vergleich der gemessenen Endpunkte

Die toxische Wirkung der Bipyridine beruht auf mindestens zwei bekannten Mechanismen [3]. Der Redoxzyklus der Bipyridine (siehe 1.2) produziert zytotoxische ROS. Diese wiederum schädigen zelluläre Membranen und Organellen. Kofaktor des oben genannten Zyklus ist $\text{NAD(P)H}+\text{H}^+$. Es kommt zum Verlust von Reduktionsäquivalenten mit entsprechenden metabolischen Einschränkungen [1, 2]. $\text{NADH}+\text{H}^+$ ist in vielen Stoffwechselwegen essentiell. Glykolyse, Citratzyklus und Atmungskette sind nur einige Beispiele. $\text{NADPH}+\text{H}^+$ wird im Fettstoffwechsel und bei der Reduktion von GSSG benötigt. Für den Schutz vor ROS spielt es eine wichtige Rolle. Die Effekte wurden mit dem XTT-Test (essentieller Kofaktor ist $\text{NAD(P)H}+\text{H}^+$), dem Tietze-Assay (Glutathion-Status) und dem Trypanblau-Test (Zellmembranschäden) quantifiziert.

Zum Schutz vor zytotoxischen Radikalen hat die Zelle verschiedene Abfangmechanismen zur Verfügung. Die wichtigste Rolle spielt in diesem Zusammenhang Glutathion [59]. In der reduzierten Form kann es freie Elektronen auf ROS übertragen. Das GSH/GSSG-Verhältnis erniedrigt sich. Glutathion ist nicht nur ein intrazellulärer Radikalfänger. Für den allgemeinen Zellmetabolismus und dessen Regulation spielt dieses Tripeptid eine wichtige Rolle [59]. Darüber hinaus hat es auch regulatorische Funktionen bei Apoptose und Autophagie. Diese werden durch eine Erniedrigung des GSH/GSSG-Verhältnisses ausgelöst. Für das Überleben der Zelle hat Glutathion eine unentbehrliche Funktion [59]. Eine konzentrationsabhängige Erniedrigung von GSH war in allen drei Zelllinien nach Bipyridin-Exposition zu sehen. Der Tietze-Assay lieferte suffiziente Ergebnisse zum Redox-Status und so indirekt zum oxidativen Stress der Zellen. Eine Alternative wäre eine direkte Messung von ROS.

Die produzierten Radikale greifen zelluläre Organellen und Membranen an. Die Membranen werden durch LPO geschädigt [22]. Der Trypanblau-Test ist gut geeignet, diesen Effekt nachzuweisen. Der Farbstoff dringt in alle Zellen mit geschädigter Membran ein. Allerdings ist keine Unterscheidung zwischen Apoptose und Nekrose möglich. Die spezifische Aussagekraft des Tests wird durch das Anfärben von Zellfragmenten beeinflusst.

Alle untersuchten Marker erfassten die konzentrationsabhängigen Schäden einer Bipyridin-Exposition. Am empfindlichsten reagierte der Trypanblau-Test. Konzentrationen, die von diesem als schädlich erfasst wurden, waren beim XTT-Test und Tietze-Assay (noch) nicht auffällig. Abbildung 4.1 zeigt dies am Beispiel von HepG2 Zellen.

4.2.2 Bipyridin-Exposition auf untersuchte Zelllinien

Für die Prognose der PQ-Vergiftung sind das Ausmaß und der Schweregrad des Lungenschadens entscheidend. PQ akkumuliert vor allem in Alveolarepithelzellen Typ I und II sowie in Clara-Zellen [1]. A549 Zellen haben ähnliche Merkmale wie Alveolarepithelzellen Typ II [60]. Diese Zelllinie wurde bereits in Studien mit PQ exponiert [60-62].

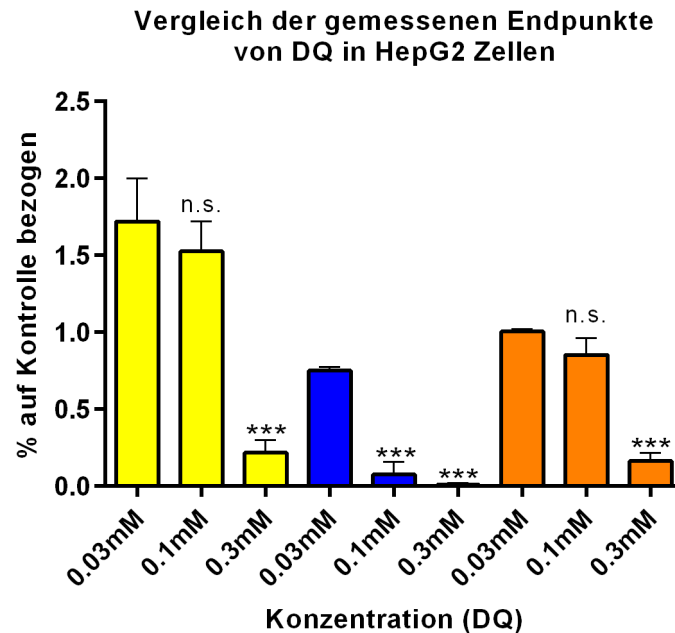


Abb. 4.1: Vergleich der gemessenen Endpunkte am Beispiel von DQ in HepG2 Zellen. Die Endpunkte Glutathion (gelbe Balken), Trypanblau-Test (blaue Balken) und XTT-Test (orange Balken) sind gegenübergestellt. Balkenhöhe und Fehlerbalken repräsentieren jeweils MW + SD von drei unabhängigen Versuchen. Signifikante Unterschiede wurden mit dem post-hoc Test nach Tukey ermittelt.

O'Brien et al verglichen in ihrer Veröffentlichung die Toxizität beider Bipyridine in A549 Zellen [60]. Die Vitalität wurde mit dem Trypanblau-Test ermittelt. Konzentrationen von 1mM (beide Herbizide) waren letal für die Zellen. Ebenfalls war eine konzentrationsabhängige Zellschädigung beider Gifte nachweisbar. DQ war die toxischere Substanz. Das Ergebnis der Autoren wurde durch die vorliegende Arbeit bestätigt. In unseren Versuchen reagierten die A549 Zellen nicht so empfindlich auf die PQ-Exposition. Bei einer Konzentration von 1mM PQ waren noch mehr als 50% Zellen vital.

Von den untersuchten Zelllinien besaßen die HepG2 Zellen einen geringen Vorrat an Glutathion. In diesem Sachverhalt liegt vermutlich auch der Grund für den nicht-signifikanten Unterschied zwischen den beiden Herbiziden. Beide Substanzen sind potente Radikalbildner. Wahrscheinlich war der Glutathion-Pool der Zellen bei beiden Bipyridinen schnell

verbraucht. In HepG2 Zellen hatte PQ eine gleichwertig toxische Wirkung (wie DQ) trotz der bevorzugten Akkumulation in der Lunge. Die große Empfindlichkeit der Zellen erklärt sich durch den Zelltyp. Hepatozyten haben eine große Bandbreite an Enzymen. Im endoplasmatischen Retikulum ist die Cytochrom P450 Reduktase reichlich vorhanden [63]. Mit der Elektronenübertragung startet dieses Enzym den Redoxzyklus der Bipyridine (siehe 1.2). Bei einer größeren Enzymausstattung werden ROS vermehrt produziert.

L929 Zellen wurden auch in der Arbeit von Styles mit DQ oder PQ exponiert [64]. Als Vitalitätstest verwendete er den Trypanblau-Test. Nach einer 24h Expositionszeit erwies sich das Intervall von 0,1 bis 10mM DQ als toxisch für die Zellen. 10mM PQ waren tödlich für die Zellen. Die Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit decken sich mit denen von Styles. Die stärkere Toxizität von DQ wurde ebenfalls bestätigt. Allerdings reagierten die L929 Zellen hier empfindlicher auf PQ. Für eine Zellschädigung reichten bereits 3mM aus.

Die vergleichende Toxizität beider Bipyridine an humanen embryonalen Stammzellen (künstlicher Abort) wurde von Kurisaki & Nagamori untersucht [65]. DQ war toxischer, aber der Unterschied war nicht signifikant. Die Zellen wurden mit Sudanschwarz B angefärbt und die LDH-Aktivität wurde bestimmt. Die embryonalen Stammzellen zeigten Parallelen zu den von uns untersuchten HepG2 Zellen. Beide Herbizide waren sehr toxisch und zeigten keinen signifikanten Unterschied zueinander.

Perla et al untersuchten D3 mES Zellen (embryonale Stammzellen der Maus) [66]. Ziel war die Untersuchung des Einflusses von PQ während der Schwangerschaft. Die Zellen wurden mit einer PQ-Konzentration von 2,8 μ M für 24h exponiert. Es waren noch 52% vital. Die ROS Produktion (gemessen mit dem Fluoreszenzfarbstoff H₂DCFDA) war um den Faktor 2,5 erhöht. In den von uns durchgeführten Versuchen wurden Bipyridin-Konzentrationen verwendet, die um den Faktor 10 größer waren. Alle drei Zelllinien waren in diesem Konzentrationsbereich vital und hatten normale Glutathionwerte. D3 mES Zellen reagierten besonders empfindlich auf die Exposition mit PQ.

Die Wirkung von DQ auf das antioxidative System und das Zellwachstum in SH-SY5Y Zellen wurde von Slaughter et al untersucht [67]. Die Neuroblastomzellen wurden für 48h mit 5, 10 oder 25 μ M DQ exponiert. Der Anteil vitaler Zellen nahm konzentrationsabhängig ab. Nach 48h waren 65% der Zellen vital (Trypanblau-Test). Die gemessene GSH Menge in mit 25 μ M DQ exponierten Zellen war verglichen zur Kontrolle dreifach höher. Die Autoren schlussfolgerten eine adaptive zelluläre Antwort auf den oxidativen Stress. Im Vergleich zu

den Versuchen in der vorliegenden Arbeit unterscheiden sich die DQ-Konzentrationen um fast eine 10er Potenz. Dementsprechend reagierten die SH-SY5Y Zellen auch besonders empfindlich auf die Exposition mit DQ.

In-vivo akkumuliert DQ nur wenig in der Lunge. Der Polyamintransporter ist ein aktiver Transporter. Anders als PQ wird DQ vom Polyamintransporter nicht erkannt, da die beiden positiven Ladungen zu nahe beieinander sind [1]. Würde sich DQ ebenfalls in der Lunge anreichern, wäre in-vivo die Vergiftung vermutlich noch schädlicher. Manabe & Ogata applizierten dieses Herbizid Ratten intratracheal [68]. Sieben Tage nach Vergiftung waren in den Lungenschnitten fokale fibrotische Läsionen erkennbar. Sie schlossen aus ihren Ergebnissen, dass DQ auch zu fibrotischen Veränderungen in der Lunge führt.

Als Erklärung für die unterschiedliche Toxizität der Bipyridine in-vitro und in-vivo nannten O'Brien et al einen möglichen Verlust der differenzierten zellulären Aufnahme von PQ und Polyaminen [60]. Ebenso könnte auch eine durch Mutation entstandene Funktionserweiterung die Ursache sein. Polyamintransporter kommen ubiquitär in den Zellen des Körpers vor [69]. Alle drei untersuchten Zelllinien exprimieren diesen Transporter [70-72].

4.2.3 Bipyridin-Exposition und Haber'sche Regel

Die Regel nach Haber beschreibt den Zusammenhang zwischen Expositionszeit und Konzentration eines Giftes [73]. Wenn sie für DQ und PQ zutrifft, dann sollten auch sehr niedrige Konzentrationen über einen sehr langen Zeitraum schädlich sein. Mögliche Langzeitschäden wurden bei beiden Bipyridinen beobachtet. Kibby und Ring beschrieben in ihrer Arbeit Haut- und Fingerläsionen von Fabrikarbeitern (Verpackungsfabrik für Herbizide), die vor allem DQ abfüllten [30]. Arbeiter, die längere Zeit mit PQ exponiert waren, hatten ein gesteigertes Risiko einen Morbus Parkinson zu entwickeln [13].

In der vorliegenden Arbeit wurde überprüft, ob die Bipyridin-Intoxikation in-vitro mithilfe der Haber'schen Regel beschreibbar ist. Dies war bei Expositionszeiten von 24h bis 72h der Fall. Eine Anwendung der Regel auf kürzere Expositionszeiten (<24h) wurde in dieser Arbeit nicht angestrebt.

Nur in A549 Zellen war bei PQ die Regel nicht anwendbar. Die Zellen tolerierten die kürzere Expositionszeit mit der höheren Konzentration besser als nach Anwendung der Regel zu erwarten war. Die Toxizität konnte durch eine ausreichende Menge an Glutathion effektiv

genug abgemildert werden. In diesem Falle liegt möglicherweise eine Wirkschwelle vor, die allerdings nicht näher charakterisiert wurde. Dieses Phänomen ließe sich durch eine Modifikation der Haber'schen Regel beschreiben.

4.2.4 Schlussfolgerungen

Die unterschiedliche Toxizität in-vitro und in-vivo wurde von mehreren Autoren beschrieben. Oft erwies sich DQ als die toxischere Substanz. In zwei der von uns untersuchten Zelllinien (A549 und L929) war dies auch hier der Fall. Die beschriebene Organotropie beider Herbizide ist offenbar phänotypisch bestimmt. Mit der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass für die Untersuchungen der akuten und subakuten Zytotoxizität in isolierten Zellen die Organotropie eine untergeordnete Rolle spielt. Bei der Auswahl der verwendbaren Zelllinien können für DQ auch A549 Zellen sowie für PQ HepG2 Zellen verwendet werden.

4.3 Einfluss der Veränderung des Sauerstoffpartialdrucks

Die Produktion von ROS spielt in der Bipyridin-Vergiftung eine wichtige Rolle [16]. Mitbeteiligt ist der intrazellulär vorhandene Sauerstoff. Dieser Zusammenhang war Anlass für weitere Untersuchungen. Ziel war eine genauere Charakterisierung des Einflusses von O₂. Beide Bipyridine wurden in der Literatur bereits unter hyper- oder hypoxischen Bedingungen untersucht [61, 74].

Bipyridine produzieren mithilfe von Sauerstoff ROS. Bei einem erhöhten Sauerstoffpartialdruck erscheint eine vermehrte Produktion plausibel. Molekularer Sauerstoff ist selbst ein Diradikal und für Zellen toxisch [75]. Demzufolge wäre eine erhöhte Giftigkeit allein durch eine Steigerung des Sauerstoffpartialdrucks zu erwarten.

Eine Zunahme der Toxizität durch Sauerstoff hätte auch klinische Relevanz. Patienten mit einer schweren Vergiftung werden oft intensivmedizinisch mit O₂ behandelt. DQ akkumuliert kaum in der Lunge, dennoch würde es vermutlich in anderen Geweben wie Leber und Nieren den zusätzlichen Sauerstoff aktivieren. Eine Verschlechterung für den Patienten könnte die Folge sein. Für PQ ist eine Sauerstoffgabe ohnehin kontraindiziert und nur palliativen Fällen vorbehalten [17].

4.3.1 Wirkung der Sauerstoffgabe auf die Bipyridin-Exposition

Die gemessenen Endpunkte (XTT- und Trypanblau-Test) deuteten auf eine verstärkte Zellschädigung hin. Die gemessenen Glutathiongehalte unterschieden sich nicht voneinander, aber es wurde nur der Gesamtglutathiongehalt quantifiziert und nicht das Verhältnis von GSH und GSSG. Bereits nach der kürzeren Expositionszeit von 16h war der Zellschaden – statistisch gesehen – nicht zu unterscheiden von der Situation nach 24h in Normalluft. Unter Berücksichtigung der Zeit waren DQ und PQ toxischer als unter Standardbedingungen.

Eine Zunahme der Toxizität beider Substanzen war in A549- und L929 Zellen, aber nicht in HepG2 Zellen vorhanden. In der letzteren Zelllinie richteten beide Bipyridine unter hyperoxischen Bedingungen in einer um 8h kürzeren Zeit die gleichen Schäden an. Unter Standardbedingungen war der Glutathion-Pool verbraucht. Eine Erhöhung der Sauerstoffkonzentration konnte nicht zu einer Wirkverstärkung führen, da die Bipyridine bereits unter normoxischen Bedingungen für die Zellen tödlich waren.

Auffällig war die wesentlich stärkere Giftigkeit von DQ. Kehrer et al waren der Überzeugung, DQ würde schneller am intrazellulären Redoxzyklus teilnehmen [74]. Auch hier unterscheidet sich dieses Ergebnis von der Intoxikation in-vivo. Unabhängig von der Organotropie der beiden Herbizide führte die zusätzliche Bereitstellung von Sauerstoff zu größeren Zellschäden.

Aus Sauerstoff können ebenfalls verstärkt ROS (Hydroxyl-Radikal und Superoxid-Anion) gebildet worden sein [76]. Die ausschließlich mit Carbogen® exponierten Zellen unterschieden sich jedoch nicht von den unbehandelten Kontrollen im Brutschrank. Dies war bei allen drei Zelllinien der Fall. Offenbar spielte die Eigentoxizität des Sauerstoffs eine untergeordnete Rolle. Die erhöhte Giftigkeit beider Bipyridine lässt sich am ehesten durch eine vermehrte Radikalproduktion erklären.

Einen weiteren Einfluss auf die gemessenen Zellschäden könnte die Position der Kulturflaschen in der Expositions-kammer gehabt haben. Nach der Aufteilung des Luftstroms auf die drei Plattformen der Expositionseinrichtung (Abbildung 2.2) waren jeweils vier Flaschen in Reihe geschaltet. Die Sauerstoffkonzentration könnte sich dementsprechend von Flasche zu Flasche verringert haben. Um diesem durch die Apparatur bedingten Umstand entgegenzuwirken, wurden die Flaschen bei jedem Versuch randomisiert.

Den Einfluss von hypoxischen Bedingungen (1% O₂, 94% N₂ und 5% CO₂) haben Kim et al in PQ-exponierten A549 Zellen untersucht [61]. Die Zellen waren unter Hypoxie signifikant weniger geschädigt als unter Normoxie. Es wurde 1mM PQ und eine Expositionszeit von 24h untersucht, die Erhebung der Zellvitalität erfolgte mit dem MTT-Test. Eine Abschwächung und ein von den Autoren beschriebener möglicher protektiver Effekt waren das Ergebnis. In dieser Publikation wurde das konträre Szenario untersucht. Die Autoren sprechen von der Möglichkeit, dass hypoxische Umgebungsbedingungen die Produktion von ROS supprimiert haben könnten. Das Ergebnis von Kim et al und die Resultate dieser Arbeit untermauern die wichtige Rolle von Sauerstoff im Vergiftungsmechanismus.

4.3.2 Vergleich des In-vitro-Modells mit dem In-vivo-Modell

Studien zur Exposition mit DQ oder PQ unter Hyperoxie wurden bisher nur am Tiermodell (Ratten) untersucht [74, 77].

Kehrer et al applizierten Ratten DQ oder PQ intravenös und setzten die Nagetiere einer 100% O₂-Atmosphäre oder alternativ Raumlufte aus [74]. Die Zeit bis zum Eintritt des Todes variierte von 241min bei PQ und 87min bei DQ (die Dosis war jeweils 80mg/kg). Die mit Raumlufte exponierten Tiere waren bei jeder Bipyridin-Dosis für mindestens 48h noch am Leben. Alle Versuchstiere entwickelten ein tödliches ARDS. Radioaktiv markiertes DQ akkumulierte vermehrt in Leber und Nieren. PQ reicherte sich noch zusätzlich in der Lunge an. Kehrer war der erste Autor, der eine Wirkverstärkung beider Bipyridine durch O₂ beschrieb. Das Ergebnis deckt sich mit den Resultaten dieser Arbeit. In A549- und L929 Zellen war die Wirkung beider Bipyridine verstärkt. In HepG2 Zellen war dieser Effekt nicht vorhanden.

In der Studie von Keeling et al wurden Ratten einer Sauerstoffkonzentration von 85% ausgesetzt [77]. Im Gegensatz zu Kehrer et al und den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit war die Letalität von PQ zehnfach, die von DQ nur zweifach erhöht. Die Zeitspanne bis zum Tod der Versuchstiere war bei beiden Herbiziden verkürzt. PQ und in achtfach höherer Konzentration DQ schädigten insbesondere Alveolarepithelzellen des Typ II. Beide Herbizide reicherten sich in der Lunge an. Die Akkumulation von PQ war mit $25,1 \pm 0,9\text{nmol}/100\text{g}$ Trockengewicht höher als bei DQ ($7,5 \pm 0,4\text{nmol}/100\text{g}$ Trockengewicht). Der verstärkte Schaden an Zellen durch hyperoxische Umgebungsbedingungen konnte durch die Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden. Allerdings war der PQ-induzierte Schaden nicht

so groß und DQ erwies sich hier als die toxischere Substanz. Der Grund für die unterschiedlichen Resultate ist am ehesten in den Unterschieden der beiden Versuchsmodelle bedingt. In-vivo akkumuliert nur PQ in der Lunge. Die bereits oben diskutierte Problematik der DQ-Aufnahme wird auch bei der zusätzlichen Exposition mit Carbogen® eine Rolle spielen. Demzufolge gelangte viel weniger DQ in die Lungen der Versuchstiere. Keeling et al schlossen aus ihren Versuchen auf einen kombinierten Schaden von PQ und Sauerstoff (bevorzugt in Alveolarepithelzellen des Typs II) [77].

Das Zellmodell hat seine Grenzen. Für die Übertragung auf die Situation beim Menschen eignet sich das Tiermodell besser. Kinetische Parameter wie Absorption, Verteilung, Metabolismus und Exkretion des Giftes können beim Tier berücksichtigt werden, aber nicht in einem einfachen In-vitro-Modell. Die Entstehung der Lungenfibrose erfordert das Zusammenspiel unterschiedlicher Zelltypen und lässt sich in vollem Umfang bisher nur am intakten Organismus bzw. an Ex-vivo-Modellen beobachten und beurteilen.

4.3.3 Schlussfolgerungen

Eine vermehrte Exposition von Sauerstoff in Form von Carbogen® führte bei der Bipyridin-Exposition zu einer schädlicheren Wirkung an den untersuchten Zellen. Am wahrscheinlichsten handelte es sich um eine Wirkverstärkung der Herbizide, da Carbogen® an sich nicht zytotoxisch war.

In Notaufnahmen und auf Intensivstationen wird bei respiratorischer Insuffizienz oft Sauerstoff gegeben. Da sowohl im Tierversuch als auch im Zellmodell die Toxizität von Bipyridinen unter hohen Sauerstoffkonzentrationen zunahm, erscheint diese Maßnahme grundsätzlich – und nicht nur bei der Vergiftung mit PQ – kontraindiziert. Dementsprechend sollte das Verabreichen von Sauerstoff bei Bipyridin-Intoxikation palliativen Fällen vorbehalten sein.

4.4 Wirkung der Antioxidantien

Fehlende Therapie-Standards und das Fehlen eines geeigneten Antidots sind die beiden Hauptprobleme bei der Vergiftung mit DQ und PQ [1, 2, 17]. Die Lungenfibrose ist ein entscheidender Faktor für die infauste Prognose bei Vergiftung mit PQ. In der Hoffnung ein

geeignetes Therapeutikum zu finden wurden bereits viele Substanzen untersucht. Angriffspunkte sind ein Unterdrücken der Inflammation [78] und ein Verschieben des Gleichgewichtes zwischen Oxidantien und Antioxidantien zugunsten der letzteren [79]. Mit DMSO und NAC wären theoretisch zwei vielversprechende Antioxidantien verfügbar. DMSO fungiert als direkter Radikalfänger (insbesondere von Hydroxyl-Radikalen) [80]. NAC hat eine freie SH-Gruppe, die der Zelle notwendige Reduktionsäquivalente liefert und zytotoxische Radikale entgiften kann. Das nach Deacetylierung frei werdende Cystein könnte direkt als Baustein für die Glutathionsynthese verwendet werden [51].

4.4.1 Dimethylsulfoxid

Bei den in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimenten war DMSO nicht in der Lage die Zellen vor der Bipyridin-Vergiftung zu schützen. Die EC_{50} Werte zeigten keinen Unterschied zu den Werten bei Zellen ohne Behandlung mit dem Antioxidans. Die fehlende Wirkung erklärt sich durch den Zeitpunkt der Applikation. Nach 16h Expositionszeit waren die Zellen bereits irreversibel geschädigt, ein Schutz offenbar nicht mehr möglich.

DMSO wurde einmalig appliziert und 24h lang unter Standardbedingungen kultiviert. In unseren Versuchen gab es keinen Hinweis auf eine Wirkung. Die Bipyridine wirkten unverändert toxisch. Beide produzierten weiterhin Radikale. DMSO gelangt gut in die Zelle hinein und war in ausreichender Menge vorhanden. Wie sich DMSO und die kombinierte Gabe mit NAC auf den Glutathionstatus Bipyridin-exponierter Zellen auswirken, sollte weiter beleuchtet werden. Gleiches gilt für die Membranintegrität. Die Formazanbildung der Zellen war nach der Gabe des Radikalfängers nicht schlechter. Weitere Untersuchungen zur Dosierung, zeitlichen Gabe und zum Messzeitpunkt sollten diese Frage klären.

DMSO wurde Patienten mit chronisch respiratorischer Insuffizienz gegeben. In der Arbeit von Marin wurde es intramuskulär appliziert [81]. Der Radikalfänger wurde gut vertragen. Patienten mit Hypoxie und Hyperkapnie zeigten eine Verbesserung ihrer Beschwerden. DMSO könnte auch in der Intoxikation mit Bipyridinen hilfreich sein. Weitere Forschungen sollten diese Möglichkeit ausloten.

4.4.2 N-Acetylcystein

Auch das zweite verwendete Antioxidans konnte die Zellen nicht vor der schädlichen Bipyridin-Wirkung schützen. Eine Gabe nach 16h Exposition war zu spät. Zu diesem Zeitpunkt waren die Zellen bereits irreversibel geschädigt (siehe 4.4.1). Hoffer et al exponierten ihre Alveolarepithelzellen Typ II (Ratte) 8h mit 1mM PQ [82]. NAC konnte die Bipyridin-Toxizität um 50% verringern. Die Wirkung von NAC an mit PQ vergifteten Ratten wurde von Yeh et al untersucht. Die Gabe zu vier Zeitpunkten (2, 6, 10 und 14h nach PQ-Exposition) führte zu einer höheren Überlebensrate der Versuchstiere [83]. Eine frühere Applikation und eine (eventuelle) Zweitgabe sollten untersucht werden.

Die Gabe zum Startzeitpunkt der Vergiftung (beide Konzentrationen) zeigte ebenfalls keinen schützenden Effekt. NAC war in L929 Zellen wirkungslos. 4h vor der Exposition mit PQ (1mM für 24h) verabreichten Mitsopoulos & Suntres ebenfalls NAC (5mM) [51]. Diese Vorbehandlung hatte keinen schützenden Effekt. Unsere Beobachtungen erbrachten das gleiche Resultat. Im Unterschied zu Mitsopoulos & Suntres wurde die doppelte Menge an Antioxidans ohne Vorwirkzeit gegeben.

Eine unzureichende Dosis oder eine generelle Wirkungslosigkeit sind mögliche Gründe. Hier wurde NAC nur einmalig gegeben und für 24h belassen. Eine wiederholte Gabe von 10mM könnte dienlich sein. Das Zeitfenster war vielleicht zu lang gewählt. Die Zellen könnten in diesem Zeitintervall eine kurzzeitige Erholung erlebt haben. In dem In-vitro-Modell gab es keine Giftelimination, aber das Antioxidans würde allmählich verbraucht und nach 24h wäre ein protektiver Effekt nicht mehr erkennbar.

In unseren Versuchen wurde nicht die zelluläre Aufnahme von NAC gemessen. In der Arbeit von Mitsopoulos & Suntres waren A549 Zellen in der Lage NAC und liposomales NAC aufzunehmen [51]. Die liposomale Form konnte leichter und in größerer Menge in die Zellen eindringen. Auch Yeh et al beschrieben eine unkomplizierte Aufnahme von NAC [83]. Das Antioxidans wurde in PBS gelöst und Ratten intraperitoneal appliziert. Ein verminderter intrazellulärer Transport in L929 Zellen ist unwahrscheinlich, lässt sich aber nicht ausschließen.

30mM NAC waren zytotoxisch. Grund dafür war vermutlich osmotischer Stress bzw. ein leicht saures Milieu. Mitsopoulos & Suntres lösten in ihrer Arbeit das NAC in PBS [51]. Mit 50mM NAC war ein Einfluss auf die Zellvitalität in A549 Zellen gegeben. Geringere Konzentrationen waren nicht zytotoxisch.

Beide Antioxidantien wurden auch in Kombination gegeben. Die Gabe nach bzw. vor Bipyridin-Exposition war wirkungslos. Die Versuchsdurchführung unterschied sich nicht von der solitären Gabe. Dementsprechend lassen sich die bereits diskutierten Punkte (irreversibler Schaden nach Bipyridin-Exposition und kein Wirken der Antioxidantien) auf die Kombination übertragen. Ob DMSO die zelluläre Aufnahme von NAC erleichtert wurde nicht untersucht.

4.4.3 Schlussfolgerungen

Beide Antioxidantien waren in dieser Arbeit wirkungslos. In der Literatur wurde für NAC mehrfach eine positive Wirkung beschrieben [51, 82, 83]. Die Zelllinie L929 konnte erfolgreich für die Erprobung verwendet werden. Beide Herbizide reagierten wie unter Standardbedingungen, was ein Hinweis auf die untergeordnete Rolle der Organotropie ist.

Obwohl beide Antioxidantien in dieser Arbeit keine Wirkung zeigten, sollten sie als potenzielle Therapeutika (vor allem NAC) nicht vorschnell verworfen werden.

5 Zusammenfassung

Bereits kurz nach der Markteinführung der Bipyridine DQ und PQ als Herbizide häuften sich die Intoxikationen mit beiden Substanzen. Meist akzidentell oder in suizidaler Absicht ingestiert endeten die Vergiftungen aufgrund fehlender Antidota überwiegend letal. In-vivo ist PQ aufgrund der Pulmotoxizität (Lungenfibrose) das gefährlichere und häufiger als Suizidmittel missbrauchte Gift. Trotz des Verbotes von PQ in der EU werden beide Bipyridine immer noch weltweit eingesetzt. Für die toxikologische Forschung ist von Interesse, ob die bekannte Organotropie ein prinzipielles Merkmal darstellt oder bei Untersuchungen eine untergeordnete Rolle spielt. In den untersuchten A549 Zellen (stellvertretend für Alveolarepithelzellen Typ II) und L929 Zellen (stellvertretend für Fibroblasten) war DQ im gemessenen Endpunkt (XTT-Test) signifikant toxischer. In HepG2 Zellen (stellvertretend für Hepatozyten) unterschieden sich beide Stoffe nicht signifikant voneinander.

Beide Herbizide sind potente ROS-Bildner. Ein erhöhtes Sauerstoffangebot in Form von Carbogen® führte zu einer Wirkverstärkung beider Bipyridine. Besonders die Giftigkeit von DQ nahm stark zu. Die Gabe von zwei Antioxidantien, DMSO und NAC (allein und in Kombination) hatte keinen schützenden Effekt auf die exponierten L929 Zellen. Die Haber'sche Regel war mit Ausnahme von PQ in A549 Zellen in dem Expositionszeitraum von 24h bis 72h anwendbar.

DQ zeigte eine vergleichbare toxische Wirkung in A549 Zellen sowie PQ eine toxische Wirkung in HepG2 Zellen. Die aus In-vivo-Untersuchungen bekannte Organotropie der beiden Bipyridine spielte in-vitro keine erkennbare Rolle. Für die Grundlagenforschung in-vitro erscheint deshalb eine histiotypische Auswahl des Zelltyps bei der Suche nach Antidota gegen eine Bipyridin-Intoxikation entbehrlich. Auch die für toxikologische Untersuchungen anerkannte Zelllinie L929 reagierte empfindlich auf beide Bipyridine.

Anhang

1 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1: Die Strukturformeln von DQ und PQ.	1
Abb. 1.2: Chinesische Plantagenarbeiterin beim Versprühen von PQ.	2
Abb. 1.3: Intrazellulärer Redoxzyklus von PQ und Radikalentstehung.	3
Abb. 2.1: Schematische Darstellung einer Mikrotiterplatte der Expositionsversuche unter Standardbedingungen.	13
Abb. 2.2: Die Apparatur der Expositionsversuche von Bipyridin <i>plus</i> Carbogen®.	14
Abb. 2.3: Schematische Darstellung einer Mikrotiterplatte der Versuche mit Antioxidantien am Beispiel DQ und NAC.	15
Abb. 2.4: Reaktionszyklus des Tietze-Tests.	16
Abb. 2.5: Darstellung der dem XTT-Test zugrunde liegende Farbreaktion.	18
Abb. 3.1: Vergleich der EC ₅₀ von DQ und NaBr (Endpunkt XTT-Test).	20
Abb. 3.2: Vergleich der EC ₅₀ von PQ mit PQ <i>plus</i> NaBr und NaBr in L929 Zellen (Endpunkt XTT-Test).	22
Abb. 3.3: Vergleich beider Bipyridine in A549 Zellen (Endpunkt XTT-Test).	23
Abb. 3.4: Vergleich beider Bipyridine in HepG2 Zellen (Endpunkt XTT-Test).	24
Abb. 3.5: Vergleich beider Bipyridine in L929 Zellen (Endpunkt XTT-Test).	24
Abb. 3.6: Vergleich der Konzentrations-Wirkungskurven von DQ (Endpunkt XTT-Test). ...	25
Abb. 3.7: Vergleich der Konzentrations-Wirkungskurven von DQ und PQ in HepG2 Zellen (Endpunkt XTT-Test).	26
Abb. 3.8: Vergleich der Konzentrations-Wirkungskurven von DQ in A549 Zellen (Endpunkt XTT-Test).	27
Abb. 3.9: Vergleich der EC ₅₀ beider Bipyridine (Endpunkt Glutathion).	28
Abb. 3.10: Vergleich der EC ₅₀ beider Bipyridine (Endpunkt Trypanblau-Test).	29
Abb. 3.11: Vergleich der Konzentrations-Wirkungskurven von PQ (Endpunkt Trypanblau-Test).	30
Abb. 3.12: Vergleich der EC ₅₀ von DQ unter normoxischen und hyperoxischen Bedingungen (Endpunkt XTT-Test).	32
Abb. 3.13: Vergleich der EC ₅₀ von PQ unter normoxischen und hyperoxischen Bedingungen (Endpunkt XTT-Test).	32
Abb. 3.14: Vergleich der EC ₅₀ von DQ und nach Gabe frischen Mediums (Endpunkt XTT-Test).	36
Abb. 3.15: Vergleich der EC ₅₀ von PQ und nach Gabe frischen Mediums (Endpunkt XTT-Test).	36
Abb. 3.16: Gabe von Antioxidantien nach Bipyridin-Exposition in L929 Zellen (Endpunkt XTT-Test).	38
Abb. 3.17: Gleichzeitige Gabe von Antioxidantien und Bipyridin in L929 Zellen (Endpunkt XTT-Test).	39
Abb. 3.18: Vergleich der Konzentrationszeitprodukte von DQ (Endpunkt XTT-Test).	41
Abb. 3.19: Vergleich der Konzentrationszeitprodukte von PQ (Endpunkt XTT-Test).	42

Abb. 4.1: Vergleich der gemessenen Endpunkte am Beispiel von DQ in HepG2 Zellen..... 45

Einzelwerte zur Abbildung 3.1: Vergleich der EC₅₀ von DQ und NaBr (Endpunkt XTT-Test).

Zelllinie	EC ₅₀ DQ [mM]					EC ₅₀ DQ MW ± SD [mM]	EC ₅₀ NaBr [mM]		EC ₅₀ NaBr MW ± SD [mM]
A549	0,2535 2,1915 3,5818	3,2801 3,2684	4,3850 0,7191	0,4556 0,9994	1,0688 1,3879	1,9 ± 1,4	9,1125 10,3659 10,3302	8,1787	9,9 ± 0,7
HepG2	0,2016 0,1594	0,1594				0,1 ± 0,02	9,3347 9,4328	8,1787	8,9 ± 0,6
L929	1,2382 0,6680 0,2500 0,9299 0,2024 0,2537	0,1249 0,1846 0,2368 0,5398 2,0582 0,7821	0,2507 0,2517 0,2100 0,1773 0,0887 0,7435	0,6989 0,6689 1,2132 1,0187 1,0304 1,7407	1,8127 1,6728 1,4243 1,1419 2,3871	0,8 ± 0,6	6,8907 7,9793 7,4435		7,4 ± 0,5

Einzelwerte zur Abbildung 3.2: Vergleich der EC₅₀ von PQ mit PQ *plus* NaBr und NaBr in L929 Zellen (Endpunkt XTT-Test).

Zelllinie	EC ₅₀ PQ [mM]					EC ₅₀ PQ MW ± SD [mM]	EC ₅₀ PQ + NaBr [mM]	EC ₅₀ PQ + NaBr MW ± SD [mM]	EC ₅₀ NaBr [mM]	EC ₅₀ NaBr MW ± SD [mM]
L929	5,7394 2,0002 2,6474 1,5647 3,3115	0,8991 1,8583 0,9778 1,3809 0,6711	0,8162 1,3738 3,9436 2,1762 2,9626	3,0201 4,3555 4,0047 2,7531 3,1984	3,4728 2,9104 2,9797 3,0243	2,5 ± 1,2	3,7903 4,6363 3,8889	4,1 ± 0,4	6,8907 7,9793 7,4435	7,4 ± 0,5

Einzelwerte zur Abbildung 3.3: Vergleich beider Bipyridine in A549 Zellen (Endpunkt XTT-Test).

Expositionszeit	EC ₅₀ DQ [mM]			EC ₅₀ DQ MW ± SD [mM]	EC ₅₀ PQ [mM]			EC ₅₀ PQ MW ± SD [mM]
24h	0,2535 2,1915 3,5818 3,2801	3,2684 4,3850 0,7191 0,4556	0,9994 1,0688 1,3879	1,9 ± 1,4	3,3031 3,9437 4,5767	4,5622 7,6117 4,8377	3,5493 4,4615	4,6 ± 1,3
48h	0,4914 2,4226 2,4727	1,2092 0,6896	0,2234 0,4458	1,1 ± 0,9	1,9647 3,9091 4,4579	2,9010 2,8823	0,9799 1,9854	2,7 ± 1,1
72h	0,0841 0,2174 0,1336	0,1446 0,1807	0,0700 0,1645	0,1 ± 0,05	0,4695 1,0840 0,6242	0,6866 0,5714	0,2418 0,7371	0,6 ± 0,2

Einzelwerte zur Abbildung 3.4: Vergleich beider Bipyridine in HepG2 Zellen (Endpunkt XTT-Test).

Expositionszeit	EC ₅₀ DQ [mM]		EC ₅₀ DQ MW ± SD [mM]	EC ₅₀ PQ [mM]		EC ₅₀ PQ MW ± SD [mM]
24h	0,2016 0,1594	0,1594	0,1 ± 0,02	0,2639 0,1414	0,1412	0,1 ± 0,07
48h	0,1089 0,0857	0,3024	0,1 ± 0,1	0,2016 0,0732	0,2036	0,1 ± 0,07
72h	0,0704 0,0007	0,0028	0,02 ± 0,03	0,1546 0,0039	0,0035	0,05 ± 0,08

Einzelwerte zur Abbildung 3.5: Vergleich beider Bipyridine in L929 Zellen (Endpunkt XTT-Test).

Expositionszeit	EC ₅₀ DQ [mM]				EC ₅₀ DQ MW ± SD [mM]	EC ₅₀ PQ [mM]				EC ₅₀ PQ MW ± SD [mM]
24h	1,2382 0,6680 0,2500 0,9299 0,2024 0,2537 0,1249 0,1846	0,2368 0,5398 2,0582 0,7821 0,2507 0,2517 0,2100	0,1773 0,0887 0,7435 0,6989 0,6689 1,2132 1,0187	1,0304 1,7407 1,8127 1,6728 1,4243 1,1419 2,3871	0,8 ± 0,6	5,7394 2,6474 1,5647 3,3115 0,8991 2,0002	1,8583 0,6711 3,9436 4,0047 3,4728 2,1762	2,7531 2,9104 0,8162 1,3738 1,3809 0,9778	2,9626 4,3555 2,9797 3,0201 3,1984 3,0243	2,5 ± 1,2
48h	0,4918 0,2030	0,5836			0,4 ± 0,1	2,2630 1,3617	2,4921		2,0 ± 0,5	
72h	0,2423 0,1326	0,6433 0,0418			0,2 ± 0,2	1,4387 1,1808	1,4601 0,3580		1,1 ± 0,5	

Einzelwerte zur Abbildung 3.6: Vergleich der Konzentrations-Wirkungskurven von DQ (Endpunkt XTT-Test).

DQ-Konzentration [mM]	ΔE (450nm – 690nm) A549	ΔE (450nm – 690nm) HepG2	ΔE (450nm – 690nm) L929
Kontrolle	3,239	3,317	3,055
0,01	3,152	3,339	3,011
0,03	3,242	3,361	3,029
0,1	3,230	2,625	3,091
0,3	3,176	0,647	3,021
1	2,797	0,218	1,148
3	1,784	0,221	0,051

Einzelwerte zur Abbildung 3.7: Vergleich der Konzentrations-Wirkungskurven von DQ und PQ in HepG2 Zellen (Endpunkt XTT-Test).

Bipyridin-Konzentration [mM]	DQ ΔE (450nm – 690nm)			DQ ΔE (450nm – 690nm) MW ± SD	PQ ΔE (450nm – 690nm)			PQ ΔE (450nm – 690nm) MW ± SD
Kontrolle	3,3434	3,3174	3,3174	3,326 ± 0,01505	3,3432	3,3173	3,3173	3,326 ± 0,01495
0,01	3,2607	3,3399	3,3399	3,314 ± 0,04572	3,3686	3,3944	3,3944	3,386 ± 0,01488
0,03	3,3039	3,3619	3,3619	3,343 ± 0,03348	3,3528	3,3618	3,3618	3,359 ± 0,005178
0,1	3,2675	2,6253	2,6253	2,839 ± 0,3708	3,3377	2,8768	2,8768	3,030 ± 0,2661
0,3	0,3447	0,6479	0,6479	0,5468 ± 0,1750	1,2819	0,2110	0,2110	0,5680 ± 0,6183
1	0,1613	0,2183	0,2183	0,1994 ± 0,03290	0,1294	0,2076	0,2076	0,1816 ± 0,04514
3	0,1362	0,2218	0,2218	0,1933 ± 0,04942	0,1242	0,1973	0,1973	0,1729 ± 0,04221

Einzelwerte zur Abbildung 3.8: Vergleich der Konzentrations-Wirkungskurven von DQ in A549 Zellen (Endpunkt XTT-Test).

DQ-Konzentration [mM]	ΔE (450nm – 690nm) 24h	ΔE (450nm – 690nm) 48h	ΔE (450nm – 690nm) 72h
Kontrolle	3,300	3,258	3,241
0,01	3,263	3,250	2,898
0,03	3,284	3,245	2,571
0,1	3,250	3,159	1,929
0,3	3,202	2,875	1,358
1	2,730	1,927	0,776
3	1,875	0,597	0,093

Einzelwerte zur Abbildung 3.9: Vergleich der EC_{50} beider Bipyridine (Endpunkt Glutathion).

Zelllinie	EC_{50} DQ [mM]		EC_{50} DQ MW \pm SD [mM]	EC_{50} PQ [mM]		EC_{50} PQ MW \pm SD [mM]
A549	0,1732 0,0488	0,0379	0,08 \pm 0,07	2,1138 1,2451	0,8820	1,4 \pm 0,6
HepG2	0,2595 0,1737	0,1971	0,2 \pm 0,04	0,6701 0,4728	0,3512	0,4 \pm 0,1
L929	0,0738 0,0462	0,0648	0,06 \pm 0,01	1,3449 0,5754	0,8081	0,9 \pm 0,3

Einzelwerte zur Abbildung 3.10: Vergleich der EC_{50} beider Bipyridine (Endpunkt Trypanblau-Test).

Zelllinie	EC_{50} DQ [mM]		EC_{50} DQ MW \pm SD [mM]	EC_{50} PQ [mM]		EC_{50} PQ MW \pm SD [mM]
A549	0,0601 0,0649	0,0483	0,05 \pm 0,008	0,2988 0,9791	0,4675	0,5 \pm 0,3
HepG2	0,1343 0,1129	0,1584	0,1 \pm 0,02	0,4044 0,7608	0,4456	0,5 \pm 0,1
L929	0,0519 0,0704	0,0439	0,05 \pm 0,01	1,1435 0,4013	2,4025	1,3 \pm 1

Einzelwerte zur Abbildung 3.11: Vergleich der Konzentrations-Wirkungskurven von PQ (Endpunkt Trypanblau-Test).

PQ-Konzentration	Vitale Zellen [%] A549	Vitale Zellen [%] HepG2	Vitale Zellen [%] L929
Kontrolle	84	88	92
0,01	90	91	83
0,03	90	88	85
0,1	88	87	84
0,3	89	86	81
1	59	2	73
3	13	0	9

Einzelwerte zur Abbildung 3.12: Vergleich der EC₅₀ von DQ unter normoxischen und hyperoxischen Bedingungen (Endpunkt XTT-Test).

Zelllinie	EC ₅₀ DQ [mM]				EC ₅₀ DQ MW ± SD [mM]	EC ₅₀ DQ Carbogen® [mM]	EC ₅₀ DQ Carbogen® MW ± SD [mM]
A549	0,2535 2,1915 3,5818	3,2801 3,2684 4,3850	0,7191 0,4556 0,9994	1,0688 1,3879	1,9 ± 1,4	0,1237 0,0964 0,0503	0,09 ± 0,03
HepG2	0,2016 0,1594		0,1594		0,1 ± 0,02	0,1088 0,1754 0,1242	0,1 ± 0,03
L929	1,2382 0,6680 0,2500 0,9299 0,2024 0,2537 0,1249 0,1846	0,2368 0,5398 2,0582 0,7821 0,2507 0,2517 0,2100	0,1773 0,0887 0,7435 0,6989 0,6689 1,2132 1,0187	1,0304 1,7407 1,8127 1,6728 1,4243 1,1419 2,3871	0,8 ± 0,6	0,0544 0,0136 0,0539	0,04 ± 0,02

Einzelwerte zur Abbildung 3.13: Vergleich der EC₅₀ von PQ unter normoxischen und hyperoxischen Bedingungen (Endpunkt XTT-Test).

Zelllinie	EC ₅₀ PQ [mM]				EC ₅₀ PQ MW ± SD [mM]	EC ₅₀ PQ Carbogen® [mM]	EC ₅₀ PQ Carbogen® MW ± SD [mM]
A549	3,3031 3,9437	4,5767 4,5622	7,6117 4,8377	3,5493 4,4615	4,6 ± 1,3	2,0569 3,2050 1,6437	2,3 ± 0,8
HepG2	0,2639 0,1414		0,1412		0,1 ± 0,07	0,2794 0,2087 0,2834	0,2 ± 0,04
L929	5,7394 2,6474 1,5647 3,3115 0,8991 2,0002	1,8583 0,6711 3,9436 4,0047 3,4728 2,1762	2,7531 2,9104 0,8162 1,3738 1,3809 0,9778	2,9626 4,3555 2,9797 3,0201 3,1984 3,0243	2,5 ± 1,2	0,6309 0,0694 0,3811	0,3 ± 0,2

Einzelwerte zur Abbildung 3.14: Vergleich der EC₅₀ von DQ und nach Gabe frischen Mediums (Endpunkt XTT-Test).

Zelllinie	EC ₅₀ DQ [mM]				EC ₅₀ DQ MW ± SD [mM]	EC ₅₀ DQ Erholung [mM]	EC ₅₀ DQ Erholung MW ± SD [mM]
A549	0,2535 2,1915 3,5818	3,2801 3,2684 4,3850	0,7191 0,4556 0,9994	1,0688 1,3879	1,9 ± 1,4	2,8708 0,9317 1,7755 0,4600 3,1480	1,8 ± 1,1
HepG2	0,2016 0,1594		0,1594		0,1 ± 0,02	0,1478 0,4008 0,1531	0,2 ± 0,1
L929	1,2382 0,6680 0,2500 0,9299 0,2024 0,2537 0,1249 0,1846	0,2368 0,5398 2,0582 0,7821 0,2507 0,2517 0,2100	0,1773 0,0887 0,7435 0,6989 0,6689 1,2132 1,0187	1,0304 1,7407 1,8127 1,6728 1,4243 1,1419 2,3871	0,8 ± 0,6	0,4586 0,1722 0,4094 0,0468 0,0392	0,2 ± 0,1

Einzelwerte zur Abbildung 3.15: Vergleich der EC₅₀ von PQ und nach Gabe frischen Mediums (Endpunkt XTT-Test).

Zelllinie	EC ₅₀ PQ [mM]				EC ₅₀ PQ MW ± SD [mM]	EC ₅₀ PQ Erholung [mM]			EC ₅₀ PQ Erholung MW ± SD [mM]
A549	3,3031	4,5767	7,6117	3,5493	4,6 ± 1,3	5,7495	4,6955	2,3073	4,5 ± 1,5
	3,9437	4,5622	4,8377	4,4615		6,3016	3,7780		
HepG2	0,2639		0,1412		0,1 ± 0,07	0,2110	0,1773		0,1 ± 0,06
	0,1414					0,0935			
L929	5,7394	1,8583	2,7531	2,9626	2,5 ± 1,2	1,8842	0,3619		1,1 ± 0,8
	2,6474	0,6711	2,9104	4,3555		0,9278	0,4501		
	1,5647	3,9436	0,8162	2,9797		2,1138			
	3,3115	4,0047	1,3738	3,0201					
	0,8991	3,4728	1,3809	3,1984					
	2,0002	2,1762	0,9778	3,0243					

Einzelwerte zur Abbildung 3.16: Gabe von Antioxidantien nach Bipyridin-Exposition in L929 Zellen (Endpunkt XTT-Test).

Antioxidans	EC ₅₀ DQ [mM]				EC ₅₀ DQ MW ± SD [mM]	EC ₅₀ PQ [mM]			EC ₅₀ PQ MW ± SD [mM]	
Ohne Antioxidans	1,2382	0,2368	0,1773	1,0304	0,8 ± 0,6	5,7394	3,9436	1,3809	2,5 ± 1,2	
	0,6680	0,5398	0,0887	1,7407		2,6474	4,0047	0,9778		
	0,2500	2,0582	0,7435	1,8127		1,5647	3,4728	2,9626		
	0,9299	0,7821	0,6989	1,6728		3,3115	2,1762	4,3555		
	0,2024	0,2507	0,6689	1,4243		0,8991	2,7531	2,9797		
	0,2537	0,2517	1,2132	1,1419		2,0002	2,9104	3,0201		
	0,1249	0,2100	1,0187	2,3871		1,8583	0,8162	3,1984		
	0,1846					0,6711	1,3738	3,0243		
DMSO	2,0973	0,2599	0,5730		0,7 ± 0,6	3,7408	1,9222	0,5755	2,1 ± 1	
	0,6184	0,2989	0,7194			2,0397	1,5251	2,8971		
NAC	0,3663	0,5030	0,3386		0,3 ± 0,1	3,5358	0,9791	2,5478	2,3 ± 0,8	
	0,0966	0,3051				1,7772	2,6946	2,6988		
DMSO + NAC	0,1589	0,5829			0,4 ± 0,3	0,9868	2,0228		1,7 ± 0,5	
	0,3292	0,8852				2,1093	1,7257			

Einzelwerte zur Abbildung 3.17: Gleichzeitige Gabe von Antioxidantien und Bipyridin in L929 Zellen (Endpunkt XTT-Test).

Antioxidans	EC ₅₀ DQ [mM]				EC ₅₀ DQ MW ± SD [mM]	EC ₅₀ PQ [mM]			EC ₅₀ PQ MW ± SD [mM]	
Ohne Antioxidans	1,2382	0,2368	0,1773	1,0304	0,8 ± 0,6	5,7394	3,9436	1,3809	2,5 ± 1,2	
	0,6680	0,5398	0,0887	1,7407		2,6474	4,0047	0,9778		
	0,2500	2,0582	0,7435	1,8127		1,5647	3,4728	2,9626		
	0,9299	0,7821	0,6989	1,6728		3,3115	2,1762	4,3555		
	0,2024	0,2507	0,6689	1,4243		0,8991	2,7531	2,9797		
	0,2537	0,2517	1,2132	1,1419		2,0002	2,9104	3,0201		
	0,1249	0,2100	1,0187	2,3871		1,8583	0,8162	3,1984		
	0,1846					0,6711	1,3738	3,0243		
DMSO	2,2603	0,8675	2,0202		1,3 ± 0,8	4,3637	1,5085	3,1155	3,1 ± 1	
	0,2588	1,5282				3,8506	3,0383			
NAC	2,6359	1,5765	1,1335		1,4 ± 0,9	1,3675	0,7564	3,2538	2,6 ± 1,3	
	0,0953	1,6107				3,6388	0,9660	3,4597		
						3,7576	3,7001			
DMSO + NAC	2,1137	1,8910	1,0582		1,3 ± 0,7	4,1546	0,9802	3,1092	2,9 ± 1,7	
	0,1580	1,7617				3,7593	2,1512	5,7272		
						1,0060				

Einzelwerte zur Abbildung 3.18: Vergleich der Konzentrationszeitprodukte von DQ (Endpunkt XTT-Test).

Zelllinie	Konzentrationszeitprodukt	Zellvitalität [%]				Zellvitalität [%] MW ± SD
A549	1mM x 72h	90	87	76	95	87,43 ± 6,852
		87	82	95		
A549	3mM x 24h	55	41	95	94	74,70 ± 24,98
		43	92	95	94	
		45	93			
HepG2	1mM x 72h	96		95	81	90,67 ± 8,386
HepG2	3mM x 24h	96	93	96	85	91,57 ± 4,685
		93	93	85		
L929	1mM x 72h	87	97	65	98	86,75 ± 15,33
L929	3mM x 24h	95	99	94	81	91,55 ± 5,901
		98	87	92	85	
		99	80	93	86	
		96	90	93	85	
		97	98	87	84	
		97	98	87	87	
		97	98	88	87	
		97				

Einzelwerte zur Abbildung 3.19: Vergleich der Konzentrationszeitprodukte von PQ (Endpunkt XTT-Test).

Zelllinie	Konzentrationszeitprodukt	Zellvitalität [%]				Zellvitalität [%] MW ± SD
A549	1mM x 72h	76	74	76	70	69,29 ± 15,84
		36	67	86		
A549	3mM x 24h	10	9	35	45	16,57 ± 16,53
		9	1	7		
HepG2	1mM x 72h	96		96	78	90,00 ± 10,39
HepG2	3mM x 24h	96	94	94	94	94,00 ± 0,0
L929	1mM x 72h	31	43	27	88	47,25 ± 28,00
L929	3mM x 24h	65	52	14	94	56,71 ± 30,50
		89	44	83	29	
		89	16	65	94	
		89	45	54	84	
		51	14	10	83	
		31	8	62	96	

Einzelwerte zur Abbildung 4.1: Vergleich der gemessenen Endpunkte am Beispiel von DQ in HepG2 Zellen.

DQ-Konzentration [mM]	Endpunkt Glutathion [% Kontrolle]		Endpunkt Glutathion MW ± SD	Endpunkt Trypanblau-Test [% Kontrolle]		Endpunkt Trypanblau-Test MW ± SD	Endpunkt XTT [% Kontrolle]		Endpunkt XTT MW ± SD
0,03	2,004949	1,445395	1,719 ± 0,2800	0,73	0,78	0,7500 ± 0,02646	0,9881793	1,013426	1,005 ± 0,01458
	1,707768			0,74			1,013426		
0,1	1,711467	1,545668	1,526 ± 0,1954	0,07	0,16	0,07667 ± 0,08021	0,9772909	0,7913698	0,8533 ± 0,1073
	1,322096			0,00			0,7913698		
0,3	0,1527459	0,1916949	0,2183 ± 0,08210	0,02	0,01	0,0100 ± 0,0100	0,1030985	0,1953031	0,1646 ± 0,05323
	0,3103701			0,00			0,1953031		

2 Tabellenverzeichnis

Tab. 2.1: Verdünnungsreihe zur Erstellung der Eichkurve für die GSX-Bestimmung.....	17
Tab. 3.1: Die EC ₅₀ von DQ und NaBr (Endpunkt XTT-Test).	20
Tab. 3.2: Die EC ₅₀ von NaBr, PQ <i>plus</i> NaBr und PQ in L929 Zellen (Endpunkt XTT-Test). 21	
Tab. 3.3: Die EC ₅₀ beider Bipyridine in zeitlicher Abfolge (Endpunkt XTT-Test).....	22
Tab. 3.4: Die EC ₅₀ beider Bipyridine (Endpunkt Glutathion).....	27
Tab. 3.5: Anteil intakter Zellen zur Gesamtzellzahl nach Bipyridin-Exposition (Endpunkt Trypanblau-Test).	29
Tab. 3.6: Die EC ₅₀ beider Bipyridine (Endpunkt Trypanblau-Test).	30
Tab. 3.7: Die EC ₅₀ beider Bipyridine <i>plus</i> Carbogen® (Endpunkt XTT-Test).	33
Tab. 3.8: Die EC ₅₀ beider Bipyridine <i>plus</i> Carbogen® (Endpunkt Glutathion).	33
Tab. 3.9: Anteil intakter Zellen an der Gesamtzellzahl nach Bipyridin-Exposition <i>plus</i> Carbogen® (Endpunkt Trypanblau-Test).	34
Tab. 3.10: Die EC ₅₀ beider Bipyridine <i>plus</i> Carbogen® (Endpunkt Trypanblau-Test).....	34
Tab. 3.11: Die EC ₅₀ beider Bipyridine nach anschließender Nachinkubation (24h) mit DMEM (Endpunkt XTT-Test).	35
Tab. 3.12: Die EC ₅₀ beider Bipyridine und anschließender Gabe von Antioxidantien in L929 Zellen (Endpunkt XTT-Test).....	37
Tab. 3.13: Die EC ₅₀ beider Bipyridine bei gleichzeitiger Gabe von Antioxidantien in L929 Zellen (Endpunkt XTT-Test).....	39

Einzelwerte zur Tabelle 3.1: Die EC₅₀ von DQ und NaBr (Endpunkt XTT-Test).

Zelllinie	EC ₅₀ DQ [mM]					EC ₅₀ DQ MW ± SD [mM]	EC ₅₀ NaBr [mM]		EC ₅₀ NaBr MW ± SD [mM]
A549	0,2535	3,2801	0,7191	1,0688		1,9 ± 1,4	9,1125		9,9 ± 0,7
	2,1915	3,2684	0,4556	1,3879			10,3659		
	3,5818	4,3850	0,9994				10,3302		
HepG2	0,2016		0,1594			0,1 ± 0,02	9,3347	8,1787	8,9 ± 0,6
	0,1594						9,4328		
L929	1,2382	0,1249	0,2507	0,6989	1,8127	0,8 ± 0,6	6,8907		7,4 ± 0,5
	0,6680	0,1846	0,2517	0,6689	1,6728		7,9793		
	0,2500	0,2368	0,2100	1,2132	1,4243		7,4435		
	0,9299	0,5398	0,1773	1,0187	1,1419				
	0,2024	2,0582	0,0887	1,0304	2,3871				
	0,2537	0,7821	0,7435	1,7407					

Einzelwerte zur Tabelle 3.2: Die EC₅₀ von NaBr, PQ *plus* NaBr und PQ in L929 Zellen (Endpunkt XTT-Test).

Zelllinie	EC ₅₀ PQ [mM]					EC ₅₀ PQ MW ± SD [mM]	EC ₅₀ PQ + NaBr [mM]	EC ₅₀ PQ + NaBr MW ± SD [mM]	EC ₅₀ NaBr [mM]	EC ₅₀ NaBr MW ± SD [mM]
L929	5,7394	0,8991	0,8162	3,0201	3,4728	2,5 ± 1,2	3,7903	4,1 ± 0,4	6,8907	7,4 ± 0,5
	2,0002	1,8583	1,3738	4,3555	2,9104		4,6363		7,9793	
	2,6474	0,9778	3,9436	4,0047	2,9797		3,8889		7,4435	
	1,5647	1,3809	2,1762	2,7531	3,0243					
	3,3115	0,6711	2,9626	3,1984						

Einzelwerte zur Tabelle 3.3: Die EC₅₀ beider Bipyridine in zeitlicher Abfolge (Endpunkt XTT-Test).

Zelllinie	Expositionszeit	EC ₅₀ DQ [mM]				EC ₅₀ DQ MW ± SD [mM]	EC ₅₀ PQ [mM]				EC ₅₀ PQ MW ± SD [mM]
A549	24h	0,2535	3,2801	0,7191	1,0688	1,9 ± 1,4	3,3031	4,5622	3,5493	4,4615	4,6 ± 1,3
		2,1915	3,2684	0,4556	1,3879		3,9437	7,6117			
		3,5818	4,3850	0,9994			4,5767	4,8377			
A549	48h	0,4914	2,4727	0,6896	0,4458	1,1 ± 0,9	1,9647	4,4579	2,8823	1,9854	2,7 ± 1,1
		2,4226	1,2092	0,2234			3,9091	2,9010	0,9799		
A549	72h	0,0841	0,1336	0,1807	0,1645	0,1 ± 0,05	0,4695	0,6242	0,5714	0,7371	0,6 ± 0,2
		0,2174	0,1446	0,0700			1,0840	0,6866	0,2418		
HepG2	24h	0,2016		0,1594		0,1 ± 0,02	0,2639		0,1412		0,1 ± 0,07
		0,1594					0,1414				
HepG2	48h	0,1089		0,3024		0,1 ± 0,1	0,2016		0,2036		0,1 ± 0,07
		0,0857					0,0732				
HepG2	72h	0,0704		0,0028		0,02 ± 0,03	0,1546		0,0035		0,05 ± 0,08
		0,0007					0,0039				
L929	24h	1,2382	0,2368	0,1773	1,0304	0,8 ± 0,6	5,7394	1,8583	2,7531	2,9626	2,5 ± 1,2
		0,6680	0,5398	0,0887	1,7407		2,6474	0,6711	2,9104	4,3555	
		0,2500	2,0582	0,7435	1,8127		1,5647	3,9436	0,8162	2,9797	
		0,9299	0,7821	0,6989	1,6728		3,3115	4,0047	1,3738	3,0201	
		0,2024	0,2507	0,6689	1,4243		0,8991	3,4728	1,3809	3,1984	
		0,2537	0,2517	1,2132	1,1419		2,0002	2,1762	0,9778	3,0243	
		0,1249	0,2100	1,0187	2,3871						
		0,1846									
L929	48h	0,4918		0,5836		0,4 ± 0,1	2,2630		2,4921		2,0 ± 0,5
		0,2030					1,3617				
L929	72h	0,2423		0,6433		0,2 ± 0,2	1,4387		1,4601		1,1 ± 0,5
		0,1326		0,0418			1,1808		0,3580		

Einzelwerte zur Tabelle 3.4: Die EC₅₀ beider Bipyridine (Endpunkt Glutathion).

Zelllinie	EC ₅₀ DQ [mM]		EC ₅₀ DQ MW ± SD [mM]	EC ₅₀ PQ [mM]		EC ₅₀ PQ MW ± SD [mM]
A549	0,1732	0,0379	0,08 ± 0,07	2,1138	0,8820	1,4 ± 0,6
	0,0488			1,2451		
HepG2	0,2595	0,1971	0,2 ± 0,04	0,6701	0,3512	0,4 ± 0,1
	0,1737			0,4728		
L929	0,0738	0,0648	0,06 ± 0,01	1,3449	0,8081	0,9 ± 0,3
	0,0462			0,5754		

Einzelwerte zur Tabelle 3.5: Anteil intakter Zellen (keine Farbstoffaufnahme) zur Gesamtzellzahl nach Bipyridin-Exposition (Endpunkt Trypanblau-Test).

Zelllinie	Bipyridin-Konzentration [mM]	Anteil ungefärbter Zellen zur Zellzahl DQ [%]			Anteil ungefärbter Zellen zur Zellzahl DQ MW [%]	Anteil ungefärbter Zellen zur Zellzahl PQ [%]			Anteil ungefärbter Zellen zur Zellzahl PQ MW [%]
A549	Kontrolle	91	84	83	86	91	84	83	86
A549	0,01	87	93	90	90	86	80	89	85
A549	0,03	83	90	91	88	85	89	90	88
A549	0,1	36	34	29	33	90	84	89	87
A549	0,3	2	0	4	2	84	90	93	89
A549	1	2	1	0	1	60	58	53	57
A549	3	0	0	0	0	8	18	22	16
HepG2	Kontrolle	92	85	84	87	92	85	84	87
HepG2	0,01	91	88	85	88	91	88	88	89
HepG2	0,03	95	91	87	91	86	89	92	89
HepG2	0,1	82	86	75	81	86	87	85	86
HepG2	0,3	4	2	12	6	84	91	86	87
HepG2	1	2	0	1	1	1	0	5	2
HepG2	3	0	0	0	0	0	0	0	0
L929	Kontrolle	91	95	90	92	91	95	90	92
L929	0,01	92	88	87	89	84	86	82	84
L929	0,03	91	90	86	89	80	87	85	84
L929	0,1	54	49	56	53	79	84	83	82
L929	0,3	8	17	14	13	85	79	82	82
L929	1	0	3	3	2	76	69	74	73
L929	3	0	0	0	0	15	4	11	10

Einzelwerte zur Tabelle 3.6: Die EC₅₀ beider Bipyridine (Endpunkt Trypanblau-Test).

Zelllinie	EC ₅₀ DQ [mM]		EC ₅₀ DQ MW ± SD [mM]	EC ₅₀ PQ [mM]		EC ₅₀ PQ MW ± SD [mM]
A549	0,0601 0,0649	0,0483	0,05 ± 0,008	0,2988 0,9791	0,4675	0,5 ± 0,3
HepG2	0,1343 0,1129	0,1584	0,1 ± 0,02	0,4044 0,7608	0,4456	0,5 ± 0,1
L929	0,0519 0,0704	0,0439	0,05 ± 0,01	1,1435 0,4013	2,4025	1,3 ± 1

Einzelwerte zur Tabelle 3.7: Die EC₅₀ beider Bipyridine *plus* Carbogen® (Endpunkt XTT-Test).

Zelllinie	EC ₅₀ DQ Carbogen® [mM]		EC ₅₀ DQ Carbogen® MW ± SD [mM]	EC ₅₀ PQ Carbogen® [mM]		EC ₅₀ PQ Carbogen® MW ± SD [mM]
A549	0,1237 0,0964	0,0503	0,09 ± 0,03	2,0569 1,6437	3,2050	2,3 ± 0,8
HepG2	0,1088 0,1242	0,1754	0,1 ± 0,03	0,2794 0,2834	0,2087	0,2 ± 0,04
L929	0,0544 0,0136	0,0539	0,04 ± 0,02	0,6309 0,0694	0,3811	0,3 ± 0,2

Einzelwerte zur Tabelle 3.8: Die EC₅₀ beider Bipyridine *plus* Carbogen® (Endpunkt Glutathion).

Zelllinie	EC ₅₀ DQ Carbogen® [mM]		EC ₅₀ DQ Carbogen® MW ± SD [mM]	EC ₅₀ PQ Carbogen® [mM]		EC ₅₀ PQ Carbogen® MW ± SD [mM]
A549	0,1877 0,1714	0,7385	0,3 ± 0,3	6,1365 5,1644	3,5532	4,9 ± 1,3
HepG2	0,0977 0,3383	0,7282	0,3 ± 0,3	0,2471 0,4779	0,8639	0,5 ± 0,3
L929	0,2937 0,0281	0,0835	0,1 ± 0,1	0,8819 0,5761	1,3216	0,9 ± 0,3

Einzelwerte zur Tabelle 3.9: Anteil intakter Zellen (keine Farbstoffaufnahme) an der Gesamtzellzahl nach Bipyridin-Exposition *plus* Carbogen® (Endpunkt Trypanblau-Test).

Zelllinie	Bipyridin-Konzentration [mM]	Anteil ungefärbter Zellen zur Zellzahl DQ <i>plus</i> Carbogen® [%]			Anteil ungefärbter Zellen zur Zellzahl DQ <i>plus</i> Carbogen® MW [%]			Anteil ungefärbter Zellen zur Zellzahl PQ <i>plus</i> Carbogen® [%]			Anteil ungefärbter Zellen zur Zellzahl PQ <i>plus</i> Carbogen® MW [%]		
A549	Kontrolle	88	90	89	89	88	90	89	89	88	90	89	
A549	0,01	88	88	91	89	87	92	88	89	87	92	88	
A549	0,03	72	74	79	75	91	90	86	89	91	90	86	
A549	0,1	51	48	54	51	84	85	89	86	84	85	89	
A549	0,3	2	5	2	3	70	68	75	71	70	68	75	
A549	1	0	0	0	0	49	40	43	44	49	40	43	
A549	3	0	0	0	0	9	7	14	10	9	7	14	
HepG2	Kontrolle	80	76	81	79	80	76	81	79	80	76	81	
HepG2	0,01	87	88	92	89	84	79	86	83	84	79	86	
HepG2	0,03	86	85	87	86	86	81	82	83	86	81	82	
HepG2	0,1	82	80	84	82	89	85	87	87	89	85	87	
HepG2	0,3	0	0	0	0	84	86	79	83	84	86	79	
HepG2	1	0	0	0	0	0	2	1	1	0	2	1	
HepG2	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
L929	Kontrolle	85	93	86	88	85	93	86	88	85	93	86	
L929	0,01	86	91	84	87	87	90	90	89	87	90	90	
L929	0,03	87	85	89	87	87	80	85	84	87	80	85	
L929	0,1	14	21	16	17	80	80	83	81	80	80	83	
L929	0,3	12	17	13	14	82	87	89	86	82	87	89	
L929	1	0	0	0	0	27	28	32	29	27	28	32	
L929	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

Einzelwerte zur Tabelle 3.10: Die EC₅₀ beider Bipyridine *plus* Carbogen® (Endpunkt Trypanblau-Test).

Zelllinie	EC ₅₀ DQ Carbogen® [mM]		EC ₅₀ DQ Carbogen® MW ± SD [mM]	EC ₅₀ PQ Carbogen® [mM]		EC ₅₀ PQ Carbogen® MW ± SD [mM]
A549	0,0785 0,0916	0,1253	0,09 ± 0,02	0,8890 0,5004	0,6776	0,5 ± 0,3
HepG2	0,1102 0,1149	0,1183	0,1 ± 0,004	0,7619 0,7598	0,6159	0,7 ± 0,08
L929	0,0512 0,0545	0,0248	0,04 ± 0,01	0,4430 0,6874	0,7076	0,6 ± 0,1

Einzelwerte zur Tabelle 3.11: Die EC₅₀ beider Bipyridine nach anschließender Nachinkubation (24h) mit DMEM (Endpunkt XTT-Test).

Zelllinie	EC ₅₀ DQ nach 24h Erholung [mM]		EC ₅₀ DQ nach 24h Erholung MW ± SD [mM]	EC ₅₀ PQ nach 24h Erholung [mM]		EC ₅₀ PQ nach 24h Erholung MW ± SD [mM]
A549	2,8708 1,7755 3,1480	0,9317 0,4600	1,8 ± 1,1	5,7495 6,3016 4,6955	3,7780 2,3073	4,5 ± 1,5
HepG2	0,1478 0,1531	0,4008	0,2 ± 0,1	0,2110 0,0935	0,1773	0,1 ± 0,06
L929	0,4586 0,1722 0,4094	0,0468 0,0392	0,2 ± 0,1	1,8842 0,9278 2,1138	0,3619 0,4501	1,1 ± 0,8

Einzelwerte zur Tabelle 3.12: Die EC₅₀ beider Bipyridine und anschließender Gabe von Antioxidantien in L929 Zellen (Endpunkt XTT-Test).

Antioxidans	EC ₅₀ DQ + Antioxidans [mM]		EC ₅₀ DQ + Antioxidans MW ± SD [mM]	EC ₅₀ PQ + Antioxidans [mM]		EC ₅₀ PQ + Antioxidans MW ± SD [mM]
DMSO	2,0973 0,6184 0,2599	0,2989 0,5730 0,7194	0,7 ± 0,6	3,7408 2,0397 1,9222	1,5251 0,5755 2,8971	2,1 ± 1
NAC	0,3663 0,0966 0,5030	0,3051 0,3386	0,3 ± 0,1	3,5358 1,7772 0,9791	2,6946 2,5478 2,6988	2,3 ± 0,8
DMSO + NAC	0,1589 0,3292	0,5829 0,8852	0,4 ± 0,3	0,9868 2,1093	2,0228 1,7257	1,7 ± 0,5

Einzelwerte zur Tabelle 3.13: Die EC₅₀ beider Bipyridine bei gleichzeitiger Gabe von Antioxidantien in L929 Zellen (Endpunkt XTT-Test).

Antioxidans	EC ₅₀ DQ + Antioxidans [mM]		EC ₅₀ DQ + Antioxidans MW ± SD [mM]	EC ₅₀ PQ + Antioxidans [mM]		EC ₅₀ PQ + Antioxidans MW ± SD [mM]
DMSO	2,2603 0,2588 0,8675	1,5282 2,0202	1,3 ± 0,8	4,3637 3,8506 1,5085	3,0383 3,1155	3,1 ± 1
NAC	2,6359 0,0953 1,5765	1,6107 1,1335	1,4 ± 0,9	1,3675 3,6388 3,7576 0,7564	0,9660 3,7001 3,2538 3,4597	2,6 ± 1,3
DMSO + NAC	2,1137 0,1580 1,8910	1,7617 1,0582	1,3 ± 0,7	4,1546 3,7593 1,0060 0,9802	2,1512 3,1092 5,7272	2,9 ± 1,7

Literaturverzeichnis

1. Dinis-Oliveira RJ, Duarte JA, Sanchez-Navarro A, Remiao F, Bastos ML, Carvalho F. **Paraquat poisonings: mechanisms of lung toxicity, clinical features, and treatment.** *Crit Rev Toxicol* 2008, 38(1):13-71.
2. Jones GM, Vale JA. **Mechanisms of toxicity, clinical features, and management of diquat poisoning: a review.** *J Toxicol Clin Toxicol* 2000, 38(2):123-128.
3. Saeed SA, Wilks MF, Coupe M. **Acute diquat poisoning with intracerebral bleeding.** *Postgrad Med J* 2001, 77(907):329-332.
4. Baltazar T, Dinis-Oliveira RJ, Duarte JA, Bastos MD, Carvalho F. **Paraquat research: do recent advances in limiting its toxicity make its use safer?** *Brit J Pharmacol* 2013, 168(1):44-45.
5. Hutchinson G, Daisley H, Simeon D, Simmonds V, Shetty M, Lynn D. **High rates of paraquat-induced suicide in southern Trinidad.** *Suicide Life-Threat* 1999, 29(2):186-191.
6. Seok SJ, Gil HW, Jeong DS, Yang JO, Lee EY, Hong SY. **Paraquat intoxication in subjects who attempt suicide: why they chose paraquat.** *Korean J Intern Med* 2009, 24(3):247-251.
7. Gu JY, Mo W, Li Q, Tang XM. **Analysis of clinical manifestations and prognosis of 68 cases of children with acute paraquat intoxication.** *Pediatr Nephrol* 2013, 28(8):1673-1674.
8. Hsieh YW, Lin JL, Lee SY, Weng CH, Yang HY, Liu SH, Wang IK, Liang CC, Chang CT, Yen TH. **Paraquat Poisoning in Pediatric Patients.** *Pediatr Emerg Care* 2013, 29(4):487-491.
9. Powell D, Pond SM, Allen TB, Portale AA. **Hemoperfusion in a child who ingested diquat and died from pontine infarction and hemorrhage.** *J Toxicol Clin Toxicol* 1983, 20(5):405-420.
10. Vázquez C: **Syngenta's paraquat up for global review** In: *PESTICIDE ACTION NETWORK ASIA AND THE PACIFIC (PANAP)*. vol. 2015; 2013.
11. Macler B: **Drinking Water Standards and Health Advisories Table.** In. Edited by Agency USEP. San Francisco; 2009.
12. Wesseling C, Ahlbom A, Antich D, Rodriguez AC, Castro R. **Cancer in banana plantation workers in Costa Rica.** *Int J Epidemiol* 1996, 25(6):1125-1131.
13. Lee PC, Bordelon Y, Bronstein J, Ritz B. **Traumatic brain injury, paraquat exposure, and their relationship to Parkinson disease.** *Neurology* 2012, 79(20):2061-2066.
14. Dodge AD, Harris N. **The mode of action of paraquat and diquat.** *Biochem J* 1970, 118(3):43P-44P.
15. Rawlings JM, Wyatt I, Heylings JR. **Evidence for redox cycling of diquat in rat small intestine.** *Biochem Pharmacol* 1994, 47(7):1271-1274.
16. Adam A, Smith LL, Cohen GM. **An assessment of the role of redox cycling in mediating the toxicity of paraquat and nitrofurantoin.** *Environ Health Perspect* 1990, 85:113-117.
17. Gawarammana IB, Buckley NA. **Medical management of paraquat ingestion.** *Brit J Clin Pharmacol* 2011, 72(5):745-757.
18. Kehrer JP. **The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity.** *Toxicology* 2000, 149(1):43-50.
19. Ahmad I, Kumar A, Shukla S, Prasad Pandey H, Singh C. **The involvement of nitric oxide in maneb- and paraquat-induced oxidative stress in rat polymorphonuclear leukocytes.** *Free Radic Res* 2008, 42(10):849-862.

20. Moran JM, Ortiz-Ortiz MA, Ruiz-Mesa LM, Fuentes JM. **Nitric oxide in paraquat-mediated toxicity: A review.** *J Biochem Mol Toxicol* 2010, 24(6):402-409.
21. Keeling PL, Smith LL. **Relevance of NADPH depletion and mixed disulphide formation in rat lung to the mechanism of cell damage following paraquat administration.** *Biochem Pharmacol* 1982, 31(20):3243-3249.
22. Bus JS, Aust SD, Gibson JE. **Paraquat toxicity: proposed mechanism of action involving lipid peroxidation.** *Environ Health Perspect* 1976, 16:139-146.
23. Yamada K, Fukushima T. **Mechanism of cytotoxicity of paraquat. II. Organ specificity of paraquat-stimulated lipid peroxidation in the inner membrane of mitochondria.** *Exp Toxicol Pathol* 1993, 45(5-6):375-380.
24. Schoonbroodt S, Piette J. **Oxidative stress interference with the nuclear factor-kappa B activation pathways.** *Biochem Pharmacol* 2000, 60(8):1075-1083.
25. Tanen DA, Curry SC, Laney RF. **Renal failure and corrosive airway and gastrointestinal injury after ingestion of diluted diquat solution.** *Ann Emerg Med* 1999, 34(4 Pt 1):542-545.
26. Vale JA, Meredith TJ, Buckley BM. **Paraquat poisoning: clinical features and immediate general management.** *Hum Toxicol* 1987, 6(1):41-47.
27. Schmidt DM, Neale J, Olson KR. **Clinical course of a fatal ingestion of diquat.** *J Toxicol Clin Toxicol* 1999, 37(7):881-884.
28. Botella R, Sastre A, Castells A. **Contact dermatitis to paraquat.** *Contact dermatitis* 1985, 13(2):123-124.
29. Manoguerra AS. **Full thickness skin burns secondary to an unusual exposure to diquat dibromide.** *J Toxicol Clin Toxicol* 1990, 28(1):107-110.
30. Kibby T, Ring DS. **Nail injury and diquat exposure: forgotten but not gone.** *Dermatitis* 2012, 23(4):176-178.
31. Clark DG, Hurst EW. **The toxicity of diquat.** *Br J Ind Med* 1970, 27(1):51-55.
32. Cant JS, Lewis DR. **Ocular damage due to paraquat and diquat.** *Br Med J* 1968, 3(5609):59.
33. McKeag D, Maini R, Taylor HR. **The ocular surface toxicity of paraquat.** *Br J Ophthalmol* 2002, 86(3):350-351.
34. McCarthy LG, Speth CP. **Diquat intoxication.** *Ann Emerg Med* 1983, 12(6):394-396.
35. Rudez J, Sepcic K, Sepcic J. **Vaginally applied diquat intoxication.** *J Toxicol Clin Toxicol* 1999, 37(7):877-879.
36. Bianchi M, Fantuzzi G, Bertini R, Perin L, Salmona M, Ghezzi P. **The pneumotoxicant paraquat induces IL-8 mRNA in human mononuclear cells and pulmonary epithelial cells.** *Cytokine* 1993, 5(5):525-530.
37. Smith P, Heath D. **The pathology of the lung in paraquat poisoning.** *J Clin Pathol Suppl (R Coll Pathol)* 1975, 9:81-93.
38. Smith P, Heath D, Kay JM. **The pathogenesis and structure of paraquat-induced pulmonary fibrosis in rats.** *J Pathol* 1974, 114(2):57-67.
39. Izumi Y, Ezumi M, Takada-Takatori Y, Akaike A, Kume T. **Endogenous dopamine is involved in the herbicide paraquat-induced dopaminergic cell death.** *Toxicol Sci* 2014, 139(2):466-478.
40. Karuppagounder SS, Ahuja M, Buabeid M, Parameshwaran K, Abdel-Rehman E, Suppiramaniam V, Dhanasekaran M. **Investigate the chronic neurotoxic effects of diquat.** *Neurochem Res* 2012, 37(5):1102-1111.
41. Roberts DM, Wilks MF, Roberts MS, Swaminathan R, Mohamed F, Dawson AH, Buckley NA. **Changes in the concentrations of creatinine, cystatin C and NGAL in patients with acute paraquat self-poisoning.** *Toxicol Lett* 2011, 202(1):69-74.
42. Im JG, Lee KS, Han MC, Kim SJ, Kim IO. **Paraquat Poisoning - Findings on Chest Radiography and Ct in 42 Patients.** *Am J Roentgenol* 1991, 157(4):697-701.

43. Dinis-Oliveira RJ, Duarte JA, Remiao F, Sanchez-Navarro A, Bastos ML, Carvalho F. **Single high dose dexamethasone treatment decreases the pathological score and increases the survival rate of paraquat-intoxicated rats.** *Toxicology* 2006, 227(1-2):73-85.
44. Afzali S, Gholyaf M. **The effectiveness of combined treatment with methylprednisolone and cyclophosphamide in oral paraquat poisoning.** *Arch Iran Med* 2008, 11(4):387-391.
45. Li LR, Sydenham E, Chaudhary B, Beecher D, You C. **Glucocorticoid with cyclophosphamide for paraquat-induced lung fibrosis.** *Cochrane Database Syst Rev* 2014, 8:CD008084.
46. Lin JL, Lin-Tan DT, Chen KH, Huang WH. **Repeated pulse of methylprednisolone and cyclophosphamide with continuous dexamethasone therapy for patients with severe paraquat poisoning.** *Crit Care Med* 2006, 34(2):368-373.
47. Petry TW, Wolfgang GH, Jolly RA, Ochoa R, Donarski WJ. **Antioxidant-dependent inhibition of diquat-induced toxicity in vivo.** *Toxicology* 1992, 74(1):33-43.
48. Hong SY, Hwang KY, Lee EY, Eun SW, Cho SR, Han CS, Park YH, Chang SK. **Effect of vitamin C on plasma total antioxidant status in patients with paraquat intoxication.** *Toxicol Lett* 2002, 126(1):51-59.
49. Colucci M, Maione F, Bonito MC, Piscopo A, Di Giannuario A, Pieretti S. **New insights of dimethyl sulphoxide effects (DMSO) on experimental in vivo models of nociception and inflammation.** *Pharmacol Res* 2008, 57(6):419-425.
50. Da Violante G, Zerrouk N, Richard I, Provot G, Chaumeil JC, Arnaud P. **Evaluation of the cytotoxicity effect of dimethyl sulfoxide (DMSO) on Caco2/TC7 colon tumor cell cultures.** *Biol Pharm Bull* 2002, 25(12):1600-1603.
51. Mitsopoulos P, Suntres ZE. **Protective Effects of Liposomal N-Acetylcysteine against Paraquat-Induced Cytotoxicity and Gene Expression.** *J Toxicol* 2011, 2011:808967.
52. Dodd S, Dean O, Copolov DL, Malhi GS, Berk M. **N-acetylcysteine for antioxidant therapy: pharmacology and clinical utility.** *Expert Opin Biol Th* 2008, 8(12):1955-1962.
53. Suntres ZE, Shek PN. **Liposomal alpha-tocopherol alleviates the progression of paraquat-induced lung damage.** *J Drug Target* 1995, 2(6):493-500.
54. Tietze F. **Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues.** *Anal Biochem* 1969, 27(3):502-522.
55. Eyer P, Worek F, Kiderlen D, Sinko G, Stuglin A, Simeon-Rudolf V, Reiner E. **Molar absorption coefficients for the reduced Ellman reagent: reassessment.** *Anal Biochem* 2003, 312(2):224-227.
56. Olson WH, Cumming RB. **Chemical Mutagens - Dosimetry, Habers Rule and Linear-Systems.** *J Theor Biol* 1981, 91(3):383-395.
57. Jin CY, Zhu BS, Wang XF, Lu QH. **Cytotoxicity of titanium dioxide nanoparticles in mouse fibroblast cells.** *Chem Res Toxicol* 2008, 21(9):1871-1877.
58. Malaekheh-Nikouei B, Mousavi SH, Shahsavand S, Mehri S, Nassirli H, Moallem SA. **Assessment of cytotoxic properties of safranal and nanoliposomal safranal in various cancer cell lines.** *Phytother Res* 2013, 27(12):1868-1873.
59. Aquilano K, Baldelli S, Ciriolo MR. **Glutathione: new roles in redox signaling for an old antioxidant.** *Front Pharmacol* 2014, 5:196.
60. O'Brien KA, Smith LL, Cohen GM. **Inability of a human lung tumour cell line (A549) to detect chemically induced organ-specific toxicity to the lung.** *Toxicol In Vitro* 1987, 1(2):85-90.

61. Kim H, Lee SW, Baek KM, Park JS, Min JH. **Continuous hypoxia attenuates paraquat-induced cytotoxicity in the human A549 lung carcinoma cell line.** *Exp Mol Med* 2011, 43(9):494-500.
62. Mitsopoulos P, Suntres ZE. **Cytotoxicity and gene array analysis of alveolar epithelial A549 cells exposed to paraquat.** *Chem Biol Interact* 2010, 188(3):427-436.
63. Gan L, von Moltke LL, Trepanier LA, Harmatz JS, Greenblatt DJ, Court MH. **Role of NADPH-cytochrome P450 reductase and cytochrome-b5/NADH-b5 reductase in variability of CYP3A activity in human liver microsomes.** *Drug Metab Dispos* 2009, 37(1):90-96.
64. Styles JA. **Studies on the effects of paraquat and diquat on cells in culture. Viability of macrophages and fibroblasts incubated with paraquat and diquat.** *Br J Exp Pathol* 1974, 55(1):71-77.
65. Kurisaki E, Nagamori H. **A comparative study on the effects of paraquat and diquat on cultured human cells.** *J Toxicol Sci* 1981, 6(3):203-207.
66. Perla V, Perrin NA, Greenlee AR. **Paraquat toxicity in a mouse embryonic stem cell model.** *Toxicol In Vitro* 2008, 22(2):515-524.
67. Slaughter MR, Thakkar H, O'Brien PJ. **Effect of diquat on the antioxidant system and cell growth in human neuroblastoma cells.** *Toxicol Appl Pharmacol* 2002, 178(2):63-70.
68. Manabe J, Ogata T. **Lung fibrosis induced by diquat after intratracheal administration.** *Arch Toxicol* 1987, 60(6):427-431.
69. Seiler N, Delcros JG, Moulinoux JP. **Polyamine transport in mammalian cells. An update.** *Int J Biochem Cell Biol* 1996, 28(8):843-861.
70. Cullis PM, Green RE, Merson-Davies L, Travis N. **Probing the mechanism of transport and compartmentalisation of polyamines in mammalian cells.** *Chem Biol* 1999, 6(10):717-729.
71. Nasrallah GK, Riveroll AL, Chong A, Murray LE, Lewis PJ, Garduno RA. **Legionella pneumophila requires polyamines for optimal intracellular growth.** *J Bacteriol* 2011, 193(17):4346-4360.
72. Xie SQ, Li Q, Zhang YH, Wang JH, Mei ZH, Zhao J, Wang CJ. **NPC-16, a novel naphthalimide-polyamine conjugate, induced apoptosis and autophagy in human hepatoma HepG2 cells and Bel-7402 cells.** *Apoptosis* 2011, 16(1):27-34.
73. Miller FJ, Schlosser PM, Janszen DB. **Haber's rule: a special case in a family of curves relating concentration and duration of exposure to a fixed level of response for a given endpoint.** *Toxicology* 2000, 149(1):21-34.
74. Kehrer JP, Haschek WM, Witschi H. **The influence of hyperoxia on the acute toxicity of paraquat and diquat.** *Drug Chem Toxicol* 1979, 2(4):397-408.
75. Thomson L, Paton J. **Oxygen toxicity.** *Paediatr Respir Rev* 2014, 15(2):120-123.
76. Auten RL, Davis JM. **Oxygen toxicity and reactive oxygen species: the devil is in the details.** *Pediatr Res* 2009, 66(2):121-127.
77. Keeling PL, Pratt IS, Aldridge WN, Smith LL. **The enhancement of paraquat toxicity in rats by 85% oxygen: lethality and cell-specific lung damage.** *Br J Exp Pathol* 1981, 62(6):643-654.
78. Malekinejad H, Khoramjouy M, Hobbenaghi R, Amniattalab A. **Atorvastatin attenuates the paraquat-induced pulmonary inflammation via PPARgamma receptors: A new indication for atorvastatin.** *Pestic Biochem Physiol* 2014, 114C:79-89.
79. Zhi Q, Sun H, Qian X, Yang L. **Edaravone, a novel antidote against lung injury and pulmonary fibrosis induced by paraquat?** *Int Immunopharmacol* 2011, 11(1):96-102.

80. Panganamala RV, Sharma HM, Heikkila RE, Geer JC, Cornwell DG. **Role of Hydroxyl Radical Scavengers Dimethyl-Sulfoxide, Alcohols and Methional in Inhibition of Prostaglandin Biosynthesis.** *Prostaglandins* 1976, 11(4):599-607.
81. Marin RE. **Evaluation of dimethyl sulfoxide therapy in chronic respiratory insufficiency of bronchopulmonary origin.** *Ann N Y Acad Sci* 1975, 243:475-484.
82. Hoffer E, Baum Y, Tabak A, Taitelman U. **N-acetylcysteine increases the glutathione content and protects rat alveolar type II cells against paraquat-induced cytotoxicity.** *Toxicol Lett* 1996, 84(1):7-12.
83. Yeh ST, Guo HR, Su YS, Lin HJ, Hou CC, Chen HM, Chang MC, Wang YJ. **Protective effects of N-acetylcysteine treatment post acute paraquat intoxication in rats and in human lung epithelial cells.** *Toxicology* 2006, 223(3):181-190.

Eidesstattliche Versicherung

Juretschke, Christian

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Vergleich der Zytotoxizität der Bipyridine Diquat und Paraquat in-vitro

selbstständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Ort, Datum

Unterschrift Doktorand

Danksagung

Am Ende meiner Promotionsarbeit möchte ich an erster Stelle meinen Eltern Carolina und Reinhold Juretschke danken. Für die Unterstützung über den gesamten Zeitraum und emotionalen Halt bin ich unendlich dankbar. Ohne ihre Hilfe wäre die Promotion niemals möglich gewesen.

Herrn Prof. Dr. med. Thomas Gudermann danke ich für die Möglichkeit am Walther-Straub-Institut diese Dissertation durchführen zu dürfen. Ebenso bedanke ich mich für die Möglichkeit der Vorstellung meiner Arbeit auf der Tagung der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie e.V. in Hannover 2014.

Herrn Privatdozent Dr. med. Dr. rer. nat. Harald Mückter danke ich für die Überlassung des Themas und seine intensive Betreuung und Unterstützung bei dem theoretischen und praktischen Arbeiten. In besonderer Erinnerung werden die außergewöhnlichen Seminare unserer Arbeitsgruppe in München-Perlach, Kaltenberg und Andechs bleiben.

Ein besonderer Dank gilt Christine Hopper für die geduldige Einarbeitung in die „Geheimnisse“ der Laborarbeit, ihre tatkräftige Unterstützung bei den praktischen Arbeiten im Labor und für die schöne und angenehme kollegiale Zusammenarbeit über den gesamten Zeitraum.

Meinen beiden Kollegen Elias Bekka und Johannes Meyer möchte ich für die wundervolle und bereichernde Zeit im Labor danken. Aus Kollegen sind Freunde geworden und nicht nur die Stunden im Fokus der Forschung, auch die vielen Stunden im Privaten sind wertvolle Erinnerungen für mich.

Zum Schluss möchte ich mich bei Kathrin von der Brelie, die mich auf den letzten Metern der Arbeit begleitet hat, bedanken. Die gesamte Mühe, die konstruktive Kritik und ihre motivierenden Worte auf der Zielgeraden der Arbeit waren sehr wertvoll für mich.

Ohne die Unterstützung aller Genannten und das Umfeld der Doktoranden und Mitarbeiter der Nussbaumstraße 26 wäre diese Arbeit in dieser Form nie entstanden.