

Aus dem Walther-Straub-Institut für Pharmakologie und Toxikologie

der Ludwig-Maximilians-Universität München

ehem. komm. Vorstand: Prof. Dr. med. Peter Eyer

jetziger komm. Vorstand: Prof. Dr. med. E. Richter

**Einfluss von N-Acetylcystein auf die Toxizität von Zink
in mit Hydrocortison vorbehandelten
Typ 2 Alveolarepithelzelllinien**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Olga Temrück

aus Bischkek, Kirgizistan

2007

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. med. Udo I. Walther

Mitberichtserstatter: Prof. Dr. med. L. von Meyer
Prof. Dr. med. Th. Nicolai

Dekan: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 06.12.2007

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	III
Abkürzungen.....	V
1. Einleitung.....	1
1.1 Zink.....	1
1.1.1 Zink im menschlichen Körper.....	1
1.1.2 Aufnahme und Elimination von Zink.....	2
1.1.3 Aufnahme und Verteilung von Zink in Zellen.....	3
1.1.4 Funktionen von Zink im menschlichen Körper.....	3
1.1.5 Zinkmangel.....	5
1.1.6 Toxikologische Relevanz von Zink.....	6
1.1.7 Orale Zinktoxizität.....	6
1.1.8 Inhalative Zinktoxizität.....	7
1.2 ARDS.....	9
1.2.1 Definition und Pathophysiologie des akuten Lungenversagen (ARDS/ALI).....	9
1.2.2 Therapie des ARDS.....	11
1.2.3 Glukokortikoide bei der Therapie des ARDS.....	11
1.3 Glutathion.....	13
1.3.1 Glutathiondepletion unter Glukokortikoiden.....	13
1.3.2 Glutathiondepletion unter Zinkbelastung.....	14
1.3.3 Steigerung der Glutathionsynthese.....	15
1.4 N-Acetylcystein.....	16
1.4.1 N-Acetylcystein als Glutathiondonator.....	16
1.4.2 Studien zur Behandlung mit N-Acetylcystein.....	17
2. Fragestellung.....	19
3. Materialien und Methoden.....	20
3.1 Geräte.....	20
3.2 Chemikalien und Reagenzien.....	20
3.3 Puffer- und Reagenzlösungen.....	21
3.4 Zellkulturartikel.....	21
3.5 Zellen.....	22
3.5.1 L2 Zellen.....	22
3.5.2 A549 Zellen.....	22
3.6 Methoden.....	23
3.6.1 Zellkultur.....	23
3.6.2 Vorbehandlung der Zellen mit Hydrocortison und N-Acetylcystein.....	23
3.6.3 Inkubation der Zellen mit N-Acetylcystein und N-Acetyl-D-cystein.....	24
3.6.4 Inkubation der Zellen mit Zinkchlorid.....	24
3.6.5 Bestimmung der Methionineinbauraten.....	24
3.6.6 Bestimmung des Glutathiongehaltes.....	26
3.6.7 Bestimmung der Glutathionreduktase - Aktivität.....	27
3.6.8 Proteinbestimmung.....	27
3.6.9 Statistik.....	28
4. Ergebnisse.....	29
4.1 Einfluss einer Vorbehandlung mit Hydrocortison.....	30

4.1.1	Einfluss einer Vorbehandlung mit Hydrocortison auf den zellulären Proteingehalt.....	30
4.1.2	Einfluss einer Vorbehandlung mit Hydrocortison auf die zelluläre Aktivität der Glutathionreduktase	32
4.1.3	Einfluss einer Vorbehandlung mit Hydrocortison auf die zink-bedingte Glutathiondepletion.....	33
4.1.4	Einfluss einer Vorbehandlung mit Hydrocortison auf den zink-bedingten Anstieg des GSSG/GSH Verhältnisses.....	35
4.1.5	Einfluss einer Vorbehandlung mit Hydrocortison auf die zinkbedingte Proteinsynthesehemmung.....	37
4.2	Einfluss einer Vorbehandlung mit N-Acetylcystein	39
4.2.1	Einfluss einer Vorbehandlung mit N-Acetylcystein auf zellulären Glutathiongehalt und Glutathionreduktase-Aktivität.....	39
4.2.2	Einfluss der Vorbehandlung mit N-Acetylcystein auf die zink-bedingte Glutathiondepletion, GSSG/GSH Verhältnis und Proteinsynthesehemmung.....	40
4.3	Einfluss einer simultanen Inkubation mit N-Acetylcystein auf die Zinktoxizität in Medien mit unterschiedlichem Cysteingehalt.....	42
4.3.1	Einfluss einer simultanen Inkubation mit N-Acetylcystein auf den zellulären Glutathiongehalt	42
4.3.2	Einfluss einer simultanen Inkubation mit N-Acetylcystein auf die zink-bedingte Glutathiondepletion.....	44
4.3.3	Einfluss einer simultanen Inkubation mit N-Acetylcystein auf den zink-bedingten Anstieg des GSSG/GSH Verhältnisses	47
4.3.4	Einfluss einer simultanen Inkubation mit N-Acetylcystein auf die zink-bedingte Proteinsynthesehemmung.....	49
5.	Diskussion	52
5.1	Bedeutung der Glukokortikoide für die zelluläre Zinkaufnahme	53
5.2	Unterschiede im Glutathionstoffwechsel und in der Zinkempfindlichkeit der verwendeten Zelllinien.....	53
5.3	Parameter zur Erfassung der Zinktoxizität.....	54
5.4	Beeinflussung der Zinktoxizität und der Hydrocortisonwirkung in Alveolarepithelzellen durch N-Acetylcystein	56
5.5	Abschließende Beurteilung und Limitationen.....	59
6.	Zusammenfassung.....	61
7.	Literaturnachweis	63
8.	Danksagung.....	73
9.	Lebenslauf.....	74

Abkürzungen

ALI	acute lung injury
ARDS	acute respiratory distress syndrome, Schocklungensyndrom
BAL	Bronchoalveolarlavage
DTNB	5,5-Dithio-bis(2-nitrobenzoesäure)
EC ₅₀	halbeffektive Konzentration
ELF	epithelial lining fluid, Alveolen auskleidender Schutzfilm
FiO ₂	Fraction of inspired oxygen, Sauerstoffanteil in der Inspirationsluft
GR	Glutathionreduktase
GSH	gesamtes Glutathion
GSSG	oxidiertes Glutathion, Glutathiondisulfid
HC	Hydrocortison
K	Kontrolle
MEM	minimum essential medium
NAC	N-Acetylcystein, N-Acetyl-L-cystein
NADC	N-Acetyl-D-cystein
paO ₂	arterieller Sauerstoffpartialdruck
PEEP	positive endexpiratorischer Beatmungsdruck
SD	Standardabweichung
ZIP	Zink Eisen reguliertes Protein, zinkspezifischer Transporter/Importer

1. Einleitung

1.1 Zink

1.1.1 Zink im menschlichen Körper

Zink ist für die meisten Lebewesen ein essentielles und im menschlichen Körper nach Eisen, das zweithäufigste Spurenelement ¹¹⁷. Die Funktionen, die Zink im Körper erfüllt sind mannigfaltig und meist von lebensnotwendiger Bedeutung. So sind bis heute über 300 zinkhaltige Enzyme in der Biosphäre nachgewiesen worden, die sich in allen Enzymklassen finden ¹¹¹.

Bei dem proteingebundenen Zink unterscheidet man grundlegend zwischen funktionellen und strukturgebenden Zinkionen ⁸⁸.

Das funktionelle Zinkion befindet sich zumeist im katalytischen Zentrum eines Enzyms und bindet an das Substratmolekül während der katalysierten Reaktion. Als katalytische Komponente ist Zink durch vier Liganden, meist Histidin, Cystein, Asparaginsäure oder Glutaminsäure und ein Wassermolekül im aktiven Zentrum des Enzyms lokalisiert, so dass Zink direkt an der Substratumsetzung teilhaben kann ¹¹⁷. Als Beispiel ist Zink für die Funktion solcher Metalloenzyme wichtig, wie Oxydoreduktasen, Hydrolasen und Enzymen der Lyasefamilie. Zusätzlich werden aktivitätsmodulierende, so genannte coaktive Zinkionen in Enzymen mit mindestens zwei Metallen beschrieben ¹¹⁷. Zum Beispiel hat Zink gemeinsam mit Kupfer eine aktivierende Funktion in den Enzymen Superoxiddismutase und Phospholipase C ¹¹¹.

Das strukturelle Zinkion hat dagegen die Aufgabe, durch Bindung an bestimmte Aminosäureseitenketten des Proteins dessen aktive Tertiärstruktur zu stabilisieren, wie beispielsweise im Falle der Alkoholdehydrogenase oder in einer ganzen Reihe von Nicht-Enzym-Proteinen wie den DNA-Struktur stabilisierenden Histonen. Als Bestandteil der Transkriptionsfaktoren stellt Zink einen wichtigen Faktor für eine erfolgreiche Genexpression dar. Die durch das Zink bedingte strukturelle Anordnung dieser Transkriptionsfaktoren führte zu dem Begriff "zinc-finger".

Zink wird in den meisten Geweben des menschlichen Körpers gefunden. Die höchsten Konzentrationen sind in Prostata, Muskel, Knochen und Haut, des weiteren in Leber, Pankreas, Gehirn und Augen enthalten ¹¹¹.

Vom gesamten Zink im menschlichen Organismus liegen etwa 99 % intrazellulär, etwa 1 % extrazellulär und nur 0,1 % im Plasma vor ^{111,117}. Das Plasma eines Erwachsenen enthält insgesamt etwa 3,5 mg Zink, entsprechend einer Konzentration von 15 µmol/l Zink. Vom Gesamtzink im Plasma sind etwa 2/3 an Albumin und etwa 1/3 an α-Makroglobulin und andere Aminosäuren wie Cystein und Histidin gebunden. Das an Albumin gebundene Zink stellt einen metabolisch aktiven Pool dar, wobei Zink aus diesem Komplex am leichtesten an das Gewebe abgegeben werden kann.

1.1.2 Aufnahme und Elimination von Zink

Die Aufnahme von Zink erfolgt größtenteils im Jejunum und unterliegt einer gut regulierten Homöostase, so dass eine Akkumulation nach chronisch erhöhtem oralem Zinkangebot nicht bekannt ist, aber auch ein Zinkmangel nur nach länger dauernder Zinkrestriktion zu befürchten ist.

Die gastrointestinale Bioverfügbarkeit des Zinks hängt in erster Linie von der Nahrungszusammensetzung ab. Unter normalen physiologischen Bedingungen werden etwa 20-30 % vom in der Nahrung angebotenen Zink aufgenommen.

Die Resorptionsmechanismen aus dem Magendarmtrakt sind noch nicht vollständig geklärt. Hauptverantwortlich dafür scheinen Metallothionein sowie andere nicht-zinkspezifische Liganden zu sein ^{71,111}. So wird die Resorption von Zink durch eine Vielzahl organischer Verbindungen, wie Glutathion, Methionin, Histidin, Cystein, Citrat und Glutamat, sowie Prostaglandin E2 gefördert.

Ein hoher Gehalt an Phytinsäure, einer pflanzlichen Speicherform für Phosphor und Inositol dagegen vermindert die Resorption. Durch einen hohen Kalziumanteil in der Nahrung wird der resorptionsvermindernde Effekt der Phytinsäure zusätzlich verstärkt. Es bilden sich besonders schwer lösliche Zink-Kalzium-Phytat-Komplexe. Außerdem können Kadmium, Kupfer und Eisen die Zinkaufnahme hemmen ⁴⁷.

Die Ausscheidung von Zink erfolgt zu ca. 90 % über den Darm, 5 bis 10 % werden renal und etwa 3 % über den Schweiß eliminiert.

1.1.3 Aufnahme und Verteilung von Zink in Zellen

Fast der gesamte zelluläre Zinkbestand liegt in Form von Komplexen mit Proteinen und Nukleinsäuren vor. Zink ist in fast allen Organellen der Zelle verteilt: 30-40 % befinden sich im Kern, 50 % im Zytoplasma in Form von spezifischen Vesikeln für Enzyme oder Hormone, der Rest ist in die Zellmembran integriert ¹¹¹.

Zinkionen sind hydrophil und können die Zellmembranen nicht durch passive Diffusion überqueren. Im Allgemeinen ist der Zinktransport als konzentrationsabhängig beschrieben. Der Mechanismus der Zinkaufnahme in die Zelle erfolgt durch verschiedene Transportproteine, die aktuell Gegenstand der Forschung sind. Bisher sind etwa 10 zinkspezifische (ZIP) Transporter und einige kationen-spezifische Transporter (CDF) bekannt. ^{23,113}.

Die große Bedeutung für den Zinkstoffwechsel von Metallothionein, einem kleinen (6-7kD) intrazellulären Protein mit hohem Cysteingehalt, wird zunehmend erkannt ⁷¹. Die genaue Funktion von Metallothionein wird noch erkundet. Das Protein hat die Eigenschaft sowohl essentielle metallische Spurenelemente wie Kupfer und Zink als auch toxische Metalle wie Cadmium, Quecksilber und Silber zu binden. Insbesondere für die Homöostase von intrazellulärem freiem Zink wird dem Metallothionein eine Schlüsselrolle eingeräumt. Zahlreiche toxische Stimuli wie eine erhöhte Konzentration von reaktiven Sauerstoff- oder Stickstoffradikalen oder von an Metallothionein bindende Metalle sowie proinflammatorische Agenzien führen zu einer erhöhten Expression des Proteins in zahlreichen Geweben ¹⁰⁸.

1.1.4 Funktionen von Zink im menschlichen Körper

Es ist seit längerem bekannt, dass Zink an Zellwachstums- und Differenzierungsvorgängen beteiligt ist, wie beispielsweise in Zellen des Immunsystems. Es scheint sowohl bei der unspezifischen granulozytären Abwehr als auch bei der spezifischen lymphozytären Abwehr involviert zu sein ^{98,103}.

Bei Bestehen einer kongenitalen Zinkdefizienz tritt eine T-Zell-Funktionsstörung mit Aplasie des Thymus auf ¹¹⁷. Außerdem wird das im Thymus produzierte, für die Reifung von T-Lymphozyten erforderliche Peptidhormon Thymulin nur nach seiner Bindung an Zink in die aktive Form überführt.

Bei HIV-infizierten Patienten korreliert ein verminderter Zinkgehalt mit einer Abnahme der Abwehrfunktion und höheren Morbiditätsraten⁹⁴. Eine Zinksubstitution bei Zinkmangel kann das CD4 / CD8 Verhältnis korrigieren¹⁰⁵.

Auch für das Auftreten von grippalen Infekten wurden in einigen klinischen Studien sowohl therapeutische als auch prophylaktische Effekte einer Zinkeinnahme gezeigt^{41,77,111}.

Ferner wird Zink eine membranstabilisierende Wirkung nachgesagt⁹⁸. Diese Wirkung basiert auf der Eigenschaft von Zink, mit verschiedenen Strukturen der Zellmembran Komplexe zu bilden¹⁰³. Als eine essentielle Komponente von Superoxiddismutase (SOD) verhindert Zink eine Oxidation wichtiger chemischer Gruppen durch freie Radikale.

Im endokrinen System zeigen sich mehrere Vorgänge zinkabhängig. Unter anderem spielt Zink eine Rolle im Kohlenhydrat- und Lipidstoffwechsel. Es bildet mit Insulin ein zinkkoordiniertes Hexamer und ist so für dessen Speicherung mitverantwortlich. Es interagiert mit spezifischen Hormonbindungsdomänen von Vitamin D-, Schilddrüsenhormon-, Östrogen- Progesteron- sowie Testosteron-Rezeptoren. Die Wachstumshormone aus der Hypophyse werden in Form von zinkhaltigen Granula sezerniert.

Intrazelluläre freie Zinkionen sind ein wesentlicher Inhibitor proapoptotischer Signalketten. Als Apoptoseinhibitor hemmt Zink hier unter anderem Calcium/Magnesium-abhängige Endonucleasen, welche die DNA fragmentieren und interagiert hemmend mit der Caspase-3, einem Schlüsselenzym der Apoptose¹⁰⁸. Der durch Glukokortikoide vermittelten Apoptose wirkt Zink durch eine Hemmung der Steroidbindung an die Glukokortikoidrezeptoren entgegen. Bei höheren intrazellulären Konzentrationen freier Zinkionen spielt dagegen die antiapoptotische Wirkung von Zink keine Rolle mehr. Vielmehr konnte für hohe, toxische Zinkkonzentrationen in neuronalen und nichtneuronalen Geweben die Auslösung einer Nekrose nachgewiesen werden. Als ursächlich für die durch Zink induzierte Zellnekrose wird oxidativer Stress durch Stickstoff- und Sauerstoffradikale angesehen¹⁰⁸. Der oben beschriebenen antioxidativen Wirkung steht somit auch eine toxikologisch relevante prooxidative Wirkung entgegen.

Als derzeit aktuelles Forschungsgebiet wird die Rolle von Zink bei der neuronalen Signalübertragung im ZNS und seine pathophysiologische Bedeutung bei Erkrankungen wie Schlaganfall, Depression und Morbus Alzheimer untersucht^{61,64}.

1.1.5 Zinkmangel

Der tägliche Bedarf an Zink liegt für Männer bei circa 11mg, für Frauen bei 8mg und für Kinder bei 5-9mg täglich. In der Schwangerschaft und Stillzeit ist der Bedarf an Zink weiterhin auf etwa 15mg/d erhöht ¹³⁰.

Die Pathogenese der gesundheitlichen Störungen bei Zinkmangel ist noch nicht vollständig geklärt, jedoch lässt sich die Bedeutung dieses Spurenelementes von den vielfältigen Symptomen bei den Zinkmangel-Patienten ableiten ¹¹⁷. Als unspezifische Symptome bei Zinkmangel werden Übelkeit, Kopfschmerzen, Antriebsschwäche sowie Beeinträchtigung der Sinneswahrnehmung, wie zum Beispiel Nachtblindheit, Geschmacks- und Geruchssinnstörungen beobachtet. Da Zink für die RNA-, DNA- und Transkriptionsenzym-synthese relevant ist werden bei Zinkmangel vor allem das schnell proliferierende Gewebe betroffen, wie Haut, Darmschleimhaut, Immunsystem und Gonaden ^{98,111}. Es kommt dementsprechend zu Haarausfall, verzögerter Wundheilung, Diarrhöe, Anämie, vermehrter Infektanfälligkeit, Hypogonadismus mit Beeinträchtigung der reproduktiven Funktion. Bei den Kindern können vermehrt kongenitale Missbildungen und eine gestörte sexuelle Entwicklung auftreten.

Zinkmangel im Blut weist immer auf einen schweren Mangel im Gewebe hin. Dagegen sagt ein normaler Blutzinkspiegel wenig über den tatsächlichen Zinkbestand im Gewebe aus. Während im Blut noch genügend Zink vorhanden ist, kann das Gewebe schon Zinkmangel aufweisen. Die Blutzinkspiegel dürfen somit nicht als allgemeiner absoluter Index für den Zinkstatus angesehen werden.

Ein Zinkmangel kann bei fehlerhafter Ernährung, bei Darmerkrankungen mit Malassimilation, sowie induziert durch bestimmte Arzneimittel wie z.B. Antazida, Ciclosporin, Glukokortikoide, Diuretika, Lipidsenker und Kontrazeptiva entstehen. Bei der Acrodermatitis enteropathica, einer seltenen genetischen Erkrankung, resultiert ein Zinkmangel aus einem Defekt im Gen für das Zink-Transporterprotein SLC39A4. Aufgrund einer verminderten Zinkabsorption im Darm kommt es zu charakteristischen hyperpigmentierten Hautläsionen, einer Wachstums- und Entwicklungsstörung und zu einer erhöhten Infektanfälligkeit.

1.1.6 Toxikologische Relevanz von Zink

Trotz seiner lebenswichtigen Bedeutung für viele Funktionen des Körpers, kann Zink als ein toxisches Agens fungieren. In lebendem Gewebe tritt Zink fast nie als ein freies Ion auf, sondern liegt meist in Form organischer Komplexverbindungen vor. Zudem besitzt es weder mutagene noch teratogene Eigenschaften und ist trotz bislang unterschiedlicher Untersuchungsergebnisse auch nicht als humanes Kanzerogen eingestuft.

Das Ausmaß und die Symptome einer Zinkvergiftung hängen unter anderem vom Aufnahmeweg ab.

1.1.7 Orale Zinktoxizität

Bei oraler Zinkaufnahme zeigen erst sehr hohe Zinkdosen toxische Wirkungen, da die enterale Resorption offenbar einer strengen homöostatischen Kontrolle unterliegt. Von verschiedenen Autoren werden Mengen von 1-2 g Zink nach oraler Aufnahme als emetische Dosen und Mengen über 10 g als letale Dosen angegeben^{24,79,88}. In der Vergangenheit kam es gelegentlich zu akuten Zinkvergiftungen, die auf den Verzehr säurehaltiger Nahrungsmittel oder Getränke zurückzuführen waren, die über längere Zeit in verzinkten Behältnissen aufbewahrt wurden. Die Symptome einer akuten oralen Vergiftung sind Beschwerden im Magen-Darm-Trakt, wie Übelkeit, Erbrechen, Durchfall, abdominale Schmerzen und ein metallischer Geschmack im Mund.

1.1.8 Inhalative Zinktoxizität

Bei einer Inhalation zinkhaltiger Dämpfe sind bereits viel geringere Zinkmengen toxisch ⁴⁴.

Bei einer Aufnahme von 5 mg/m^3 per inhalationem kann die Symptomatik des Gießerfiebers, auch "metal fume fever" genannt, mit Kopfschmerzen, Fieber, Muskelschmerzen und Atemnot auftreten ^{44,96}. Auch Dämpfe vieler anderer Metalle, wie Arsen, Blei, Cadmium, Eisen, Nickel, Kobalt, Kupfer, Magnesium, Mangan, Zinn und Quecksilber können ein „metal fume fever“ auslösen ^{21,78,81}.

In Tierversuchen führte die Inhalation von zinkchlorid- oder zinkoxidhaltigen Dämpfen zu einer Beeinträchtigung der Lungenfunktion, in schweren Fällen entwickelte sich ein "acute respiratory distress syndrome" (ARDS) ^{5,44,63}.

Auch beim Menschen wird von der Entwicklung eines ARDS nach Einatmen von zinkhaltigen Dämpfen berichtet. So kam es während des ersten Weltkrieges und bei Militärübungen beim Einsatz von Rauchbomben zu mehreren Fällen einer inhalativen Zinkvergiftung ^{51,52,55,85,133}. Die Bedrohlichkeit des Verlaufs kann wegen des initialen relativen Wohlbefindens der Patienten übersehen werden. Nach einem meist symptomarmen Intervall von wenigen Stunden kommt es zu einem Temperaturanstieg, begleitet von einer schweren Gasaustauschstörung, röntgenologisch nachweisbaren beidseitigen Lungenveränderungen durch ein Lungenödem bis zum klinischen Bild eines lebensbedrohlichen ARDS (Definition siehe weiter unten). In Abhängigkeit von Zusammensetzung des toxischen Nebels und Luftfeuchtigkeit können zusätzlich säurehaltige Verbindungen entstehen. Aufgrund deren Teilchengröße führen letztere allerdings mehr zu Schäden des oberen Respirationstraktes, wie Verätzungen und Ulzerationen der exponierten Schleimhäute ¹⁰¹.

Die Zinkdosis ab der mit der Entwicklung eines ARDS zu rechnen ist, ist nicht genau bekannt. Über die Zinkverteilung in den verschiedenen Körpergeweben beim Menschen nach inhalativer Zinkaufnahme existieren nur wenige Daten. Untersuchungen an zwei Soldaten, die 25 und 32 Tage nach Zinkexposition verstarben, zeigen in einem Fall einen um ca. 50 % erhöhten Zinkgehalt der Lunge ⁵². Weitere Studien konnten einen Anstieg von Zink in der Lunge nicht bestätigen, jedoch waren hier Serum- und Plasmaspiegel um das 1,5 - 2fache erhöht ⁹⁹. Der Befund, dass auch Monate nach einer inhalativen Zinkvergiftung noch erhöhte

Zinkkonzentrationen im Serum vorliegen, wurde auf eine Nachresorption von Zink aus der Lunge zurückgeführt^{51,101}. Diese These wird jedoch von anderen Untersuchungen, in denen die Lunge nach entsprechender Zinkexposition keinen erhöhten Zinkgehalt aufwies, widerlegt¹⁰⁰.

Als Therapie bei akuter oraler oder inhalativer Zinkintoxikation wird neben symptomatischen Maßnahmen die Gabe von Chelatkomplexbildnern empfohlen. So soll freies Zink durch Komplexbildung unschädlich und leichter ausscheidbar gemacht werden. Neben D-Penicillamin, Calcium-EDTA und anderen chelatbildenden Stoffen wird hier unter anderem auch die Verabreichung von N-Acetylcystein empfohlen, für welches beim durch Zink ausgelösten ARDS eine Erhöhung der Zinkausscheidung im Urin sowie eine Erniedrigung der Zinkspiegel im Plasma nachgewiesen werden konnte⁵². Ob eine Therapie mit Chelatkomplexbildnern über die Reduktion der freien wirksamen Zinkmenge auch die Prognose einer Zinkvergiftung verbessert, ist nicht bekannt. Die größte Effizienz hinsichtlich der Zinkkomplexbildung ist bei möglichst frühzeitiger Anwendung innerhalb von 10 Minuten bis zu 12 Stunden nach Exposition gegeben²⁶.

Der genaue Pathomechanismus für die Entwicklung eines ARDS durch inhalative Zinkintoxikation ist bis heute ungeklärt. Es werden eine Protein-, RNA- und DNA-Synthesehemmung unter toxischen Zinkdosen beobachtet^{97,129}. Zum Teil wird ein Kalzium-Antagonismus als die toxische Wirkung von Zink angeführt¹⁶. Für eine akute zelluläre Toxizität, die innerhalb weniger Stunden zum Zelltod der Alveolarepithelzellen führt, dürften jedoch diese Wirkungen kaum ursächlich sein.

Die Bildung freier Sauerstoff- und Stickstoffradikale bei der Reaktion von Sauerstoff oder NO mit freien Zinkionen könnte allerdings eine wesentliche Rolle für die akute Toxizität von Zink spielen¹⁰⁸. Die toxische Wirkung von Zink könnte hier durch eine Interaktion von Stickstoffradikalen mit Metallothionein verstärkt werden: freie Stickstoffradikale reagieren mit Metallothionein, wodurch in pulmonalen Endothelzellen an Metallothionein gebundenes, endogenes Zink freigesetzt wird und sich so die Konzentration freier Zinkionen im Cytosol weiter erhöht¹⁰⁸.

1.2 ARDS

1.2.1 Definition und Pathophysiologie des akuten Lungenversagen (ARDS/ALI)

Das akute, nicht obstruktive Lungenversagen (ALI/ARDS) ist eine relativ seltene, aber bedrohliche und mit hoher Mortalität (30-60 %) verbundene Lungenerkrankung ^{68,87,125}.

Es ist durch eine akute und schwere pulmonale Gasaustauschstörung infolge eines nicht kardiogenen Lungenödems charakterisiert. Die Inzidenz des Krankheitsbildes ist unklar und wird auf 1,5-12,9 Fälle/100.000 und Jahr geschätzt ⁸⁷. In Anlehnung an die Amerikanisch-Europäische Konsensus Konferenz von 1994 wird zwischen dem weniger schweren Krankheitsbild der acute lung injury (ALI) und dem schwereren acute respiratory distress syndrome (ARDS) unterschieden, welche wie folgt definiert sind ¹²:

- ALI (acute lung injury): akuter Beginn
Oxygenierungsstörung: $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 < 300$ mmHg
Bilaterale Infiltrate in der Röntgenaufnahme der Lunge
Pulmonal-arterieller Verschlußdruck (nicht obligatorisch): PCWP < 18 mmHg
- ARDS (acute respiratory distress syndrome): Definitionen wie für ALI, bis auf eine schwerere Oxygenierungsstörung: $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 < 200$ mmHg

Die auslösenden Faktoren eines ARDS können sowohl eine direkte pulmonale Schädigung, wie Pneumonie, Aspiration, Lungenkontusion oder Inhalationsnoxen als auch eine extrapulmonale Ursache, wie Sepsis, Polytrauma, Verbrennungen, Verbrauchskoagulopathie, Massentransfusionen, Fettembolien oder akute Pankreatitis sein ^{57,125}.

Auch wenn der Entwicklung eines ALI/ARDS verschiedene Ursachen zugrunde liegen können, zeigt sich der Krankheitsverlauf doch recht ähnlich. Man kann pathophysiologisch und klinisch 3 Stadien unterscheiden:

Das erste exsudative Stadium ist durch ein interstitielles Ödem als Folge einer gesteigerten Permeabilität der alveokapillären Membran charakterisiert. In Abhängigkeit davon, ob eine direkte pulmonale oder eine indirekte Schädigung vorliegt, rührt diese Barrierestörung von einer Alveolarepithel- bzw. Kapillarendothelschädigung her. Klinisch entwickeln sich eine Hyperventilation infolge Hypoxämie und eine respiratorische Alkalose. Makroskopisch sichtbare radiologische Veränderungen der Lunge lassen sich zu diesem Zeitpunkt noch nicht nachweisen. Elektronenmikroskopisch zeigen die Untersuchungen allerdings schon im ersten

Stadium ausgedehnte Zerstörungen der Typ-I-Zellen des Alveolarepithels¹²⁵. Experimentell und klinisch wurde deutlich, dass vor allem das Ausmaß der alveolären Schädigung einen kritischen Faktor für die Entwicklung aber auch für die Rekonvaleszenz und Prognose des ARDS darstellt¹²⁵.

Die alveoläre Membran besteht aus zwei Zelltypen: die Typ-I-Alveolarepithelzellen machen etwa 90 % der Oberfläche aus und reagieren sehr empfindlich gegenüber Verletzung. Die Typ-II-Alveolarepithelzellen nehmen in etwa 10 % der Oberfläche ein und zeigen sich wesentlich resistenter gegenüber Verletzungen. Ihnen kommen wichtige Funktionen wie Surfactantproduktion, Ionentransport, Proliferation und Differenzierung zu Typ-I-Zellen zu.

Im zweiten Stadium eines ARDS kommt es zum Einstrom protein- und fibrinreichen Exsudats in den Alveolarraum, das sich zu den so genannten „hyalinen Membranen“ formiert. In den kleineren Blutgefäßen der Lunge führen Mikrothromben zur Entstehung von Mikroatelektasen und zur Ausbildung intrapulmonaler Shunts, die die beginnende Gasaustauschstörung der Lunge weiter verstärken. In diesem Stadium kommt es zu morphologischen Veränderungen der Lunge, wie deutlicher Verbreiterung des Interstitiums und Zerstörung der Alveolarstruktur. Im Röntgenbild sieht man beidseitig fleckige und streifige Verdichtungen des Lungenparenchyms.

Von der Schädigung sind nun neben den Typ I auch die Typ II Alveolarepithelzellen betroffen, sodass es nachfolgend zu einer verminderten Bildung des Surfactantfaktors, sowie einer Unterbrechung des normalen epithelialen Flüssigkeitstransportes kommt und somit ein Kollaps der Alveolen weiter begünstigt wird. Die durch neutrophile Granulozyten freigesetzten Proteasen führen zum weiteren Verlust von Surfactant. Eine massenhafte Ausschüttung von Entzündungsmediatoren führt zur Verschiebung des Redoxstatus der Alveolarepithelzellen. Des weiteren werden Fibroblasten, unter anderem durch Interleukin-1, zur überschießenden Produktion von Extrazellulärmatrix angeregt¹²⁵.

Schließlich kann dieser Verlauf in ein irreversibles proliferatives Stadium III mit Fibroproliferation und Kollagenablagerung im Lungenparenchym, Endothelproliferation der Alveolarkapillaren und letzten Endes Ausbildung einer Lungenfibrose münden. Klinisch führt diese Gewebereorganisation zu einer stark herabgesetzten Compliance und Diffusionskapazität mit konsekutiver respiratorischer Globalinsuffizienz und pulmonaler Hypertonie.

1.2.2 Therapie des ARDS

Eine kausale Therapie des ARDS blieb bis heute trotz großer Fortschritte in der Erforschung der pathophysiologischen Mechanismen aus. Maßnahmen im Management des akuten Lungenversagens bestehen primär, falls möglich, in der konsequenten kausalen Therapie des Grundleidens, z.B. einer Sepsis durch antimikrobielle Therapie und Fokussanierung. In der klinischen Praxis wird des Weiteren eine negative Flüssigkeitsbilanz angestrebt, um die transkapilläre Filtration zu vermindern und die Ödemresorption zu erleichtern, stabile Kreislaufverhältnisse müssen allerdings gewährleistet werden. Vier-Seitenlagerung mit regelmäßigem Wechsel der Patientenposition wird empfohlen um einer Akkumulation der pulmonalen Ödeme in den abhängigen Lungenabschnitten entgegenzuwirken. So genannte protektive Beatmungsformen mit hohen PEEP, begrenzten inspiratorischen Drücken, umgekehrtem Atemzeitverhältnis, erhöhten Beatmungsfrequenzen, permissiver Hyperkapnie und druckgesteuerter Beatmung werden eingesetzt um eine ventilationsassoziierte Lungenschädigung zu vermeiden²⁹.

Ein positiver Effekt einer Applikation von Surfactant konnte bislang in keiner randomisierten Studie nachgewiesen werden^{6,45}. Auch die Bedeutung systemisch verabreichter oder inhalativer Prostaglandinderivate ist noch unklar^{1,118}. Die Inhalation von NO führt über eine pulmonale Vasodilatation im Bereich ventilierter Alveolen zu einer Verbesserung des gestörten Ventilation-Perfusions-Verhältnisses und wirkt somit der Hypoxämie entgegen. Ein letalitätssenkender Effekt konnte bislang allerdings nicht nachgewiesen werden^{69,114}.

1.2.3 Glukokortikoide bei der Therapie des ARDS

Pathophysiologisch postuliert man beim ARDS eine überschießende Reaktion entzündungsvermittelnder Zellen^{8,60,125}. Darüber hinaus ist die Anwesenheit von Entzündungszellen und inflammatorischen Cytokinen im Material aus einer bronchoalveolären Lavage beim ARDS mit einer schlechten Prognose assoziiert^{84,126}.

Längere Zeit wurden für die Behandlung des ARDS aus theoretischen Überlegungen Glukokortikoide wegen ihrer nachgewiesenen antiphlogistischen und antiödematösen Wirkung empfohlen^{56,116}. Für die Therapie des ARDS wäre anzunehmen, dass die Hemmung der komplement-induzierten Granulozytenaggregation und die Hemmung der Neutrophilen-Chemotaxis als Eigenschaften der Steroide von Nutzen sein könnten. Weitere, mutmaßlich

positive, Effekte der Glukokortikoide beim ARDS sind eine Hemmung der Bildung proinflammatorischer Prostaglandinderivate, eine Membranstabilisierung von Zell- und Lysosomenmembranen sowie eine verminderte Freisetzung von Sauerstoffradikalen aus aktivierten Neutrophilen⁶⁰. Gegen die Erwartung zeigte sich allerdings in mehreren klinischen Studien übereinstimmend die Ineffektivität einer hochdosierten Glukokortikoidtherapie in der Initialphase des ARDS^{8,13,15,43,50,67}. Weder für physiologische Parameter noch für die Überlebensrate wurde ein Effekt bei einem durch unterschiedliche Noxen ausgelösten ARDS gefunden. Eine Studie bei Patienten mit septischem Schock, die noch kein ARDS hatten, zeigte sogar einen negativen Effekt der Glukokortikoide, da die mit Steroiden behandelten Patienten häufiger ein ARDS entwickelten¹²⁷. Ein eindeutiger positiver Effekt der Therapie mit Glukokortikoiden in der Frühphase konnte bei klinisch relativ seltenen Auslösern eines ARDS nachgewiesen werden, unter anderem bei der *Pneumocystis carinii*-Pneumonie bei HIV-Infektion, der akuten eosinophilen Pneumonie, dem ARDS im Rahmen von Fettemboliesyndromen oder Bronchiolitis obliterans^{4,30,37,102}.

Für die spätere proliferative Phase des ARDS konnte in einer prospektiven randomisierten Studie ein positives Ergebnis der Glukokortikoidbehandlung beobachtet werden⁷². Hier kommt offensichtlich der antifibroproliferative Effekt der Glukokortikoide mit daraus resultierender Reduktion der Kollagensynthese und verminderter Ausprägung der nachfolgenden Lungenfibrose zur Geltung. Ferner wird die unter Glukokortikoiden erhöhte Surfactantproduktion der Alveolarepithelzellen als eine positive Nebenwirkung angesehen.

Für die ausbleibende Wirkung der Glukokortikoide in der Frühphase eines ARDS ist unter anderem eine erhöhte Rate von Infekten angeschuldigt worden¹²⁷. Allerdings ließ sich eine erhöhte Rate von infektassoziierten Komplikationen bei Therapie eines ARDS mit Steroiden nicht konstant nachweisen^{13,60}. Somit blieb letztlich die Frage weiter ungeklärt, welche Pathomechanismen dazu führen, dass theoretisch wirksame Glukokortikoide in der Praxis enttäuschende Ergebnisse liefern.

1.3 Glutathion

1.3.1 Glutathiondepletion unter Glukokortikoiden

In der Akutphase des ARDS kommt es zur Aktivierung der Entzündungskaskade mit verstärkter Freisetzung von zytotoxischen und prooxidativen Substanzen^{8,87,125}. Somit kommt dem körpereigenen antioxidativen System für die Aufrechterhaltung des Redoxstatus der Zelle eine herausragende Rolle zu^{84,125}. Als Bestandteile des antioxidativen Systems sind in der Lunge vor allem Superoxiddismutase, Katalase, Glutathion, sowie zahlreiche Vitamine, wie E, C und Beta-Karotin präsent^{11,84}. Insbesondere Glutathion scheint dabei von großer Bedeutung zu sein^{8,93}.

Diverse Studien haben belegt, dass sowohl in den Pneumocyten als auch in dem die Alveolen auskleidenden Schutzfilm, dem sog. ELF (epithelial lining fluid), der Glutathiongehalt beim ARDS erniedrigt ist⁸. Des Weiteren scheint die beschriebene Glutathiondepletion in der ELF-Flüssigkeit mit einer erhöhten Mortalitätsrate assoziiert zu sein⁸.

Untersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe haben gezeigt, dass nach Glukokortikoidbehandlung der zelluläre Glutathiongehalt in einer Typ-II-Alveolarepithel-ähnlichen Zellkultur abnimmt¹²⁰. Nicht alle Körperzellen reagieren auf Glukokortikoidgabe mit einer Abnahme des Glutathiongehaltes, einer sogenannten Glutathiondepletion. Bei vielen Parenchymzelltypen, wie Hepatozyten, Nierenzellen, Ovarialzellen, Fibroblasten wird keine Glutathiondepletion beobachtet, man konnte für diese Zelltypen dagegen einen Anstieg des intrazellulären Glutathiongehaltes durch Glukokortikoidbehandlung nachweisen^{10,66,75}.

Somit kann man vermuten, dass die Glutathiondepletion eine besondere Reaktion der Alveolarepithelzellen auf Glukokortikoide ist. Interessanterweise zeigen diese Zellen keine Verminderung des GSH-Synthesevermögens nach Glukokortikoidbehandlung¹²⁴. Somit wäre es zu klären, ob die Stimulation der GSH-Synthese die beschriebene Glutathiondepletion in den Alveolarepithelzellen nach Glukokortikoidgabe ausgleichen oder wenigstens vermindern kann.

1.3.2 Glutathiondepletion unter Zinkbelastung

Gleichermaßen wie beim ARDS scheint auch bei der zink-induzierten Zytotoxizität ein gestörter Glutathionmetabolismus eine Rolle zu spielen. Insbesondere für die zink-bedingte Toxizität wurde eine Depletion des zellulären Glutathions in den Leberzellen der Ratte beschrieben¹⁰⁹. Auch an Lungenzellen kam es unter toxischen Zinkkonzentrationen zu einer Glutathiondepletion^{122,131}. Vor allem nach vorangegangener experimenteller Entleerung der GSH Speicher der Zellen konnte eine verstärkte toxische Wirkung von Zink demonstriert werden¹²². Zusätzlich zum verringerten Gesamtglutathiongehalt wurde immer eine Zunahme des oxidierten Glutathions (GSSG) nach Exposition gegenüber toxischen Zinkkonzentrationen beobachtet. Außerdem kam es nach einer Blockierung der Aktivität der zellulären Glutathionreduktase gleichfalls zu einer erhöhten Zinktoxizität in den Lungenzellen¹²⁴. Anscheinend kann Zink die Aktivität der Glutathionreduktase irreversibel blockieren, was vermutlich den ersten Schritt bei der Veränderung im Glutathionsystem der Alveolarepithelzellen darstellt¹³¹.

Die Abnahme des zellulären Glutathionpools unter Zinktoxizität kann an unterschiedlichen Stationen des Glutathionmetabolismus stattfinden, wie zum Beispiel:

1. Zum Einem könnte dafür eine direkte irreversible **Hemmung der Glutathionreduktase** durch Zink verantwortlich sein^{121,131}. Durch ausbleibende Reduktion des oxidierten Glutathions kommt es zu einer Verschiebung des Verhältnisses zwischen reduziertem und oxidiertem Glutathion zu Gunsten des oxidierten Glutathions.
2. Zum Anderen kann ein erhöhter **Efflux des vor allem oxidierten Glutathions** aus der Zelle für die Depletion des zellulären Glutathionpools ursächlich sein^{46 73}.
3. Möglicherweise kann eine **eingeschränkte Glutathionsynthese** den Verlust von oxidiertem und aus der Zelle transportiertem Glutathion nicht ausgleichen. Interessanterweise scheint Zink aber die GSH-Synthese nicht zu hemmen¹³¹.

1.3.3 Steigerung der Glutathionsynthese

Da die Glutathionreduktase durch Zink gehemmt wird, kann dem durch Zink verursachten oxidativen Stress mit Anstieg des GSSG nicht mit Reduktion des oxidierten Glutathions begegnet werden. Eine Kompensation wäre lediglich durch Ausschleusung des GSSG aus der Zelle und eine gleichzeitige Neusynthese von GSH möglich. Interessanterweise können die Syntheseraten für Glutathion so hoch sein, dass sie annähernd die Reduktionskapazität der Glutathionreduktase erreichen¹³¹. So wäre es theoretisch möglich, durch eine erhöhte Syntheseleistung einen intrazellulären Glutathionverlust auszugleichen und somit die Widerstandsfähigkeit der Zelle gegenüber oxidativem Stress zu steigern.

Glutathion ist ein Tripeptid, das intrazellulär aus Glutamat, Glycin und Cystein aufgebaut wird. Dabei stellt Cystein einen limitierenden Faktor für die Glutathionsynthese dar⁷³. Die zellulären Konzentrationen von Cystein liegen zwischen 10 und 100 µmol/l und damit weit unter dem Km-Wert der γ -Glutamylcysteinsynthetase. Somit ist die Cystein-Verfügbarkeit das entscheidende Maß für die Glutathion-Neusynthese in der Zelle. Eine durch Zink verursachte verminderte Aufnahme oder eine eingeschränkte Verfügbarkeit von Cystein könnte zu einem Cysteinmangel und somit zu einer erniedrigten Syntheserate in der Zelle führen. So könnte man wiederum durch ein erhöhtes Angebot an Cystein oder seinen Vorläufersubstanzen die zelluläre Glutathion- Syntheseleistung steigern und somit möglicherweise die zink-bedingte Toxizität verringern.

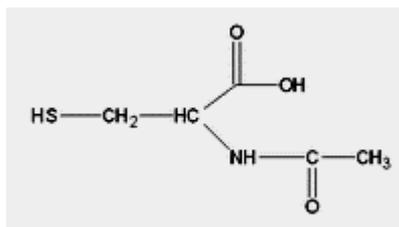
In mehreren klinischen Studien wurde seit Jahren die Wirksamkeit von Glutathion-Substitution auf die Erhöhung des Glutathiongehalts im ELF bei Vorliegen eines ARDS untersucht^{17,18}. Die orale Gabe von Glutathion führte allerdings zu keinem Anstieg des Glutathiongehaltes im ELF¹²⁵. So wurde ferner die Verabreichung von Glutathionesterverbindungen und Glutathionaerosolen, sowie Cysteinorstufen wie N-Acetylcystein und Oxothiazolidin getestet^{14,60,125}.

1.4 N-Acetylcystein

1.4.1 N-Acetylcystein als Glutathiondonator

N-Acetylcystein wurde in den 60-er Jahren entwickelt und ist ein N-Acetyl-Derivat der natürlich vorkommenden Aminosäure L-Cystein. Dank seiner Fähigkeit zur reduktiven Spaltung von Disulfidbrücken in Mukoproteinen des Bronchialsekrets findet es einen weiten Einsatz in der Medizin als Expektoranz zur Herabsetzung der Sputumviskosität. Weitere Indikationen für NAC sind eine akute Paracetamol-Intoxikation, sowie die Prophylaxe der kontrastmittelinduzierten Nierenschädigung.

Die Funktion des N-Acetylcysteins als Radikalfänger wird aus der chemischen Formel des NAC-Moleküls ersichtlich.



Die freie SH-Gruppe kann zum einen direkt mit Oxidantien, wie H_2O_2 (Sauerstoffperoxid), $\cdot\text{OH}$ (Hydroxylradikal), HOCl (Hypochlorsäure) interagieren^{9,39}. Dabei werden zwei freie Sulfhydrylgruppen zu einer Disulfidverbindung oxidiert. Zum anderen mehren sich Evidenzen, dass NAC die Synthese von Glutathion, einem der wichtigsten Antioxidanten, zu unterstützen vermag. Da Alveolarepithelzellen Typ II bevorzugt Cystein im Vergleich zu Cystin importieren, stellt anscheinend Cystein das überwiegende Substrat für die Glutathionsynthese dar^{22,86}. Die Gewinnung von Cystein kann zum einen durch die Deacetylierung von NAC und zum anderen durch die Reduktion von Cystin zu Cystein erfolgen.

1.4.2 Studien zur Behandlung mit N-Acetylcystein

Mittlerweile wurden einige klinische und experimentelle Studien zur Untersuchung der antioxidativen Effekten des NAC sowohl in vivo als auch in vitro durchgeführt.

1.4.2.1 In Vivo Studien:

Die therapeutische Nützlichkeit von NAC wurde in der Behandlung von systemischer Sklerose, idiopathischen Lungenfibrose, sowie tierexperimentell nach Verbrennung, hoch dosierter radioaktiver Bestrahlung und Bleomycin-induzierter Lungenfibrose erwiesen^{33,80,132}. Bei oraler Gabe wird NAC im Magendarmtrakt schnell aufgenommen und anschließend hepatisch metabolisiert. So resultiert bei einem hohen first-pass-Effekt eine Bioverfügbarkeit von ca. 5-10 %, was bei einer intravenösen Gabe nicht der Fall ist. Die Plasmahalbwertszeit liegt bei 2-4 Stunden. Die Deacetylierung von NAC erfolgt durch die zellmembranständige oder intrazellulär lokalisierte N-Deacetylase. NAC wird vorwiegend renal nach Transformation in inaktive Metabolite ausgeschieden.

Trotz der schwierigen Unterscheidung zwischen den mukolytischen und antioxidativen Eigenschaften des NAC haben die meisten Studien Hinweise darauf erbracht, dass die Wirkung des NAC über die mukolytische Effekte hinausgeht.

Die antioxidative Wirkkomponente von NAC ließ sich in einer kontrollierten, multizentrischen Studie bei Patienten mit ARDS demonstrieren^{14,40}. In den meisten Studien wurden die Dosen oral zwischen 200 und 600mg/d bzw. intravenös bis zu 150 mg/kg Körpergewicht pro Tag verabreicht⁴⁰. So hatte die hochdosierte Applikation von NAC nicht nur einen signifikanten Wiederanstieg der bei ARDS pathologisch niedrigen Konzentration wichtiger Antioxidanzien (Glutathion, Cystein) zur Folge, sondern verminderte auch die Dauer des akuten Lungenversagens. Ein günstiger Einfluss auf das Überleben der Patienten fand sich allerdings nicht^{14,59,60,110}. Zu sehr ähnlichen Ergebnissen kam die Arbeitsgruppe von Ortolani et al.⁸³. Bei 36 Patienten mit frühem ARDS reduzierte NAC in einer Dosierung von 50 mg/kg KG die Konzentrationen von expiratorischem Ethan und Malondialdehyd, als Endprodukte der Lipidperoxidation, und von oxidiertem Glutathion, was von den Autoren als lungenprotektiver Effekt interpretiert wurde. Insgesamt ergab eine Metaanalyse von 5

randomisierten Studien mit insgesamt 239 Patienten aber keinen signifikanten Vorteil für die Anwendung von N-Acetylcystein gegenüber Placebo in Bezug auf die Mortalität².

In den tierexperimentellen Untersuchungen ließ sich allerdings ein präventiver Effekt von NAC gegen oxidative Noxen wie Hyperoxie, Endotoxine oder Ischämie nachweisen⁴⁰.

Zusätzlich zur antioxidativen Wirkung werden NAC antiinflammatorische Effekte zugeschrieben. So reduzierte die NAC-Behandlung den Gehalt an Entzündungszellen und deren Aktivitätsmarkern in Bronchoalveolärlavage von Rauchern⁴⁰.

1.4.2.2 In Vitro Studien:

In in vitro Versuchen in erforschte man die Rolle von NAC als Glutathion-Donators weiter. So erhöhte die Gabe von 1 mmol/l NAC den intrazellulären Glutathiongehalt und Widerstandsfähigkeit der Alveolarepithelzellen Typ II der Rate bei Paraquat-induzierter Toxizität⁵⁴. Bei humanen A549 Zellen konnte die Inkubation mit 1 mmol/l NAC die Auswirkungen der Cyclophosphamid-Intoxikation ebenso reduzieren⁹¹. In einer anderen Studie mit A549 Zellen führte die Inkubation mit einer Dosis von 10 µmol/l NAC zu einem zehnfachen Anstieg des intrazellulären Glutathiongehaltes³⁹.

Es existieren allerdings keine exakten Untersuchungen dazu, wie sich eine N-Acetylcystein-Gabe während oder nach einer Glukokortikoid-Behandlung auf den Glutathionhaushalt und die Vitalität der Alveolarzellen auswirken. Unter diesem Aspekt wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit versucht, folgende Fragen zu klären:

2. Fragestellung

1. Es sollte geklärt werden, ob sich der zelluläre Glutathiongehalt von zwei als Alveolarepithel Typ II charakterisierten Zelllinien (L2, A549) durch Gabe von N-Acetylcystein erhöhen lässt.

Da in den Versuchen Zinkchlorid in einer Konzentration bis 200 $\mu\text{mol/l}$ verwendet wurde, sollte die verwendete NAC Konzentration ebenso auf 200 $\mu\text{mol/l}$ festgesetzt werden.

2. Weiterhin sollte untersucht werden, ob durch NAC-Gabe eine zinkbedingte toxische Schädigung der Zellen durch Unterstützung der Glutathionsynthese vermindert wird. Um einen Effekt der Glutathionsynthesesteigerung durch NAC von dessen weiteren antioxidativen und zink-komplexierenden Eigenschaften unterscheiden zu können, sollte hierbei als Kontrolle das D-Enantiomer von NAC, das N-Acetyl-D-Cystein, dienen.

Durch unterschiedliche Cysteingehalte im Medium während der Inkubation mit Zinkchlorid und NAC wurde untersucht, ob das extrazelluläre Cysteinangebot den Nutzen der NAC-Substitution beeinflusst.

3. Als Nächstes interessierte, ob eine erhöhte Sensitivität der Alveolarepithelzellen gegenüber Zink nach Vorbehandlung mit Hydrocortison bei Unterstützung der Glutathionsynthese durch NAC wieder aufhebbar ist.

3. Materialien und Methoden

3.1 Geräte

Laminar Air Flow BSB 6, Fa. Flow, Meckenheim

CO₂-Auto-Zero Brutschrank, Fa. Heraeus, Hanau

Lichtmikroskop Axiovert 35M (Objektive 5x, 10x, 20x, 32x; Tubusfaktor 1x; Okular 10x),
Fa. Zeiss, Oberkochen

Eppendorf Zentrifuge 5414, Fa. Eppendorf Gerätebau, Netheler + Hinz, Hamburg

Rotanta R (Tischzentrifuge), Fa. Hettich, Tuttlingen

Eppendorf Mixer 5432, Fa. Eppendorf Gerätebau, Netheler + Hinz, Hamburg

Photometer Biochrom 4060, Fa. Pharmacia, Freiburg

Tri-Carb® Liquid Scintillation Analyser, Model 2.500 TR, Fa. Canberra Packard, Dreieich

3.2 Chemikalien und Reagenzien

Coomassie Brilliant Blau G 250, Fa. Serva, Heidelberg

5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoesäure (DTNB), Ellman's Reagenz, Fa. Sigma-Chemie,
Deisenhofen

Ethanol, Fa. Merck, Darmstadt

Glutathion (reduziert) (GSH), Fa. Sigma-Chemie, Deisenhofen

Glutathion (oxidiert) (GSSG), Fa. Sigma-Chemie, Deisenhofen

Glutathionreduktase, EC 1.6.4.2, aus Hefezellen, Fa. Boehringer, Mannheim

Hydrocortison, Fa. Sigma-Chemie, Deisenhofen

NADPH, Fa. Boehringer, Mannheim

N-Acetylcystein, Fa. Fluka Chemika, Neu-Ulm

N-Acetyl-D-cystein, Fa. Research Organics, Cleveland, USA

Perchlorsäure, Fa. Merck, Darmstadt

³⁵S-Methionin/Cystein-Gemisch, Fa. Hartmann Analytic, Braunschweig

Szintillationsflüssigkeit Ultima Gold, Fa. Canberra Packard, Dreieich

Triethanolaminhydrochlorid, Fa. Merck, Darmstadt

Triton X-100, Fa. Merck, Darmstadt

2-Vinylpyridin 97 %, Fa. Aldrich, Steinheim

Alle verwendeten Chemikalien und Reagenzien waren p. a. oder von höchster Qualität.

3.3 Puffer- und Reagenzlösungen

Salzlösungen:

Phosphat Buffered Saline (PBS): 0,2 g KCl, 0,2 g KH₂PO₄, 8,0 g NaCl und 1,15 g Na₂HPO₄ in 1000 ml H₂O lösen und an der Glaselektrode mit 2 M NaOH auf pH 7,6 eingestellt;

Reagenzien zur Proteinbestimmung:

Bradford-Puffer: 2,0 g Na₂HPO₄, 0,6 g KH₂PO₄, 7,0 g NaCl und 0,2 g NaN₃ in 1000 ml H₂O gelöst;

Bradford-Reagenz: 100 mg Coomassie Brilliant Blau G 250, 100 ml 16 M H₃PO₄ und 46,7 ml EtOH nach vollständiger Auflösung mit H₂O ad 1000 ml aufgefüllt und filtriert;

Rinderserumalbumin-Standard: 100 mg in 10 ml H₂O gelöst;

Reagenzien zur Glutathion- und Glutathionreduktase-Bestimmung:

Phosphat-Puffer (100 mmol/l): 6,81 g KH₂PO₄ bzw. 11,41 g K₂HPO₄ jeweils in 500 ml H₂O mit je 186 mg Na₂EDTA x 2 H₂O (1 mmol/l) getrennt angesetzt und an der Glaselektrode bis zum Erreichen eines pH von 7,0 gemischt;

Zinkstammlösung (10 mmol/l): 136 mg ZnCl₂ in 100 ml PBS gelöst und sterilfiltriert.

3.4 Zellkulturartikel

Sterile Zellkulturartikel wie 50 ml Schräghalskulturflaschen, Zentrifugenröhrchen (10, 15, 50 ml), sowie Petrischalen und Multi-Well-Schalen wurden von der Firma Nalge-Nunc, Wiesbaden, bezogen.

Kulturmedien und Reagenzien:

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

Minimum Essential Medium mit Hanks' Salzen und L-Glutamin (MEM), Fa. Gibco,
Eggenstein

Minimum Essential Medium mit Earle's Salzen, Fa. Gibco, Eggenstein

"Hanks's Balanced Salts"-Lösung (HBSS) ohne Ca²⁺/Mg²⁺, Fa. Gibco, Eggenstein

Penicillin-Streptomycin-Lösung (10000 IU/ml Penicillin, 10000 µg/ml Streptomycin),
Fa. Gibco, Eggenstein

Fetales Kälberserum (FCS), Fa. Boehringer, Mannheim

Glutamin-Lösung: 3,65 g L-Glutamin, Fa. Merck, Darmstadt, in 100 ml PBS gelöst und sterilfiltriert.

20 mg Trypsin Inhibitor Typ I-S, Fa. Sigma, Deisenhofen,
in 10 ml H₂O gelöst und sterilfiltriert; davon wurden 5 ml pro 500 ml Flasche MEM
zugesezt;

Trypsin-Lösung: Trypsin-EDTA (5 g/l Trypsin, 2 g/l EDTA), Fa. Gibco, Eggenstein,
1:20 mit PBS verdünnt

Dem Kulturmedium DMEM/F12 wurden pro 500 ml Flasche 2,5 ml Penicillin-Streptomycin-
Lösung, 5 ml Glutamin-Lösung sowie 5 oder 10 Vol. % FCS zugesezt.

3.5 Zellen

Alle für die Untersuchungen verwendeten Zelllinien wurden von der American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, Maryland, USA) bezogen. Dabei handelte es sich um die Lungenzelllinien L2 (Ratte) und A549 (Adenokarzinom, Mensch)⁴⁹.

Die Zellen wurden als tiefgefrorene Asservate importiert und in flüssigem Stickstoff gelagert. Bei Bedarf wurden Zellen aus dem Stammvorrat entnommen, nach Vorschrift aufgetaut und wie beschrieben (s. 3.6.1) kultiviert³⁶.

3.5.1 L2 Zellen

Diese Zelllinie wurde von der American Type Culture Collection (ATCC) etabliert. Sie stammt aus dem Bronchialtrakt der Ratte und wird in der Literatur als Alveolarepithelzelltyp verwendet. Die Zellen wurden nach 4 Passagen von der ATCC bezogen und weiter kultiviert.

3.5.2 A549 Zellen

Die humane Lungenkarzinomzelllinie A549, die oft dem Alveolarepithelzelltyp-II zugeordnet wird, stammt von einem 58-jährigen Karzinompatienten und wurde 1972 von D.J. Giard und Mitarbeiter initiiert^{82,90}. Untersuchungen der Arbeitsgruppe M. Lieber zeigen, dass diese Zelllinie zur Lecithinsynthese (Surfaktantbildung) fähig ist und multilamelläre Einschlußkörperchen bildet⁶⁵. Die Zellen wurden von der ATCC als Passage 77 erhalten.

3.6 Methoden

3.6.1 Zellkultur

Alle Zelllinien wurden in DMEM/F12 in wasserdampfgesättigter 5 % CO₂/Luft-Atmosphäre kultiviert. Nach 2 Tagen wurde das Medium abgesaugt und durch frische Nährlösung ersetzt. Nach Erreichen der Konfluenz wurden die Zellrasen passagiert. Dazu wurden sie nach Waschen mit Ca²⁺ und Mg²⁺ freiem HBSS mit einer Trypsin-Lösung inkubiert. Nach Ablösen der Zellen und nachfolgender Zugabe eines Trypsin-Inhibitors wurden die Zellen durch Zentrifugation (bei ca. 200 G) sedimentiert. Das Zellsediment wurde in DMEM/F12 resuspendiert und anschließend in Multiwells oder Kulturflaschen ausplattiert. Die Versuche wurden an konfluent gewachsenen Zellrasen durchgeführt; der Proteingehalt war von Zelllinie zu Zelllinie verschieden und lag bei L2 Zellen zwischen 50 und 100µg pro Well (ca. 2cm²) und zwischen 100 und 200µg pro Well bei A549 Zellen.

3.6.2 Vorbehandlung der Zellen mit Hydrocortison und N-Acetylcystein

Die Vorbehandlung mit dem Glukokortikoid Hydrocortison erfolgte im Standardkulturmedium der jeweiligen Zelllinie bei Konzentrationen von 100 µmol/l für 72 Stunden. Bei dem routinemäßigen Auswechseln der Nährlösung wurde erneut dieselbe Konzentration Hydrocortison zugesetzt.

Zum Lösen des Hydrocortisons wurde Ethanol in einer Endkonzentration von 0,1 % im Medium benötigt. Alle Kontrollen ohne Hydrocortison enthielten die entsprechende Ethanol-Konzentration.

Bei einer Versuchsreihe wurden die Zellen zusätzlich einer 24-stündigen Vorbehandlung mit N-Acetylcystein in einer Konzentration von 200 µmol/l unterzogen, die in den letzten 24 Stunden der Hydrocortison-Vorbehandlung stattfand. Dabei wurde die Nährlösung ausgewechselt und erneut gleiche Konzentration von Hydrocortison zugesetzt.

3.6.3 Inkubation der Zellen mit N-Acetylcystein und N-Acetyl-D-cystein

Bei einer anderen Versuchsreihe erfolgte die N-Acetylcystein Zugabe während der Zinkchloridinkubation (siehe 3.6.4). Die Inkubation erfolgte bei Konzentrationen von 200 $\mu\text{mol/l}$ für 3 Stunden bei L2 und 4 Stunden bei A549 Zellen. Als Kontrolle diente dazu die Behandlung mit 200 $\mu\text{mol/l}$ N-Acetyl-D-cystein.

Es wurden drei unterschiedliche Versuchsreihen durchgeführt, bei denen die Cystein - Konzentration im Medium während der Inkubation mit NAC bzw. NADC und Zinkchlorid variiert wurde und jeweils 1, 10 und 100 $\mu\text{mol/l}$ betrug.

3.6.4 Inkubation der Zellen mit Zinkchlorid

Vor Inkubation mit Zinkchlorid wurden die Zellen mit MEM gewaschen. Danach wurden sie konzentrationsabhängig mit Zinkchlorid in MEM (mit Hanks' Salzen und L-Glutamin) bei 37°C in 5 % CO₂/Luft-Atmosphäre inkubiert. Zinkchlorid wurde von einer 10 mmol/l Fertiglösung entnommen.

Für die L2 Zellen wurden dabei Konzentrationen im Bereich von 0 bis 200 $\mu\text{mol/l}$ für insgesamt 3 Stunden, für die A549 Zellen im Bereich von 0 bis 200 $\mu\text{mol/l}$ Zink für 4 Stunden eingesetzt.

3.6.5 Bestimmung der Methionineinbauraten

In den letzten 60 Minuten der Inkubation mit Zinkchlorid wurden die Zellen mit radioaktiv markiertem ³⁵S-Methionin/Cystein –Gemisch (Methionin ca. 75 %, Cystein ca.25 %, etwa 40 KBq/Zellrasen) unter Beibehaltung der jeweiligen Zinkkonzentration in MEM mit Earle's Salzen inkubiert. Zuvor wurde die Konzentration von nicht radioaktiv markiertem Methionin im Medium auf 15 $\mu\text{mol/l}$ reduziert.

Anschließend wurden die Zellrasen, nach Auswaschen der nicht aufgenommenen Radioaktivität, mit 0,33 mol/l Perchlorsäure (HClO₄), 1 mmol/l EDTA aufgeschlossen und die Radioaktivität der säurelöslichen Fraktion gemessen.

Der präzipitierte Proteinanteil wurde nachfolgend mit 0,5 mol/l NaOH, 1 % SDS gelöst und die enthaltene Radioaktivität bestimmt. Die Radioaktivitätsmessungen erfolgten nach

Zumischung von Szintillationsflüssigkeit in einem TriCarb 2500 TR Gerät. Die Messwerte der NaOH-Fraktion wurden in Methioninäquivalenten berechnet. Die Werte wurden jeweils in Prozent zur jeweiligen Kontrolle ohne Zinkchloridzusatz ausgedrückt.

Tabelle 1: Methionineinbaurate und cytosolischer Methionin/Cysteingehalt von L2 Zellen

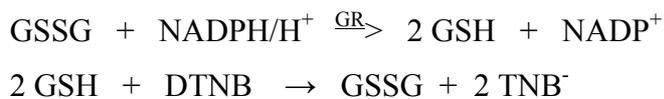
Angegeben sind Mittelwert und Standardabweichung von sechs (n=6) unabhängigen Versuchen

Zinkchlorid [µmol/l]	in zelluläre Proteine eingebautes Methionin		zytosolischer Methionin/Cysteingehalt	
	[Anteil an angebotener Gesamtaktivität]	[% der Kontrolle ohne Zink]	[Anteil an angebotener Gesamtaktivität]	[% der Kontrolle ohne Zink]
0	0,64 ± 0,25	100 ± 0	0,52 ± 0,1	100,0 ± 0
15	0,63 ± 0,17	94,6 ± 7,1	0,51 ± 0,1	96,9 ± 5,2
25	0,41 ± 0,13	86,1 ± 3,7	0,56 ± 0,11	106,9 ± 8,7
50	0,33 ± 0,31	42,8 ± 3,1	0,36 ± 0,3	68,1 ± 6,4
75	0,22 ± 0,12	42,2 ± 8,4	0,59 ± 0,2	111,7 ± 7,7
100	0,19 ± 0,03	31 ± 5,6	0,54 ± 0,04	102,5 ± 5,8
150	0,11 ± 0,03	18,8 ± 6,1	0,41 ± 0,16	78,5 ± 3,2
200	0,09 ± 0,01	16,9 ± 4,1	0,18 ± 0,1	34,5 ± 3,1

Anschließend wurden mit Hilfe einer sigmoiden Funktion EC₅₀ -Werte für jeweilige Dosis-Wirkungs-Kurve berechnet (siehe 3.6.9).

3.6.6 Bestimmung des Glutathiongehaltes

Die Bestimmung des oxidierten bzw. reduzierten Glutathiongehaltes in den Zellen erfolgte nach einer Methode nach Tietze ¹¹⁵. Zunächst wird GSSG zu 2 GSH umgewandelt. Das passiert enzymatisch durch die Glutathionreduktase (GR) unter Verbrauch von NADPH/H⁺. Das reduzierte GSH reduziert DTNB zu 2-Nitro-Thiobenzoessäure, dessen Lichtabsorption bei 412nm gemessen wird.



Dazu wurden die Zellen mit 350 µl 0,33 mol/l Perchlorsäure aufgeschlossen, und der Säureaufschluss mit Triethanolamin neutralisiert (pH 6,5-7,5). Zur Bestimmung des Gesamtglutathions wurden 100 µl der Perchlorsäurefraktion mit NADPH (240 µmol/l), DTNB (56 µmol/l), (angegeben ist jeweils die Endkonzentration in der Küvette) und 815 µl Phosphatpuffer versetzt. Nach Zugabe von 30 µl Glutathionreduktase wurde anschließend die Extinktionszunahme durch die Bildung des gefärbten TNB⁻ Anions (Reduktionsprodukt aus DTNB) bei 412 nm verfolgt.

Die Messung des oxidierten Glutathions (GSSG) erfolgte nach gleicher Methode, jedoch nach Reaktion der neutralisierten Säurefraktion mit 2-Vinylpyridin (100 µl Probe + 2 µl 2-Vinylpyridin) sowie Abdampfen von überschüssigem 2-Vinylpyridin für insgesamt 1 Stunde, Das in der neutralisierten Säurefraktion vorhandene, reduzierte Glutathion wurde durch dieses Vorgehen nicht mehr erfasst .

Aus der Steigung der Extinktionszunahmekurve bei 412 nm konnten mithilfe von Eichkurven mit oxidiertem Glutathion die Werte des Glutathiongehaltes der Zellen ermittelt werden. Die Bestimmung der GSH bzw. GSSG - Konzentration erfolgte durch Vergleich der gemessenen Steigung der Extinktionszunahmekurve mit der Steigung der Eichgerade: $\Delta E/\Delta t = c * m + b$, wobei $\Delta E/\Delta t$ die Extinktionsänderung , c die GSH/ GSSG –Konzentration , m die Steigung und b der Achsenabschnitt der Eichgerade ist.

Die Werte wurden auf den nach der Bradford-Methode bestimmten Proteingehalt bezogen. Eine Beeinflussung des Tests durch Zink oder Hydrocortison wurde ausgeschlossen ¹²⁰. Anschließend wurden mit Hilfe einer sigmoiden Funktion EC₅₀ -Werte für jeweilige Dosis-Wirkungs-Kurve berechnet (siehe 3.6.9).

3.6.7 Bestimmung der Glutathionreduktase - Aktivität

Die Aktivität der Glutathionreduktase wurde mit einem modifizierten Tietze-Assay gemessen⁹⁵. Dafür wurde der Zellrasen mit PBS gewaschen, mit 200 µl 0,1 % Triton X-100 abgelöst, in die Messküvette übergeführt, und unter Zusatz von DTNB (Endkonzentration 81 µmol/l) und Phosphatpuffer (0.1 mol/l, pH 7.0, 1 mmol/l EDTA) die Extinktionsänderung bei $\lambda = 412$ nm für 4 min (Verbrauch von zellulärem GSH und NADPH) verfolgt. Nach Einstellung einer konstanten Absorption wurde die Reaktion durch Zugabe von NADPH (Endkonzentration 205 µmol/l) und GSSG (Endkonzentration 0,5 mmol/l) erneut gestartet. Aus der linearen Anfangssteigung konnte mittels externer Kalibrierung mit Glutathionreduktase die Enzymaktivität in dem Testansatz bestimmt werden.

3.6.8 Proteinbestimmung

Zur Messung des Proteingehalts wurde die Methode nach Bradford in einer modifizierten Form verwendet⁹². Nach Waschen des Zellrasens mit PBS wurde das Protein der Zellen mit 200 µl 0,5 mol/l NaOH gelöst und einer alkalischen Hydrolyse unterzogen (14 h, 37°C). Die Reaktion wurde durch eine 1:10 Verdünnung des Ansatzes mit Bradford-Puffer gestoppt. Die verdünnte Probe wurde im Verhältnis 1:20 mit Bradford-Reagenz versetzt, und nach 15 min die Extinktionsänderung bei $\lambda = 595$ nm gegen den Leerwert (Bradford-Puffer und Bradford-Reagenz im Verhältnis 1:20) bestimmt. Der Proteingehalt wurde durch eine externe Kalibrierung mit Rinderserumalbumin berechnet:

3.6.9 Statistik

In den Abbildungen und Tabellen sind die Mittelwerte aus n Einzelversuchen sowie die dazugehörige Standardabweichungen dargestellt. Es wurde auf signifikante Unterschiede zwischen den Mittelwerten des Prüf- und Kontrollgruppenpaars mit dem t-Test für unverbundene Stichproben nach Student geprüft. Als Signifikanzgrenze für die Irrtumswahrscheinlichkeit wurde $p \leq 0,05$ festgesetzt.

Die Berechnung der EC_{50} erfolgte mithilfe des Programms Sigma-Plot[®] (Jandel Scientific, S. Raffaelo, California, USA) nach Anpassung einer sigmoiden Dosis-Wirkungs-Kurve (logistische Funktion mit vier Parametern):

$$y = a - \frac{(a - b)}{1 + \left(\frac{x}{c}\right)^d}$$

(wobei: a = obere Grenze, b = untere Grenze, c = EC_{50} , d = Hill-Koeffizient, x = Zinkkonzentration, y = gemessene Parameter)

4. Ergebnisse

Die Versuchsreihen wurden mit den Zelllinien L2 und A549 durchgeführt. Alle Zelllinien wurden mit 100 $\mu\text{mol/l}$ Hydrocortison für 72 Stunden vorbehandelt, bevor eine Inkubation mit verschiedenen Zinkkonzentrationen stattfand.

Bei einigen Versuchsreihen wurden die Zellen gleichzeitig mit Hydrocortison und N-Acetylcystein vorbehandelt und anschließend mit den verschiedenen Zinkkonzentrationen inkubiert.

Bei den anderen Versuchsreihen wurden die mit Hydrocortison vorbehandelten Zellen anschließend simultan zu Zink auch mit N-Acetylcystein inkubiert. Als Kontrolle dienten dazu die mit 200 $\mu\text{mol/l}$ N-Acetyl-D-cystein inkubierten Ansätze.

Bei den Versuchsreihen der Inkubation mit N-Acetylcystein wurde die Cysteinkonzentration im Medium zwischen jeweils 1, 10 bzw. 100 $\mu\text{mol/l}$ variiert.

L2 Zellen wurden für insgesamt drei Stunden und A549 Zellen für vier Stunden mit Zinkchlorid inkubiert.

Als Parameter für die toxische Zellschädigung wurden die durch Zink induzierte Glutathiondepletion, der Anstieg des Verhältnisses vom oxidierten und reduzierten Glutathion und die intrazelluläre Proteinsynthesehemmung bestimmt.

In den Dosiswirkungskurven sind die Ergebnisse in Prozent zur jeweiligen Kontrolle angegeben. Die Kontrolle entspricht dabei dem nicht mit Zinkchlorid inkubierten Zellansatz.

In den Abbildungen sind die Mittelwerte der jeweiligen Absolutwerte oder der berechneten EC_{50} Werte aus den Dosiswirkungskurven sowie die dazugehörigen Standardabweichungen dargestellt.

4.1 Einfluss einer Vorbehandlung mit Hydrocortison

4.1.1 Einfluss einer Vorbehandlung mit Hydrocortison auf den zellulären Proteingehalt

Nach 72-stündiger Vorbehandlung mit Hydrocortison fand sich eine regelmäßige Minderung des zellulären Proteingehaltes des Zellrasens, die bei L2 Zellen im Mittel 76 % (n=19) und bei A549 Zellen 92 % (n=3) betrug (ohne Abbildung). In den anderen Versuchsreihen, bei denen Zellen zusätzlich zu Hydrocortison auch mit N-Acetylcystein vorbehandelt waren, fand sich eine gleichartige Abnahme des Proteingehaltes (Abbildung 1)

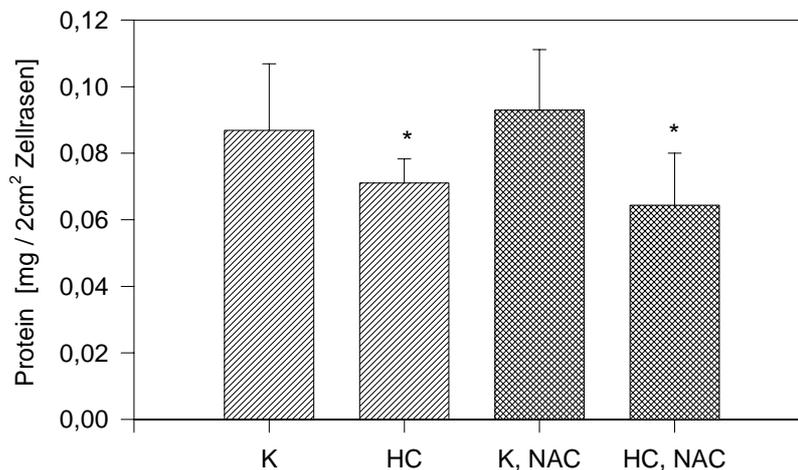


Abbildung 1

Zelluläre Proteingehalte in L2 Zellen nach Inkubation mit N-Acetylcystein und Hydrocortison

Die L2 Zellen wurden für 72 h mit 100 $\mu\text{mol/l}$ Hydrocortison inkubiert, in den letzten 24 h wurden teilweise 200 $\mu\text{mol/l}$ N-Acetylcystein zugesetzt. Anschließend wurde die Proteinmenge in mg pro 2 cm² Zellrasen mit der Methode nach Bradford ermittelt.

Angegeben sind Mittelwert und Standardabweichung von sechs (n=6) unabhängigen Versuchen.

* $p \leq 0,05$; t-Test für unabhängige Stichproben (nach Student) gegen jeweilige Kontrolle ohne Hydrocortison.

Zusätzlich fiel ein beträchtlicher Unterschied im Proteingehalt der beiden verwendeten Zelllinien auf, wobei die aus einem humanen Adenokarzinom der Lunge stammende Zelllinie A549 eine doppelte bis dreifache Menge an Protein in Vergleich zu den L2 Zellen (Alveolarepithelzellen aus dem Bronchialtrakt einer Ratte) bei konfluenten Zellrasen aufwies. (Abbildung 2)

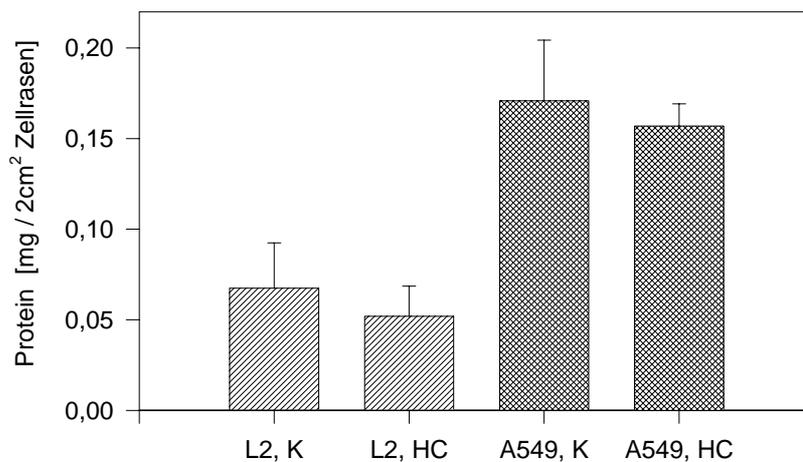


Abbildung 2

Zelluläre Proteingehalte in L2 bzw. A549 Zellen nach Inkubation mit Hydrocortison

Beide Zelllinien wurden für 72 h mit 100 µmol/l Hydrocortison inkubiert (Kontrollen kein Hydrocortison). Anschließend wurde die Proteinmenge in mg pro 2 cm² Zellrasen mit der Methode nach Bradford bestimmt.

Angegeben sind Mittelwert und Standardabweichung von zwölf (n=12) unabhängigen Versuchen der L2 Zellen bzw. drei (n=3) der A549 Zellen.

4.1.2 Einfluss einer Vorbehandlung mit Hydrocortison auf die zelluläre Aktivität der Glutathionreduktase

Es wurde untersucht, ob die Vorbehandlung mit Hydrocortison zu einer Änderung der intrazellulären Glutathionreduktase-Aktivität geführt hat.

Bei den gemessenen Absolutwerten der Enzymaktivität fielen signifikant niedrigere Werte bei den mit Hydrocortison vorbehandelten Zellen gegenüber den unbehandelten Proben auf (Abbildung 3).

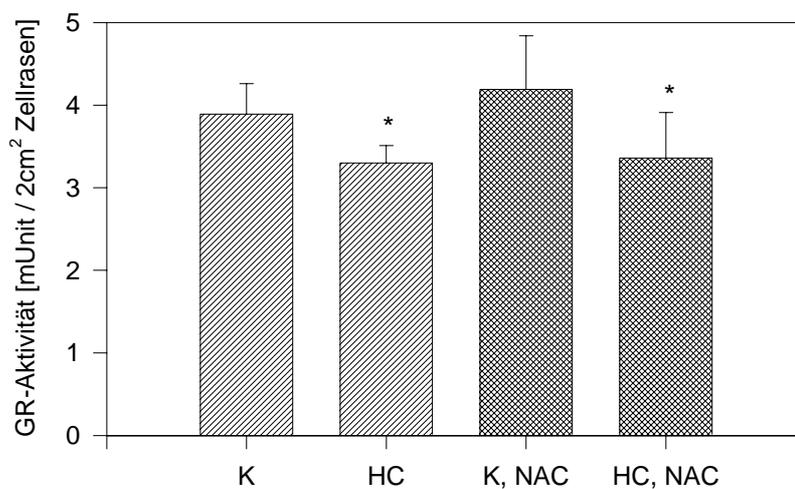


Abbildung 3

Aktivität der Glutathionreduktase in L2 Zellen nach Vorbehandlung mit Hydrocortison und N-Acetylcystein

Die L2 Zellen wurden für 72 h mit 100 $\mu\text{mol/l}$ Hydrocortison vorbehandelt. In den letzten 24 h wurden teilweise 200 $\mu\text{mol/l}$ N-Acetylcystein zugesetzt. Anschließend wurde die Aktivität der Glutathionreduktase mit der Methode nach Tietze gemessen.

Angegeben sind Mittelwert und Standardabweichung von sechs ($n=6$) unabhängigen Versuchen, in mUnits pro 2 cm^2 Zellrasen.

* $p \leq 0,05$; t-Test für unabhängige Stichproben (nach Student) gegen jeweilige Kontrolle ohne Hydrocortison.

Bezieht man jedoch die Glutathionreduktase-Aktivität auf die jeweilige Proteinmenge der Probe, wird deutlich, dass der Effekt der Glutathionreduktaseaktivitätsminderung durch die Vorbehandlung mit Hydrocortison proportional zur Minderung des Proteingehaltes verläuft (Abbildung 4).

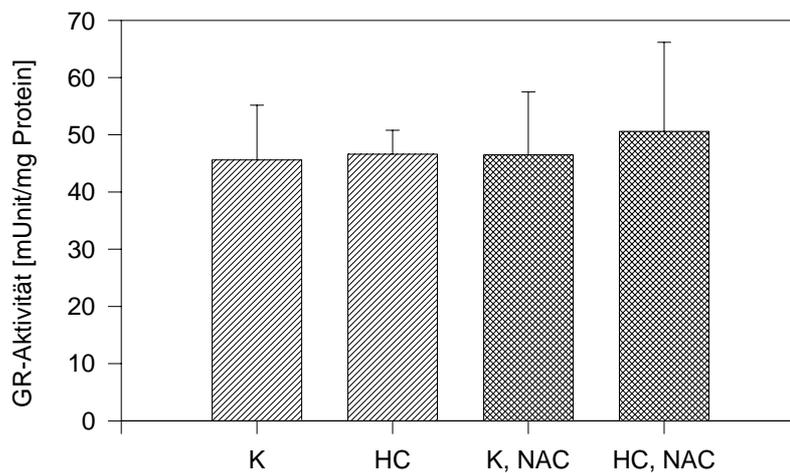


Abbildung 4

Aktivität der Glutathionreduktase bezogen auf den Proteingehalt der Probe in L2 Zellen nach Vorbehandlung mit N-Acetylcystein und Hydrocortison

Die L2 Zellen wurden für 72 h mit 100 µmol/l Hydrocortison vorbehandelt, in den letzten 24 h wurden teilweise 200 µmol/l N-Acetylcystein zugesetzt. Anschließend wurde die Aktivität der Glutathionreduktase mit der Methode nach Tietze in mUnit gemessen und auf den Proteingehalt der jeweiligen Probe in mg bezogen.

Angegeben sind Mittelwert und Standardabweichung von sechs (n=6) unabhängigen Versuchen.

4.1.3 Einfluss einer Vorbehandlung mit Hydrocortison auf die zink-bedingte Glutathiondepletion

Des Weiteren wurde geprüft, ob nach der Vorbehandlung mit Hydrocortison eine Änderung des zink-bedingten zellulären Glutathiongehaltes auftritt.

Dabei kam es zu einer für Zink konzentrationsabhängigen Glutathiondepletion, entsprechend einer Dosis-Wirkungskurve, bei sowohl mit Hydrocortison vorbehandelten Zellen als auch bei den Kontrollen ohne Vorbehandlung. Dieser Effekt war gleichermaßen sowohl bei L2 Zellen (ohne Vorbehandlung mit NAC in Abbildung 5, 6; nach Vorbehandlung mit NAC in Abbildung 11), als auch bei A549 (ohne Abbildung) festzustellen. Es fiel jedoch eine noch

stärkere Zunahme der Glutathiondepletion bei den Zellen, die mit Hydrocortison vorbehandelt waren, auf.

So zeigt sich in der Abbildung 5 anhand der Linksverschiebung der Kurve der mit Hydrocortison vorbehandelten Zellen gegenüber den Kontrollen eine verstärkte zink-bedingte Glutathiondepletion. Der Glutathiongehalt von L2 Zellen ist nach Inkubation mit 15 $\mu\text{mol/l}$ Zinkchlorid zunächst um ca. 20 % erhöht ($p \leq 0,01$ nur für Kontrolle ohne HC). Bei Erhöhung der Zinkchloridkonzentration auf 75 $\mu\text{mol/l}$ wurde der Glutathiongehalt der unbehandelten Zellen nur wenig beeinflusst, wobei er bei den mit HC vorbehandelten Zellen auf nahezu 50% absank. Bei einer Zinkkonzentration von 100 $\mu\text{mol/l}$ fielen die Glutathiongehalte für Kontrollen bzw. mit HC vorbehandelten Zellen auf jeweils 60 bzw. 30 % des Kontrollwertes ohne Zinkchlorid.

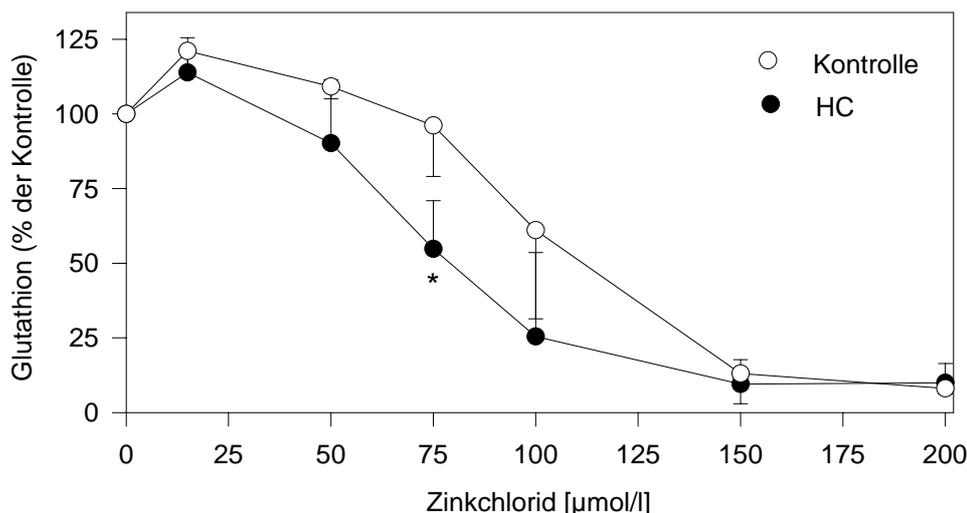


Abbildung 5

Einfluß von Zinkchlorid auf die relative zelluläre Glutathionkonzentration in L2 Zellen nach Vorbehandlung mit Hydrocortison

Die L2 Zellen wurden für 72 h mit 100 $\mu\text{mol/l}$ Hydrocortison vorbehandelt. Anschließend wurden die Zellen für 3 h mit Zinkchlorid und 200 $\mu\text{mol/l}$ N-Acetylcystein bzw. N-Acetyl-D-cystein bei 10 $\mu\text{mol/l}$ Cystein im Medium inkubiert (dargestellt sind nur die mit NAC inkubierte Ansätze). Nachfolgend wurden die zellulären Glutathiongehalte mit der Methode nach Tietze bestimmt und in Prozent zur jeweiligen Kontrolle angegeben. Die Kontrolle entsprach dabei dem nicht mit Zinkchlorid inkubierten Zellansatz und betrug zwischen 0,3 und 2,1 nmol Glutathion pro 2 cm^2 Zellrasen.

Angegeben sind Mittelwert und Standardabweichung von drei ($n=3$) unabhängigen Versuchen
* $p \leq 0,05$; t-Test für unabhängige Stichproben (nach Student) gegen entsprechende Kontrolle ohne Hydrocortison.

Dementsprechend verhielten sich auch die EC_{50} Werte der beiden Dosiswirkungskurven mit einer allerdings jeweils nicht signifikanten Minderung nach Vorbehandlung mit Hydrocortison (Abbildung 6).

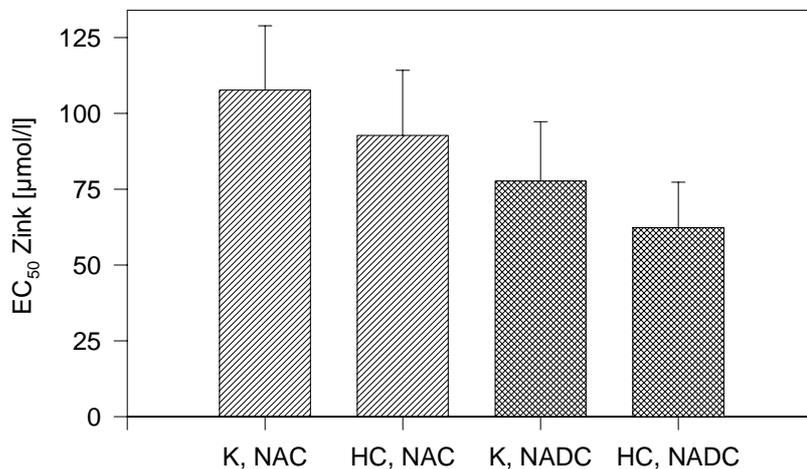


Abbildung 6

EC_{50} von Zink für Glutathiondepletion in L2 Zellen nach Vorbehandlung mit Hydrocortison

Die L2 Zellen wurden für 72 h mit 100 $\mu\text{mol/l}$ Hydrocortison vorbehandelt. Anschließend wurden die Zellen für 3 h mit Zinkchlorid und 200 $\mu\text{mol/l}$ N-Acetylcystein bzw. N-Acetyl-D-cystein bei 10 $\mu\text{mol/l}$ Cystein im Medium inkubiert. Aus den Dosiswirkungskurven der Glutathiondepletion wurden die EC_{50} Werte von Zinkchlorid ermittelt und als Säulendiagramm aufgetragen.

Angegeben sind Mittelwert und Standardabweichung von drei ($n=3$) unabhängigen Versuchen.

4.1.4 Einfluss einer Vorbehandlung mit Hydrocortison auf den zink-bedingten Anstieg des GSSG/GSH Verhältnisses

Das intrazelluläre Verhältnis von oxidiertem zum reduzierten Glutathion stellt einen empfindlichen Parameter für oxidativen Stress dar. Diese Verschiebung zu Gunsten des oxidierten Glutathions war erwartungsgemäß von der Zinkkonzentration abhängig.

Durch die Vorbehandlung mit Hydrocortison konnte außerdem bei beiden Zelllinien eine Zunahme des zinkbedingten Anstieges dieses Verhältnisses beobachtet werden (L2 Zellen in Abbildung 7, A549 Zellen ohne Abbildung).

In der Abbildung 7 ist der Kurvenverlauf der mit Hydrocortison vorbehandelten Zellen nach links im Vergleich zu der entsprechenden Kontrolle ohne Vorbehandlung verschoben, was auch der signifikante Unterschied der EC_{50} Werte der beiden Kurven bestätigt. Bei einer Zinkkonzentration von 75 $\mu\text{mol/l}$ unterschied sich deren Anstieg um 10 %, bei 100 $\mu\text{mol/l}$ schon um über 20 %. Unter der höchsten verwendeten Zinkchloridkonzentration lag das zelluläre Glutathion der unbehandelten Zellen noch zu über 60 % in reduzierter Form vor, wobei es bei mit HC vorbehandelten Zellen nahezu vollständig oxidiert war. Bei einer Zinkbelastung von 150 und 200 $\mu\text{mol/l}$ zeigte sich ein signifikanter Unterschied im GSSG/GSH Verhältnis von mit Hydrocortison vorbehandelten Zellen und entsprechenden Kontrollen ohne Vorbehandlung (Abbildung 7).

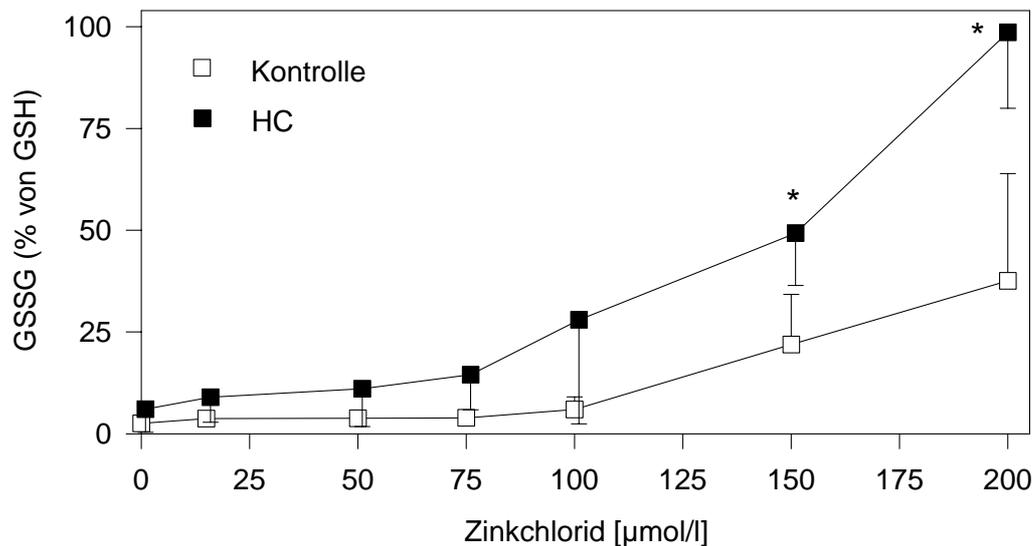


Abbildung 7

Einfluß von Zink auf den Anteil des GSSG am GSH in L2 Zellen nach Vorbehandlung mit Hydrocortison

Die L2 Zellen wurden für 72 h mit 100 $\mu\text{mol/l}$ Hydrocortison vorbehandelt. Anschließend wurden die Zellen für 3 h mit Zinkchlorid und 200 $\mu\text{mol/l}$ N-Acetylcystein bzw. N-Acetyl-D-cystein bei 1 $\mu\text{mol/l}$ Cystein im Medium inkubiert. Nachfolgend wurden zelluläre Gehalte von oxidiertem (GSSG) und gesamten (GSH) Glutathion gemessen und prozentual aufeinander bezogen.

Angegeben sind Mittelwert und Standardabweichung von sechs ($n=6$) unabhängigen Versuchen.

* $p \leq 0,05$; t-Test für unabhängige Stichproben (nach Student) gegen jeweilige Kontrolle ohne Hydrocortison.

4.1.5 Einfluss einer Vorbehandlung mit Hydrocortison auf die zinkbedingte Proteinsynthesehemmung

Die Messung der Proteinsynthese wurde als ein weiterer Parameter für die Zellschädigung durch die toxische Zinkwirkung gewählt. Die Proteinsyntheseleistung der Zellen wurde anhand der Einbaurrate von radioaktiv markiertem Methionin gemessen und als zink-induzierte Methionineinbauhemmung berechnet.

Es kam zu einer Abnahme der intrazellulären Proteinsynthese durch die Zinkbelastung. Eine Vorbehandlung mit Hydrocortison führte zusätzlich sowohl bei A549 (Abbildung 8) als auch bei L2 Zelllinien (Abbildung 9 für Versuche mit simultaner Inkubation mit NAC bzw. NADC; Abbildung 13 für Versuche nach Vorbehandlung mit NAC) zu einer stärker ausgeprägten Proteinsynthesehemmung.

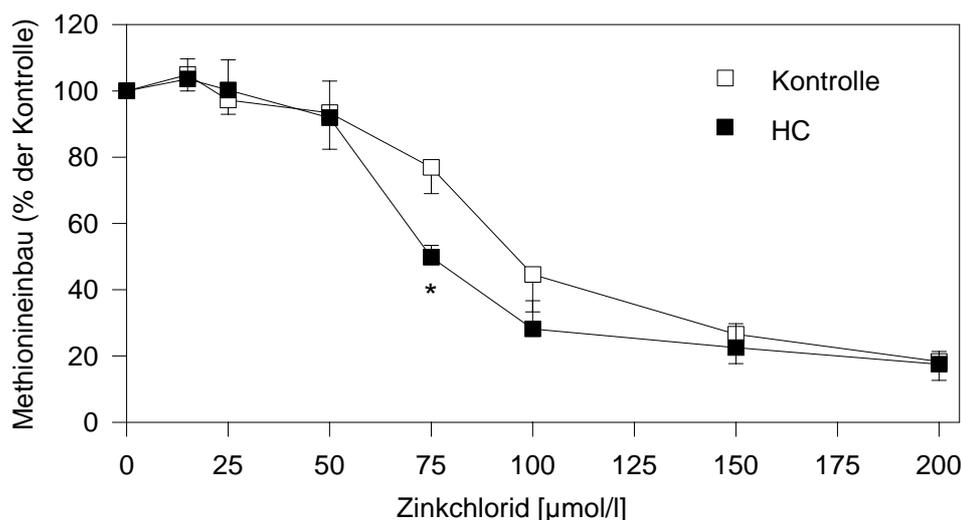


Abbildung 8

Methionineinbau in A549 Zellen nach Vorbehandlung mit Hydrocortison

Die A549 Zellen wurden für 72 h mit 100 µmol/l Hydrocortison vorbehandelt. Anschließend wurden die Zellen für 4 h mit Zinkchlorid und 200 µmol/l N-Acetylcystein bzw. N-Acetyl-D-cystein bei 100 µmol/l Cystein im Medium inkubiert (dargestellt sind nur die mit NADC inkubierten Ansätze). Anschließend wurde der ³⁵S-Methionineinbau bestimmt und in Prozent zur jeweiligen Kontrolle angegeben. Die Kontrollen entsprachen dabei dem nicht mit Zinkchlorid inkubierten Zellansatz.

Angegeben sind Mittelwert und Standardabweichung von drei (n=3) unabhängigen Versuchen.

$p \leq 0,05$; t-Test für unabhängige Stichproben (nach Student) gegen entsprechende Kontrolle ohne Hydrocortison.

Bei den EC_{50} Werten für die Methionineinbauhemmung beobachtete man bei beiden Zelllinien ebenfalls eine zum Teil signifikante Minderung der Proteinsynthese nach Vorbehandlung mit Hydrocortison (Abbildung 9).

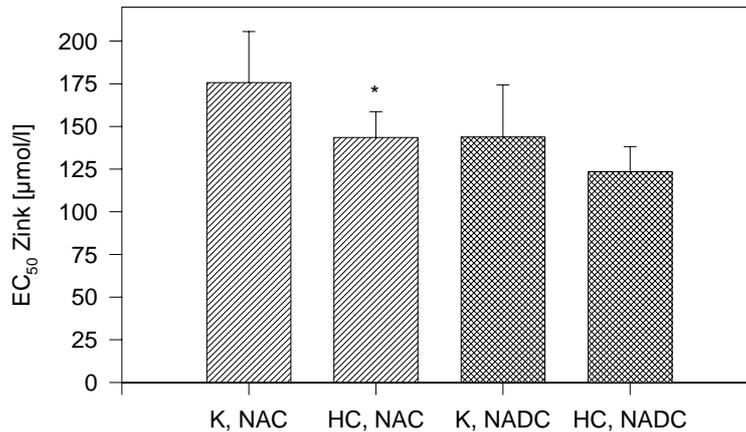


Abbildung 9

EC_{50} von Zink zur Methionineinbauhemmung in L2 Zellen nach Vorbehandlung mit Hydrocortison

Die L2 Zellen wurden für 72 h mit 100 $\mu\text{mol/l}$ Hydrocortison vorbehandelt. Anschließend wurden die Zellen für 3 h mit Zinkchlorid und 200 $\mu\text{mol/l}$ N-Acetylcystein bzw. N-Acetyl-D-cystein bei 1 $\mu\text{mol/l}$ Cystein im Medium inkubiert. Anschließend wurde der ^{35}S -Methionineinbau bestimmt. Aus den Dosiswirkungskurven der Methionineinbauhemmung wurden die EC_{50} Werte von Zinkchlorid ermittelt und als Säulendiagramm aufgetragen. Angegeben sind Mittelwert und Standardabweichung von sechs ($n=6$) unabhängigen Versuchen.

* $p \leq 0,05$; t-Test für unabhängige Stichproben (nach Student) gegen entsprechende Kontrolle ohne Hydrocortison.

4.2 Einfluss einer Vorbehandlung mit N-Acetylcystein

Bei dieser Versuchsreihe wurden die Zellen zunächst für 72 h mit 100 $\mu\text{mol/l}$ Hydrocortison vorbehandelt, wobei in den letzten 24 h zusätzlich 200 $\mu\text{mol/l}$ N-Acetylcystein zugegeben wurde. Die Ansätze ohne Hydrocortison und N-Acetylcystein entsprachen den Kontrollen. Anschließend wurden L2 Zellen für insgesamt drei Stunden mit unterschiedlichen Zinkchloridkonzentrationen (ohne Hydrocortison und ohne N-Acetylcystein) inkubiert. Bei dieser Versuchsreihe lag das Interesse am Effekt der Vorbehandlung mit N-Acetylcystein auf die Empfindlichkeit der Zellen gegenüber Zink.

4.2.1 Einfluss einer Vorbehandlung mit N-Acetylcystein auf zellulären Glutathiongehalt und Glutathionreduktase-Aktivität

Eine Vorbehandlung mit N-Acetylcystein, während deren die Zellen unter keiner toxischen Einwirkung von Zink standen, führte weder zu einer Erhöhung des zellulären Glutathiongehaltes (Abbildung 10) noch zu einer Erhöhung der Glutathionreduktase-Aktivität. (Abbildung 3, 4; Kap. 4.1.2).

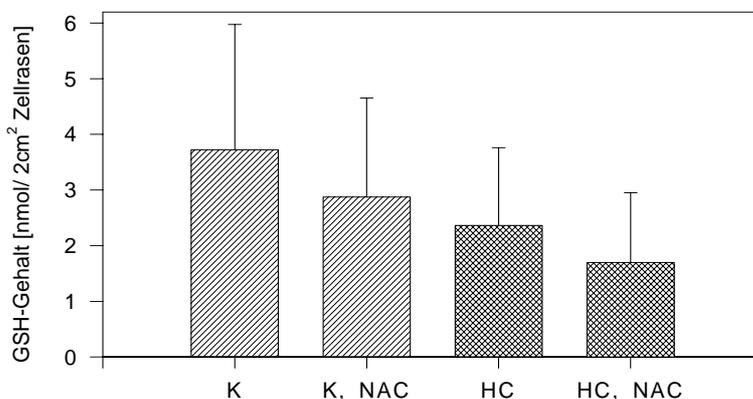


Abbildung 10

Glutathiongehalte in L2 Zellen nach Vorbehandlung mit N-Acetylcystein und Hydrocortison

Die L2 Zellen wurden für 72 h mit 100 $\mu\text{mol/l}$ Hydrocortison vorbehandelt, in den letzten 24 h wurden 200 $\mu\text{mol/l}$ N-Acetylcystein zugesetzt. Anschließend wurden die zellulären Glutathiongehalte mit der Methode nach Tietze in nmol pro 2 cm² Zellrasen bestimmt.

Angegeben sind Mittelwert und Standardabweichung der nicht mit Zink inkubierten Ansätze von sechs (n=6) unabhängigen Versuchen.

4.2.2 Einfluss der Vorbehandlung mit N-Acetylcystein auf die zink-bedingte Glutathiondepletion, GSSG/GSH Verhältnis und Proteinsynthesehemmung

Durch die Vorbehandlung mit N-Acetylcystein ergab sich eine tendenzielle Minderung der Zellempfindlichkeit gegenüber einer nachfolgenden Inkubation mit Zinkchlorid. Weder für die Glutathiondepletion (Abbildung 11) noch für das GSSG/GSH Verhältnis (Abbildung 12) oder für die Proteinsynthesehemmung (Abbildung 13) waren jedoch signifikant veränderte EC_{50} Werte nach Vorbehandlung mit N-Acetylcystein nachzuweisen.

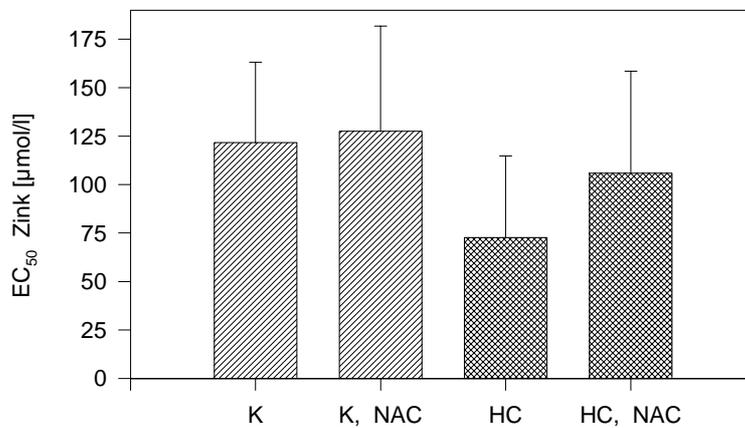


Abbildung 11

EC_{50} Werte von Zink zur Glutathiondepletion in L2 Zellen nach Vorbehandlung mit N-Acetylcystein und Hydrocortison

Die L2 Zellen wurden zunächst für 72 h mit 100 $\mu\text{mol/l}$ Hydrocortison vorbehandelt, in den letzten 24 h wurden 200 $\mu\text{mol/l}$ N-Acetylcystein zugesetzt. Anschließend wurden die Zellen für 3 h mit Zinkchlorid ohne HC und ohne NAC bei 100 $\mu\text{mol/l}$ Cystein im Medium inkubiert. In der letzten Stunde der Zinkbelastung wurde den Zellen ein frisches Medium mit radioaktiv markiertem Methionin angeboten. Anschließend wurden die Zellen mit Perchlorsäure aufgeschlossen und diese Fraktion für die nachfolgende Glutathionbestimmung verwendet. Der Zellrasen wurde dann mit 0,5 N NaOH gelöst und für die Bestimmung der Methionineinbau verwendet. Die zellulären Glutathiongehalte wurden mit der Methode nach Tietze gemessen. Aus den Dosiswirkungskurven der zink-bedingten Glutathiondepletion wurden die EC_{50} Werte von Zinkchlorid ermittelt und als Säulendiagramm aufgetragen. Angegeben sind Mittelwert und Standardabweichung von fünf ($n=5$) unabhängigen Versuchen.

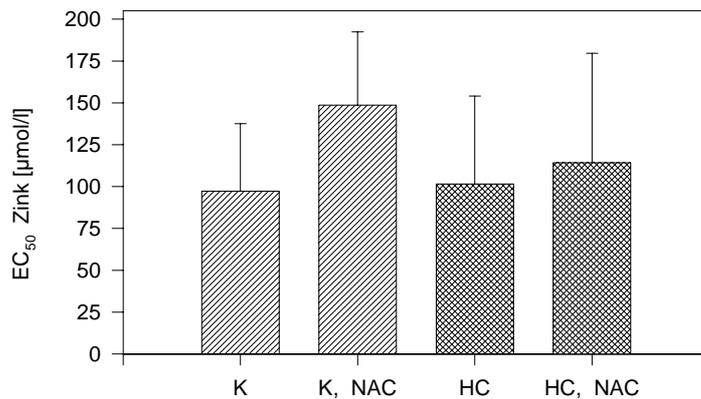


Abbildung 12

EC₅₀ Werte von Zink für den Anstieg des GSSG/GSH Verhältnisses in L2 Zellen nach Vorbehandlung mit N-Acetylcystein und Hydrocortison

Zur Vorbehandlung und Versuchsaufbau siehe Abb. 11. Anschließend wurden zelluläre Gehalte von oxidiertem (GSSG) und gesamtem (GSH) Glutathion gemessen und prozentual aufeinander bezogen. Aus den Dosiswirkungskurven wurden die EC₅₀ Werte von Zinkchlorid bestimmt.

Angegeben sind Mittelwert und Standardabweichung von fünf (n=5) unabhängigen Versuchen.

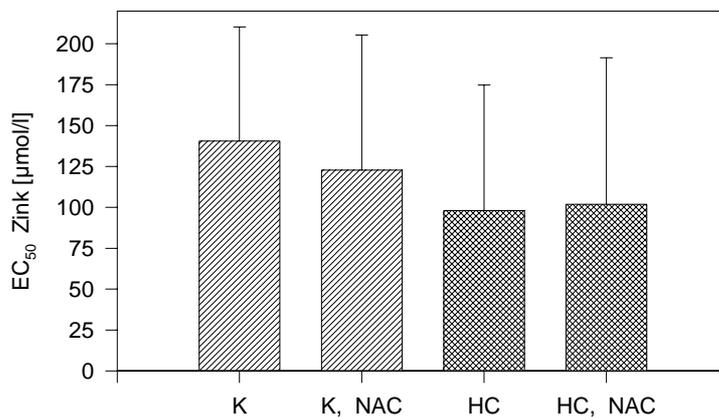


Abbildung 13

EC₅₀ Werte von Zink zur Methionineinbauhemmung in L2 Zellen nach Vorbehandlung mit N-Acetylcystein und Hydrocortison

Zur Vorbehandlung und Versuchsaufbau siehe Abb. 11. Anschließend wurde der 35S-Methionineinbau bestimmt und aus den Dosiswirkungskurven der Methionineinbauhemmung die EC₅₀ Werte von Zinkchlorid ermittelt.

Angegeben sind Mittelwert und Standardabweichung von fünf (n=5) unabhängigen Versuchen.

4.3 Einfluss einer simultanen Inkubation mit N-Acetylcystein auf die Zinktoxizität in Medien mit unterschiedlichem Cysteingehalt

Bei dieser Versuchsreihe wurden die Zellen zunächst mit 100 µmol/l Hydrocortison für 72h vorbehandelt. Als Kontrolle dazu dienten die nicht mit Hydrocortison vorbehandelten Ansätze. Anschließend wurden jeweils L2 Zellen für drei Stunden und A549 Zellen für vier Stunden ohne Hydrocortison jedoch mit 200 µmol/l N-Acetylcystein bzw. N-Acetyl-D-cystein mit Zinkkonzentrationen zwischen 0 und 200 µmol/l inkubiert.

Für L2-Zellen wurden Versuchsreihen mit 100, 10 und 1 µmol/l, für A549 Zellen nur mit 100 µmol/l Cysteingehalt im Medium durchgeführt.

Bei dieser Versuchsreihe stellte sich die Frage, ob eine durch NAC-Inkubation erhöhte GSH Synthese während der toxischen Einwirkung von Zink die Empfindlichkeit der Zellen vermindert und inwiefern die Wirkung von NAC durch die Konzentration von Cystein im Medium verändert wird.

4.3.1 Einfluss einer simultanen Inkubation mit N-Acetylcystein auf den zellulären Glutathiongehalt

Gleichermaßen wie bei der Vorbehandlung mit N-Acetylcystein (Kap. 4.2.1.) zeigte sich auch bei simultaner Inkubation mit N-Acetylcystein kein signifikanter Anstieg des zellulären Glutathiongehaltes im Vergleich zu den mit N-Acetyl-D-cystein inkubierten Ansätzen (nicht mit Zink inkubiert), sowohl bei der L2 (Tabelle 2) als auch bei der A549 Zelllinie (Tabelle 3).

Bei der Minderung des Cysteingehaltes im Medium von 100 auf 10 bzw. 1 µmol/l kam es zu einer Minderung des zellulären Glutathiongehaltes auf ca. 60 -70% (Tabelle 2).

Die Zellansätze, die mit Hydrocortison vorbehandelt wurden, zeigten auf ca. 60% verminderte Glutathiongehalte in Vergleich zu den Ansätzen ohne Vorbehandlung mit HC (Tabelle 2, 3). Vergleicht man die beiden Zelllinien so wird deutlich, dass A549 Zellen einen nahezu dreifach höheren Glutathiongehalt aufweisen.

Tabelle 2: Absolute Gesamtglutathiongehalte in L2 Zellen nach simultaner Inkubation mit N-Acetylcystein bzw. N-Acetyl-D-cystein in Medien mit unterschiedlichen Cysteingehalten

Die L2 Zellen wurden teilweise mit 100 µmol/l Hydrocortison für 72 h vorbehandelt. Anschließend wurden die Zellen mit 200 µmol/l N-Acetylcystein bzw. N-Acetyl-D-cystein bei 100, 10 bzw. 1 µmol/l Cystein im Medium für 3h inkubiert. Darauf wurden die Zellen mit Perchlorsäure aufgeschlossen und diese Fraktion für eine Glutathionbestimmung verwendet. Die zellulären Glutathiongehalte wurden mit der Methode nach Tietze in nmol/l pro 2cm² Zellrasen bestimmt.

Angegeben sind Mittelwert und Standardabweichung der nicht mit Zink inkubierten Ansätze von sechs (n=6) unabhängigen Versuchen.

100µmol/l Cystein im Medium		10µmol/l Cystein im Medium		1µmol/l Cystein im Medium	
NAC	NADC	NAC	NADC	NAC	NADC
keine Vorbehandlung mit HC					
3,5 ± 3,4	4,1 ± 2,0	1,1 ± 0,3	1,2 ± 0,2	1,3 ± 0,5	1,3 ± 0,5
nach Vorbehandlung mit HC					
2,2 ± 1,1	2,6 ± 1,8	0,9 ± 0,3	0,8 ± 0,2	0,6 ± 0,6	0,6 ± 0,6

Tabelle 3: Absolute Glutathiongehalte in A549 Zellen nach simultanen Inkubation mit N-Acetylcystein bzw. N-Acetyl-D-cystein bei 100 µmol/l Cystein im Medium

Die A549 Zellen wurden teilweise mit 100 µmol/l Hydrocortison für 72 h vorbehandelt. Anschließend wurden die Zellen mit 200 µmol/l N-Acetylcystein bzw. N-Acetyl-D-cystein bei 100µmol/l Cystein im Medium für 4h inkubiert. Die zellulären Glutathiongehalte wurden mit der Methode nach Tietze in nmol/l pro 2cm² Zellrasen bestimmt.

Angegeben sind Mittelwert und Standardabweichung der nicht mit Zink inkubierten Ansätze von drei (n=3) unabhängigen Versuchen.

NAC	NADC
Keine Vorbehandlung mit HC	
10,7 ± 4,0	11,0 ± 4,3
Nach Vorbehandlung mit HC	
6,8 ± 2,3	6,9 ± 2,2

4.3.2 Einfluss einer simultanen Inkubation mit N-Acetylcystein auf die zinkbedingte Glutathiondepletion

Die Inkubation mit N-Acetylcystein anstatt N-Acetyl-D-cystein während der Belastung mit Zink führte in einem 100 bzw. 10 $\mu\text{mol/l}$ Cystein Medium zu keiner Abschwächung der zinkbedingten Glutathiondepletion (nicht gezeigt).

Bei den Zellen, die allerdings in einem 1 $\mu\text{mol/l}$ Cystein im Medium mit N-Acetylcystein inkubiert waren, war der Glutathionabfall nach Belastung mit Zink schwächer ausgeprägt im Vergleich zu den mit N-Acetyl-D-cystein inkubierten Zellen. Bei den EC_{50} Werten zeigte sich eine tendenzielle, aber nicht signifikant verminderte Abnahme der Glutathiondepletion (siehe Tabelle 4). Diese Tendenz war bei den mit Hydrocortison vorbehandelten Zellen und bei den Kontrollen ohne Hydrocortison gleichermaßen zu finden (Abbildung 14).

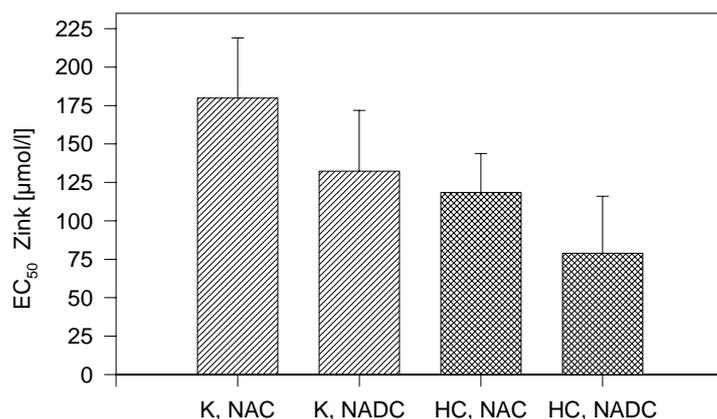


Abbildung 14

EC_{50} Werte von Zink zur Glutathiondepletion in L2 Zellen nach simultaner Inkubation mit N-Acetylcystein bzw. N-Acetyl-D-cystein

Die L2 Zellen wurden teilweise mit 100 $\mu\text{mol/l}$ Hydrocortison für 72 h vorbehandelt. Anschließend wurden die Zellen für 3 h mit Zinkchlorid und 200 $\mu\text{mol/l}$ N-Acetylcystein bzw. N-Acetyl-D-cystein als Kontrolle bei 1 $\mu\text{mol/l}$ Cystein im Medium inkubiert. Während der letzten Stunde der Inkubation mit Zink wurde den Zellen ein frisches Medium mit radioaktiv markiertem Methionin angeboten. Anschließend wurden die Zellen mit Perchlorsäure aufgeschlossen und diese Fraktion für eine Glutathionbestimmung verwendet. Der Zellrasen wurde dann mit 0,5 N NaOH gelöst und für die Bestimmung des Methionineinbaus verwendet. Die zellulären Glutathiongehalte wurden mit der Methode nach Tietze gemessen und aus den Dosiswirkungskurven der Glutathiondepletion wurden die EC_{50} Werte von Zinkchlorid ermittelt.

Angegeben sind Mittelwert und Standardabweichung von sechs ($n=6$) unabhängigen Versuchen.

Durch eine sehr starke Streubreite der Werte der einzelnen Versuchstage war die erkennbare Tendenz nicht signifikant (t-Test für unabhängige Stichproben nach Student). Der Vergleich

der Quotienten der EC₅₀ Werte für Glutathiondepletion nach NADC-Inkubation/EC₅₀ Werte nach NAC-Inkubation mittels t-Test zeigte, dass nach NAC-Inkubation die Glutathiondepletion nur bei den Ansätzen mit 1 µmol/l Cystein im Medium signifikant vermindert war (Tabelle 4).

Tabelle 4: EC₅₀ Werte und Quotienten der EC₅₀ Werte von Zink zur Glutathiondepletion in L2 Zellen nach simultaner Inkubation mit N-Acetylcystein bzw. N-Acetyl-D-cystein in 1 µmol/l Cystein im Medium

Die L2 Zellen wurden teilweise mit 100 µmol/l Hydrocortison für 72 h vorbehandelt. Anschließend wurden die Zellen für 3 h mit Zinkchlorid und 200 µmol/l N-Acetylcystein bzw. N-Acetyl-D-cystein als Kontrolle bei 1µmol/l Cystein im Medium inkubiert. Während der letzten Stunde der Inkubation mit Zink wurde den Zellen ein frisches Medium mit radioaktiv markiertem Methionin angeboten. Anschließend wurden die Zellen mit Perchlorsäure aufgeschlossen und diese Fraktion für eine Glutathionbestimmung verwendet. Der Zellrasen wurde dann mit 0,5 N NaOH gelöst und für die Bestimmung des Methionineinbaus verwendet. Die zellulären Glutathiongehalte wurden mit der Methode nach Tietze gemessen und aus den Dosiswirkungskurven der Glutathiondepletion wurden die EC₅₀ Werte von Zinkchlorid ermittelt. Die EC₅₀ Werte der mit NAC inkubierten Ansätze wurden für den Vergleich der Quotienten als 1,0 gesetzt.

* p ≤ 0,05; t-Test für unabhängige Stichproben (nach Student) gegen jeweilige Kontrolle mit N-Acetyl-D-cystein.

	n1	n2	n3	n4	n5	n6	Mittelwert	Stabw.	p-Wert
EC ₅₀ Werte zur Glutathiondepletion									
K, NAC	251	185	147	141	175	180	179,8	39,2	0,063
K, NADC	202	80	133	117	134	127	132,2	39,6	
HC, NAC	82	130	122	108	150	206	133,0	42,4	0,085
HC, NADC	19,3	66	97	106	106	168	93,7	49,3	
Quotienten NADC/NAC der EC ₅₀ Werte zur Glutathiondepletion									
K	0,80	0,43	0,90	0,83	0,77	0,71	0,74	0,16	0,003 **
HC	0,24	0,51	0,80	0,98	0,71	0,82	0,67	0,26	0,013 *

Insgesamt war der Effekt der Inkubation mit N-Acetylcystein abhängig vom Cysteingehalt im Medium. Dieser Effekt war bei L2-Zellen sowohl bei mit HC vorbehandelten Zellen, als auch bei Kontrollen ohne HC zu beobachten (Abbildung 15 mit HC vorbehandelte L2 Zellen; Kontrollen ohne HC nicht dargestellt).

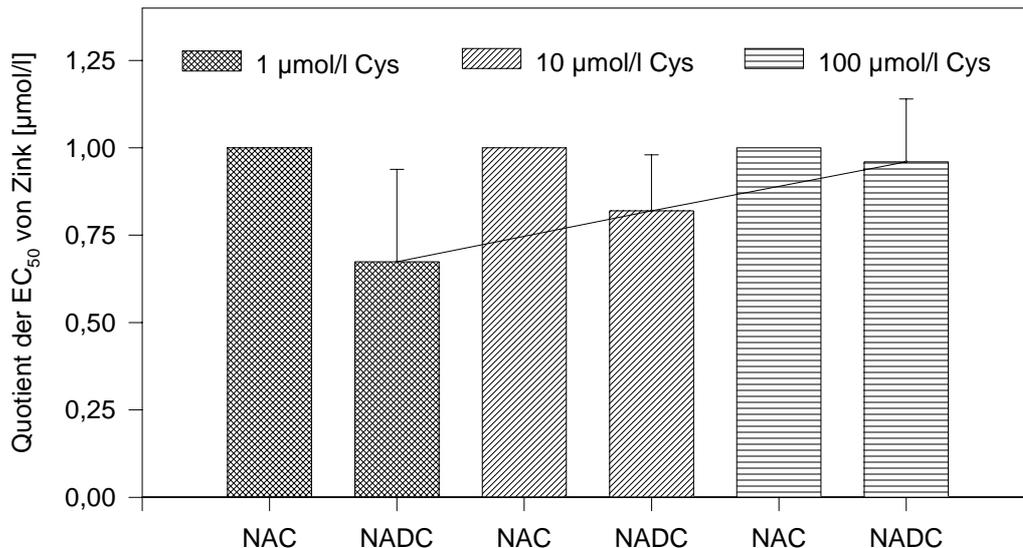


Abbildung 15

Quotienten der EC₅₀ Werte von Zink für Glutathiondepletion in L2 Zellen nach Inkubation mit N-Acetylcystein bzw. N-Acetyl-D-cystein

Die L2 Zellen wurden teilweise mit 100 µmol/l Hydrocortison für 72 h vorbehandelt. Anschließend wurden die Zellen für 3 h mit Zinkchlorid und 200 µmol/l N-Acetylcystein bzw. N-Acetyl-D-cystein als Kontrolle bei jeweils 1, 10 und 100 µmol/l Cystein im Medium inkubiert.

Die zellulären Glutathiongehalte wurden mit der Methode nach Tietze gemessen.

Aus den Dosiswirkungskurven der Glutathiondepletion wurden die EC₅₀ Werte von Zinkchlorid ermittelt. Hierbei wurde der EC₅₀ Wert der mit NAC inkubierten Ansätzen 1,0 gleichgesetzt.

Angegeben sind Mittelwert und Standardabweichung von sechs (n=6), drei (n=3) und fünf (n=5) unabhängigen Versuchen für jeweils 1, 10 und 100 µmol/l Cystein im Medium.

* p ≤ 0,05; t-Test für unabhängige Stichproben (nach Student) gegen jeweilige Kontrolle mit N-Acetyl-D-cystein.

4.3.3 Einfluss einer simultanen Inkubation mit N-Acetylcystein auf den zinkbedingten Anstieg des GSSG/GSH Verhältnisses

Entsprechend der Depletion des Gesamtglutathions kam es bei den nicht mit N-Acetylcystein inkubierten Ansätzen zu einem stärkeren, ebenso nicht signifikanten, Anstieg der oxidierten Glutathionanteile (Abbildung 16, lediglich die höchste Zinkkonzentration bei mit HC vorbehandelten Zellen signifikant). Wie bei den EC_{50} Werten für die Glutathiondepletion zeigte sich beim Vergleich der Mittelwerte von allen Versuchstagen keine signifikanten Unterschiede zwischen den mit NADC- und NAC inkubierten Ansätzen (Abbildung 17). Die Quotienten der EC_{50} Werte für Zink zum GSSG/GSH-Verhältnis zeigten dann im t-Test allerdings eine signifikante Verminderung der oxidierten Glutathionanteile in den mit NAC inkubierten Ansätzen nur im Medium mit einer Cysteinkonzentration von $1 \mu\text{mol/l}$.

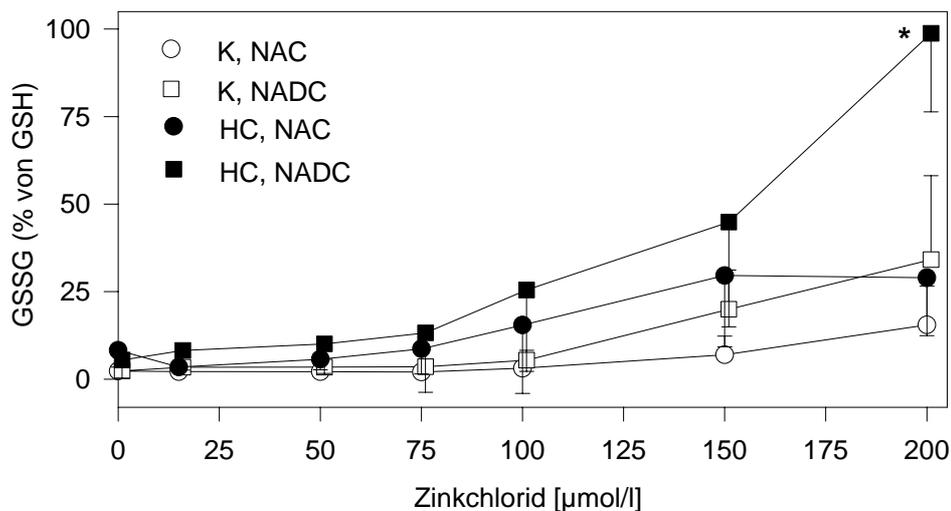


Abbildung 16

Anteil des GSSG am GSH in L2 Zellen nach Inkubation mit N-Acetylcystein bzw. N-Acetyl-D-cystein ($1 \mu\text{mol/l}$ Cystein im Medium)

Zur Vorbehandlung und Versuchsaufbau siehe Abb. 14.

Die zellulären Gehalte von oxidiertem (GSSG) und gesamten (GSH) Glutathion wurden mit der Methode nach Tietze gemessen und prozentual aufeinander bezogen.

Angegeben sind Mittelwert und Standardabweichung von sechs ($n=6$) unabhängigen Versuchen.

$p \leq 0,05$; t-Test für unabhängige Stichproben (nach Student) gegen jeweilige Kontrolle mit N-Acetyl-D-cystein.

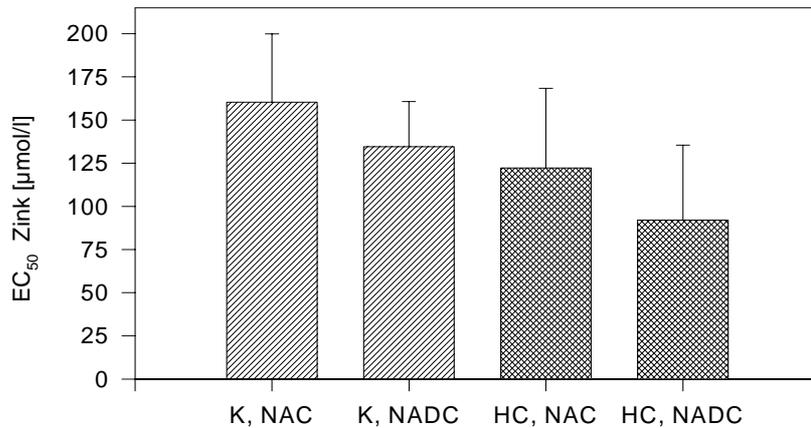


Abbildung 17

EC₅₀ Werte von Zink zum GSSG/GSH Verhältnis in L2 Zellen nach Inkubation mit N-Acetylcystein bzw. N-Acetyl-D-cystein (1µmol/l Cystein im Medium)

Zur Vorbehandlung und Versuchsaufbau siehe Abb. 14.

Aus den Dosiswirkungskurven der GSSG/GSH Verhältnisse wurden die EC₅₀ Werte von Zinkchlorid ermittelt.

Angegeben sind Mittelwert und Standardabweichung von sechs (n=6) unabhängigen Versuchen.

Tabelle 5: EC₅₀ Werte und Quotienten der EC₅₀ Werte von Zink zum GSSG/GSH Verhältnis in L2 Zellen nach simultaner Inkubation mit N-Acetylcystein bzw. N-Acetyl-D-cystein in 1µmol/l Cystein im Medium

Zur Vorbehandlung und Versuchsaufbau siehe Tab. 4.

* $p \leq 0,05$; t-Test für unabhängige Stichproben (nach Student) gegen jeweilige Kontrolle mit N-Acetyl-D-cystein.

	n1	n2	n3	n4	n5	n6	Mittelwert	Stabw.	p-Wert
EC ₅₀ Werte zum GSSG/GSH Verhältnis									
K, NAC	107	134	166	167	163	225	160,3	39,5	0,212
K, NADC	98	122	164	126	131	166	134,5	26,2	
HC, NAC	78	76	106	130	145	198	122,2	46,2	0,271
HC, NADC	56	34	82	111	116	153	92,0	43,4	
Quotienten NADC/NAC der EC ₅₀ Werte zum GSSG/GSH Verhältnis									
K	0,92	0,91	0,99	0,75	0,80	0,74	0,85	0,10	0,005 **
HC	0,72	0,45	0,77	0,85	0,80	0,77	0,73	0,14	0,001 **

4.3.4 Einfluss einer simultanen Inkubation mit N-Acetylcystein auf die zinkbedingte Proteinsynthesehemmung

Bei der Proteinsynthesebestimmung maß man sowohl bei den Ansätzen, die mit Hydrocortison vorbehandelt wurden als auch den Kontrollen ohne Hydrocortison eine Abschwächung der Methionineinbauhemmung bei den mit N-Acetylcystein inkubierten Zellen gegenüber den N-Acetyl-D-cystein- Kontrollen. (Abbildung 18).

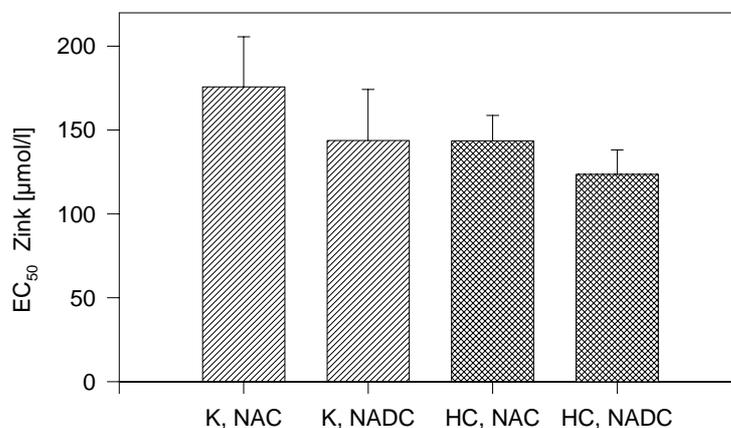


Abbildung 18

EC₅₀ Werte von Zink zur Methionineinbauhemmung in L2 Zellen nach Inkubation mit N-Acetylcystein bzw. N-Acetyl-D-cystein (1µmol/l Cystein im Medium)

Zur Vorbehandlung und Versuchsaufbau siehe Abb. 14.

Aus den Dosiswirkungskurven der ³⁵S-Methionineinbauhemmung wurden die EC₅₀ Werte von Zinkchlorid ermittelt.

Angegeben sind Mittelwert und Standardabweichung von sechs (n=6) unabhängigen Versuchen.

Gleichermaßen wie bei den anderen Toxizitätsparametern waren lediglich die Quotienten der EC₅₀ Werte gemessen im Medium mit 1 µmol/l Cysteingehalt signifikant verändert (Tabelle 6).

Tabelle 6: EC₅₀ Werte und Quotienten der EC₅₀ Werte von Zink zur Methionineinbauhemmung in L2 Zellen nach simultaner Inkubation mit N-Acetylcystein bzw. N-Acetyl-D-cystein in 1 µmol/l Cystein im Medium

Zur Vorbehandlung und Versuchsaufbau siehe Tab 5.

* $p \leq 0,05$; t-Test für unabhängige Stichproben (nach Student) gegen jeweilige Kontrolle mit N-Acetyl-D-cystein.

	n1	n2	n3	n4	n5	n6	Mittelwert	Stabw.	p-Wert
EC ₅₀ Werte zur Methionineinbauhemmung									
K, NAC	226	197	167	154	163	148	175,8	29,9	0,096
K, NADC	200	144	152	121	118	128	143,8	30,5	
HC, NAC	160	134	135	129	160	166	147,3	16,3	0,066
HC, NADC	135	129	114	137	103	135	125,5	13,9	
Quotienten NADC/NAC der EC ₅₀ Werte zur Methionineinbauhemmung									
K	0,88	0,73	0,91	0,79	0,72	0,86	0,82	0,08	0,0002 **
HC	0,84	0,96	0,84	1,06	0,64	0,81	0,86	0,14	0,038 *

Die Verminderung der zink-bedingten Methionineinbauhemmung bei den mit N-Acetylcystein inkubierten Ansätzen veränderte sich mit unterschiedlichem Cystein-Angebot im Medium und fand sich bei 1 $\mu\text{mol/l}$ Cystein am deutlichsten (Abbildung 19 Kontrollen ohne HC; mit HC vorbehandelte Zellen nicht dargestellt).

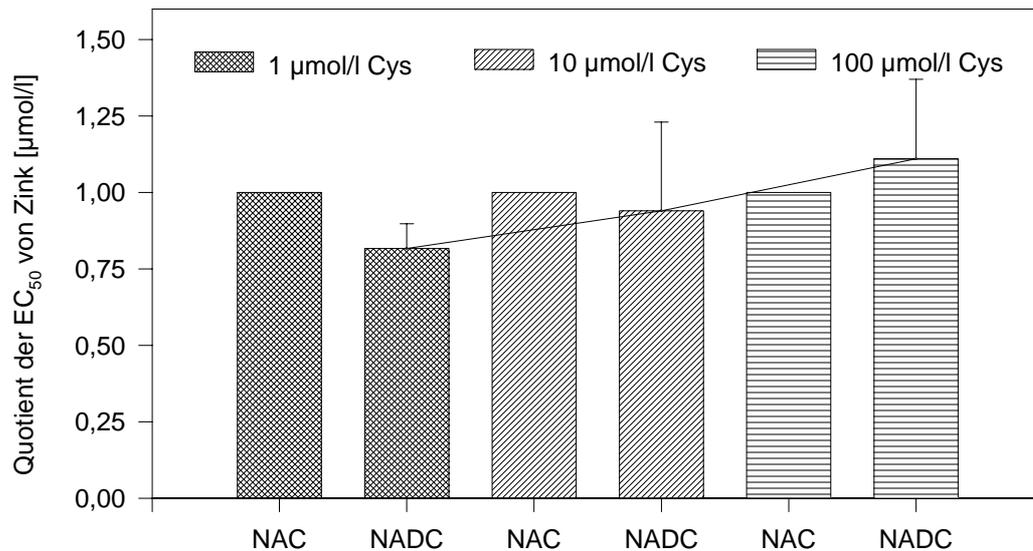


Abbildung 19

Quotienten der EC₅₀ Werte von Zink für Methionineinbauhemmung von L2 Zellen nach Inkubation mit N-Acetylcystein

Die L2 Zellen wurden teilweise mit 100 $\mu\text{mol/l}$ Hydrocortison für 72 h vorbehandelt. Anschließend wurden die Zellen für 3 h mit Zinkchlorid und 200 $\mu\text{mol/l}$ N-Acetylcystein bzw. N-Acetyl-D-cystein bei jeweils 1, 10 und 100 $\mu\text{mol/l}$ Cystein im Medium inkubiert.

Aus den Dosiswirkungskurven der ³⁵S-Methionineinbauhemmung wurden die EC₅₀ Werte von Zinkchlorid ermittelt. Hierbei wurde für den EC₅₀ Wert der mit NAC inkubierten Ansätze der Wert 1,0 gesetzt.

Angegeben sind Mittelwert und Standardabweichung von sechs (n=6), drei (n=3) und fünf (n=5) unabhängigen Versuchen für jeweils 1, 10 und 100 $\mu\text{mol/l}$ Cystein im Medium.

* $p \leq 0,05$; t-Test für unabhängige Stichproben (nach Student) gegen jeweilige Kontrolle mit N-Acetyl-D-cystein.

5. Diskussion

Als toxische Substanz wurde in der vorliegenden Arbeit Zink verwendet. Da besonders nach inhalativer Aufnahme von Zink gravierende gesundheitsschädigende Effekte beschrieben sind, dienten als Modell Lungenzellen. Bei einer Exposition mit Zink in vivo kann es nach Inkorporation von ca. 20 mg Zink zur Ausbildung des so genannten Gießerfiebers ("metal fume fever"), einem arbeitsmedizinisch relevanten Krankheitsbild, kommen^{44,78}. Die Symptomatik kann aber nach Exposition mit deutlich größeren Mengen als den oben genannten auch in ein toxisches Lungenödem münden^{31,51-53,70,76,100}. Bei einem bestehendem ARDS ist auch heute noch mit einer Letalität von ca. 30-60% zu rechnen^{60,68,87,125}. Bis auf die Gabe von Sauerstoff wurden bisher alle untersuchten pharmakologischen Therapien als nutzlos eingestuft. Zu den erwiesenermaßen als nutzlosen kategorisierten Interventionen zählt sowohl die Gabe von Glukokortikoiden als auch die Gabe von Antioxidanzien und von GSH bzw. GSH-Vorstufen einschließlich NAC¹²⁵.

Abgesehen von Untersuchungen aus unserer eigenen Arbeitsgruppe ist zum Mechanismus der zinkbedingten Toxizität in nicht-neuronalen Zellen in der Literatur nicht viel bekannt. Ein Vergleich zu den allerdings häufig untersuchten Kupfer- oder Cadmiumionen zeigt zudem, dass Zink in Zellen sicher anders als diese chemisch verwandten, toxischen Metalle reagiert. Führt Kupfer durch seinen Valenzwechsel primär zu oxidativen Schäden, so kann man einen solchen Mechanismus für Zink sicher ausschließen⁷⁴. Auch ein Vergleich zur Toxizität von Cadmium zeigt deutliche Unterschiede, insofern als Cadmium in vivo als kanzerogen einzustufen ist, während Zink offensichtlich kein kanzerogenes Potential hat^{48,117}. Der krebserzeugende Mechanismus von Cadmium dürfte in DNA-Strangbruchbildungen begründet sein, die auch in relativ niedrigen Konzentrationen zu finden sind, ein solcher Effekt ist für Zink bisher nicht beschrieben⁴⁸. Andererseits besitzen beide Metalle eine hohe Affinität zu SH-Gruppen von Proteinen und können daher an vielfältigen Stellen in metabolische Prozesse eingreifen³⁵.

5.1 Bedeutung der Glukokortikoide für die zelluläre Zinkaufnahme

Für das zinkbedingte ARDS muss die Gabe von Glukokortikoiden weiter in Frage gestellt werden, da nach Glukokortikoidgabe in einigen Zelltypen wie Hepatozyten oder Brustdrüsenepithelzellen eine erhöhte Zinkaufnahme beschrieben ist^{3,32}. Es könnte somit auch in den Lungenzellen eine vermehrte Zinkaufnahme resultieren, so dass ein möglicher antientzündlicher Nutzen durch diesen zinkagonistischen Effekt vermindert oder sogar verkehrt würde. Auch in der vorliegenden Arbeit zeigte sich nach Vorbehandlung mit Hydrocortison eine verstärkte Empfindlichkeit der untersuchten Lungenzellen gegenüber Zink. Die Frage ob Glukokortikoide zu einer verstärkten Aufnahme von Zink in die Zellen und somit zu einer erhöhten Zinktoxizität führen, wurde in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht.

Es ist bekannt, dass die zelluläre Aufnahme von Zink über verschiedene zinkspezifische (ZIP) oder kationen-spezifische (CDF) Transporter erfolgt^{23,113}. Das Vorkommen dieser verschiedenen Transportproteine (bisher 10 ZIP bekannt) ist aktuell Gegenstand der Forschung. Über die Regulation insbesondere der ZIP ist bekannt, dass eine Aktivierung durch verschiedenen Sexualhormone erfolgt, allerdings gibt es keine Untersuchungen über eine Regulation durch Glukokortikoide^{38,112}. Damit ergibt sich, dass nicht zwangsläufig eine erhöhte zelluläre Zinkaufnahme in allen Zelltypen durch Glukokortikoide imponieren muss. In unserer Arbeitsgruppe wurde explizit für die untersuchten Lungenzellen auch keine Erhöhung der intrazellulären Zinkkonzentrationen nach Vorbehandlung mit Hydrocortison und anschließender Zinkbelastung im Vergleich zu nicht vorbehandelten Zellen gefunden¹²⁸.

5.2 Unterschiede im Glutathionstoffwechsel und in der Zinkempfindlichkeit der verwendeten Zelllinien

Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse beschreiben toxische Effekte von Zink in zwei in der Literatur als Alveolarepithel Typ II beschriebenen Zelllinien. Die A549 Zellen sind menschlichen Ursprungs und stammen von einem Bronchialkarzinom ab, während die L2 Zellen von der Ratte abstammen und nach proteolytischem Verdau der Lunge erhalten wurden⁴⁹. Beide Zelllinien werden als Alveolarepithel Typ II Zellen charakterisiert und sollen z.B. auch zur Synthese des Surfactants befähigt sein^{19,27,90}. Als gravierende Diskrepanz zwischen beiden Zelllinien wird ein deutlicher Unterschied im Glutathionhaushalt der Zellen angesehen. Während die L2 Zellen üblicherweise vorkommende Glutathiongehalte

haben, sind in den A549 Zellen ca. 5-10fach höhere Gehalte, sowie auch eine deutlich höhere Glutathionreduktase-Aktivität zu finden ¹²⁴. Auch in der vorliegenden Arbeit konnte ein deutlich höherer Glutathiongehalt in den A549-Zellen gezeigt werden. Da die Toxizität von Zink wahrscheinlich über das zelluläre Glutathion, zumindest anteilig, charakterisiert wird, sind entsprechend in A549 Zellen im Vergleich zu L2 Zellen auch erst deutlich höhere Konzentrationen von Zink bzw. längere Inkubationszeiten zytotoxisch. Dies konnte auch in den eigenen Ergebnissen gezeigt werden.

Eine Untersuchung der Toxizität gerade der Alveolarepithel Typ II Zellen in isolierter Zellkultur für pulmonale Toxizitätsabschätzung ist deshalb interessant, weil dieser Zelltyp im Organ Lunge eher selten ist (ca. 5% aller Zellen), dabei auch nur ca. 10% der Alveolaroberfläche auskleidet, aber wegen seiner Funktionen der Surfactantsynthese und als Stammzelle der Typ I Alveolarepithelien gerade nach Lungenschädigung zur Regeneration äußerst wichtig ist ⁶⁰. Sollte eine Schädigung (teils-)selektiv die Typ II Alveolarepithelzellen treffen, oder dieser Zelltyp besonders sensitiv reagieren, z. B. nach Vorbehandlung mit Glukokortikoiden, so würde ein solcher Effekt bei Betrachtung des Gesamtorganschadens wohl nur schwer erklärbar und auch nur nach längerer Nachbeobachtungszeit ersichtlich werden.

5.3 Parameter zur Erfassung der Zinktoxizität

Die Toxizität von Zink wird zumindest teilweise über Glutathion reguliert. So beschreiben Steinebach & Wolterbeek 1993 eine Glutathiondepletion in Hepatozyten und einer Hepatomzelllinie von Ratten ¹⁰⁹. Zusätzlich beobachteten sie, dass die Zelllinie mit dem höheren Glutathiongehalt auch resistenter auf Zink als die primären Hepatozyten reagierte. In Voruntersuchungen unserer Arbeitsgruppe wurde der Glutathiongehalt von verschiedenen Lungenzelllinien variiert. Hierbei zeigte sich jeweils, dass bei Minderung des Glutathiongehaltes eine Zunahme der Toxizität von Zink erfolgte und wiederum bei vermehrtem Glutathiongehalt entsprechend die Sensitivität gegenüber Zink abnahm ^{120,123}. Somit ist der Glutathiongehalt zumindest als eine Teilregelgröße für eine Sensitivität gegen Zink anzusehen. Der Glutathiongehalt der Zellen ist somit nicht nur eine bedingte, sondern auch eine bedingende Größe der Zinktoxizität. Die Bestimmung glutathionabhängiger Messgrößen kann somit als sensitiver Indikator für zink-bedingte zelluläre Veränderungen angesehen werden, darf aber nicht mit Zytotoxizität gleichgesetzt werden.

Als weiterer allerdings auch glutathionabhängiger Parameter wurde der Gehalt des oxidierten Glutathions (GSSG) bestimmt. Das GSSG wurde jeweils als Anteil vom Gesamtglutathion angegeben. Dieses Verhältnis GSSG/GSH kann als ein sensitives Maß für oxidativen Stress angesehen werden ⁸⁹. Für den Fall der zinkbedingten Toxizität sind verschiedene Ursachen für einen GSSG-Anstieg denkbar. Zum einen kann Zink primär oxidativen Stress verursachen, was sich in einem Anstieg des GSSGs äußern würde. Andererseits wird aber auch diskutiert, dass Zink nicht zu einer vermehrten Entstehung oxidativer Sauerstoffspezies führt, sondern „lediglich“ die Entgiftung solcher mindert. Weiterhin hemmt Zink jedoch auch die GSSG-Reduktase (GR) und kann somit die Rückgewinnung der physiologisch entstehenden oxidierten Glutathionanteile verhindern ¹²¹. Letztendlich wird auch hierbei oxidativer Stress entstehen, da die Zelle eine erhebliche Verschiebung in ihrem elektrochemischen Potential erfährt.

Da ein GSSG-Anstieg auch primär als toxisches Ereignis angesehen wird, könnte hierin auch die eigentliche toxische Wirkung von Zink liegen ⁷³. Für die letztere Erklärung spricht, dass die GR-Hemmung durch Zink schon bei relativ niedrigen Konzentrationen nachweisbar ist und entsprechend früh einsetzt ^{121,131}. Andererseits sind Antioxidanzien in L2 Zellen relativ gute Antagonisten einer Zinktoxizität, was für einen primär oxidativen Mechanismus sprechen würde ¹¹⁹. Einschränkend muss jedoch angeführt werden, dass bei gehemmter GR eine Reduktion von GSSG eben nicht mehr erfolgt und die meisten der verwendeten Antioxidanzien lediglich in Verbindung mit reduziertem Glutathion ihre antioxidativen Eigenschaften entfalten (so genanntes kooperatives System), so dass sie im Falle der Zinkbelastung wohl eher als „Oxidanzpuffer“ zu betrachten sind ²⁸.

Entsprechend der Wirksamkeit von hydrophilen Antioxidanzien sollte auch das NAC eine erhebliche zinkantagonistische Wirkung haben, die deutlich über einen komplexierenden Einfluss hinausgeht. Dieser Aspekt wird weiter unten nochmals diskutiert. Allgemein stellte sich der GSSG-Anstieg aber als ein sehr sensibler Parameter für die zinkbedingte Toxizität dar.

Als ein weiterer Parameter der Zinktoxizität wurde der Methionineinbau (Methionineinbauhemmung) bestimmt. Die Methionineinbauhemmung ist sicherlich als ein reiner Effekt der Toxizität von Zink aufzufassen. Zumindest wurde in unserer Arbeitsgruppe keine Änderung der Zinksensitivität nach zusätzlicher Hemmung der Proteinbiosynthese, etwa durch die typischen Proteinsynthesehemmer Cycloheximid bzw. Puromycingabe, gesehen (unpublizierte Daten). Auch andere Arbeitsgruppen bezeichnen die Hemmung der

Proteinbiosynthese durch Zink als ein sensitives und frühes Ereignis, ohne eine Verbindung zur Toxikodynamik von Zink zu ziehen^{34,62}.

Da die Zellen zumindest bei veränderten Glutathiongehalten offensichtlich auch die Aktivität der Glutathionreduktase variieren können, wurde als weitere Einflussgröße auch die Aktivität der GR bestimmt¹²¹. Als Erwartungswert wurde nach eintägiger Vorbehandlung mit NAC mit einer Erhöhung des zellulären Glutathiongehaltes und damit mit einer Minderung der GR-Aktivität gerechnet. Die GR-Aktivität war jedoch nicht verändert und es konnte somit eine möglicherweise hierdurch zusätzlich veränderte Zinksensitivität ausgeschlossen werden.

5.4 Beeinflussung der Zinktoxizität und der Hydrocortisonwirkung in Alveolarepithelzellen durch N-Acetylcystein

In früheren Untersuchungen wurde nachgewiesen, dass mit einer Erhöhung des Glutathiongehaltes auf das ca. 2-3fache durch Gabe eines Glutathionesters die Toxizität von Zink vermindert wird¹²².

NAC gilt als deutlich lipophiler als Cystein und kann auch über Plasmamembranen diffundieren, während Cystein über den neutralen Aminosäurecarrier (ASC) in die Zellen aufgenommen wird⁷. Damit unterliegt die Cystein-Aufnahme und somit die zelluläre Cystein-Konzentration auch dem Einfluss verschiedener extrazellulärer Aminosäurekonzentrationen. Deswegen wird die Glutathionkonzentration auch deutlich von den extrazellulären Konzentrationen anderer Aminosäuren abhängen. Durch die Verabreichung von NAC in das Medium soll diese Abhängigkeit vermieden werden und die Limitierung der GSH-Synthese durch rückgekoppelte zelluläre Cystein-Aufnahme außer Kraft gesetzt werden.

In dieser Arbeit zeigte sich, dass sich bei Fehlen von oxidativem Stress (fehlende Zinkbelastung) durch die Gabe von NAC in einer Konzentration von 200 µmol/l der Glutathiongehalt der Zellen nicht entscheidend beeinflussen lässt. Entscheidend war vielmehr allein die Konzentration von Cystein im Medium. Eine Vorbehandlung der Zellen mit NAC vor toxischer Zinkeinwirkung zeigte dementsprechend auch keinen positiven Effekt auf den intrazellulären Glutathiongehalt.

In der ersten Versuchsreihe wurde eine direkte Interaktion von NAC mit Zink vermieden, indem die Zellen mit NAC lediglich vorbehandelt waren. Damit konnten die komplexierenden Eigenschaften von NAC, insoweit sie extrazellulär auftreten, vermieden werden. So wurde bei

den mit NAC vorbehandelten Zellen vor Belastung mit Zink das extrazelluläre NAC ausgewaschen. Ein positiver Effekt wäre demnach noch auf mindestens diese zwei möglichen Erklärungen zurückzuführen: erhöhte GSH-Synthese und/oder intrazellulär vermindertes freies Zink. Es wurden jedoch keine Steigerungen der Glutathiongehalte der Zellen gefunden und entsprechend auch keine Verbesserung der Zinktoxizitätsparameter gegenüber einer Kontrolle ohne Vorbehandlung mit NAC. In diesem Modell war der Effekt durch NAC somit nur gering und es wunderte letztendlich nicht, dass eine verminderte Toxizität und/oder eine erhöhte GSH Syntheserate ausgeblieben sind.

Für NAC ist bekannt, dass es selbst als Zinkchelator fungiert, womit die freie und somit wirksame Zinkkonzentration vermindert wird ⁵⁸. Weiterhin ist bekannt, dass NAC antioxidative Eigenschaften besitzt ¹⁰⁷. Da es nach Zinkgabe intrazellulär zu einer Depletion des zellulären Glutathions kommt, ist mit Sicherheit anzunehmen, dass in den Zellen auch oxidativer Stress vorherrscht. Da wie oben besprochen auch eine GR-Hemmung besteht, könnte ein zinkbedingter oxidativer Stress somit auch als ein finales Stadium der Zelle imponieren, also ohne eine Beeinflussungsmöglichkeit durch Antioxidanzien. Diese Annahme konnte aber durch die eigene Arbeitsgruppe ausgeschlossen werden ¹²³. Weiterhin weiß man wiederum aus Daten unserer eigenen Arbeitsgruppe, dass NAC offensichtlich deutlich besser eine zinkbedingte Toxizität zu antagonisieren vermag als es seinen komplexierenden und antioxidativen Eigenschaften entspricht ¹²⁴.

Insgesamt sind durch NAC also zwei weitere Effekte bekannt, die eine Minderung der zinkbedingten Toxizität bewirken, ohne dass eine erhöhte Glutathionsynthese erfolgen müsste. Als Kontrolle sind daher "Zellen ohne NAC" nicht ausreichend geeignet. Beide hier genannten Eigenschaften (Chelator, Antioxidanz) sind rein chemischer Natur und nicht abhängig von den stereoisomeren Eigenschaften des NAC. Das würde heißen, dass das D-Enantiomer von NAC (NADC) die gleichen komplexierenden und antioxidativen Eigenschaften haben sollte. Dies wird z.B. von Smith und Martell ebenso angenommen, weshalb diese Autoren auch Komplexbildungskonstanten der entsprechenden D-Derivate für Metal/Ligand-Komplexe nicht bestimmten ¹⁰⁴. Auch für direkte antioxidative, also Elektronenakzeptoreigenschaften ist die stereoisomere Konfiguration unerheblich. Jedoch unterscheiden biologische Systeme im Allgemeinen sehr wohl zwischen D- und L-Varianten z.B. von Aminosäuren. So sind üblicherweise die L-Varianten biologisch aktiv. Auch in die Glutathionsynthese mündet entsprechend nur das L-Cystein, während eine Gabe von D-

Cystein nicht zur Glutathionsynthese verwendet wird^{20,123}. Daher wurde für diese Arbeit jeweils eine Applikation von NADC entsprechend der NAC-Gabe als Kontrolle gewählt.

In der zweiten Versuchsreihe nach einer simultanen Inkubation mit NAC bzw. NADC während der Inkubation mit Zink zeigte sich lediglich bei starkem Cysteinmangel im Medium (1µmol/l) ein günstiger Einfluss von NAC im Vergleich zu NADC-Kontrollen auf die Glutathiondepletion und die anderen untersuchten Toxizitätsparameter. Dieser Effekt war allerdings aufgrund der hohen Streubreite der Werte von unterschiedlichen Versuchstagen nur für die Quotienten der Werte der NADC/NAC inkubierten Ansätze signifikant. Die, gleichwohl nur bei starkem Cysteinmangel im Medium nachweisbare, günstige Beeinflussung der Zinktoxizitätsparameter durch NAC im Vergleich zu NADC spricht für eine geringe zusätzliche Wirkung von NAC als L-Cystein-Donator für die Glutathionsynthese.

Als ein weiterer interessanter Aspekt der Ergebnisse zeigte sich eine lediglich tendenziell, nicht durchwegs signifikant erhöhte Toxizität von Zink in mit Hydrocortison vorbehandelten Zellen. Aus der Literatur ist allerdings bekannt, dass die Toxizität von Zink in L2 und A549 Zellen nach Vorbehandlung mit Glukokortikoiden (ohne zusätzlich NAC/NADC-Gabe) drastisch ansteigt¹²⁰. Die Ursache, für die beobachtete, schwächer als erwartet erhöhte Zinktoxizität in den untersuchten Zelllinien nach Vorbehandlung mit Hydrocortison, ist somit am ehesten in der zusätzlichen Anwesenheit von NAC bzw. NADC begründet. Da NAC neben seiner Funktion als Glutathion-Precursor (Cystein-Donor) auch als Antioxidanz fungiert, bedeutet dies offensichtlich, dass die Anwesenheit des Antioxidanzes NAC (bzw. NADC) die erhöhte Sensitivität nach Vorbehandlung mit HC teilweise aufhebt. Der fehlende Nachweis einer signifikant erhöhten Zinktoxizität nach Hydrocortisongabe bei gleichzeitiger NAC bzw. NADC-Gabe ist somit ein indirekter Hinweis auf eine eventuelle günstige Beeinflussung der Zinktoxizität durch NAC/NADC. Die Tatsache, dass nach Hydrocortisonvorbehandlung nur für den Fall einer sehr niedrigen Cysteinkonzentration im Medium ein zusätzlicher schwacher Effekt auf die Toxizitätsparameter nur für NAC, aber nicht für NADC, gezeigt werden konnte, spricht auch hier für eine gering vorhandene Wirkung von NAC als L-Cystein-Donator für die Glutathionsynthese. Letztere Wirkung scheint in der Summe allerdings gering zu sein.

Interessant in diesem Zusammenhang ist auch, dass in Geweben aus fetalen Nieren und Lungen von Ratten nach mütterlicher Dexamethasongabe eine Abnahme verschiedener antioxidativer Enzyme (Superoxiddismutase, Glutathionperoxidase, Katalase) gezeigt werden konnte¹⁰. Für die in dieser Arbeit verwendeten Lungenzellen ist ein derartiger Effekt bisher

nicht beschrieben, aber durchaus denkbar. Da auch schon vorher der Verdacht geäußert wurde, dass zusätzlich zu GSH ein weiterer modulierender Faktor der Zinktoxizität durch Glukokortikoide verändert wird, scheint eine solche allgemeine Minderung von Antioxidanzien auch in Lungenzellen sogar als wahrscheinlich. Dies sollte bedeuten, dass auch andere Antioxidanzien wie z.B. Vit. C, Vit. E oder Harnsäure etc. als Zink-Antidota zu agieren vermögen. Entsprechende Untersuchungen wurden bei uns in der Arbeitsgruppe, wie oben schon erwähnt, auch durchgeführt und es zeigt sich tatsächlich in L2 Zellen, jedoch nicht in A549 Zellen, dass hydrophile Antioxidanzien wie Vit. C eine zinkantagonistische Wirkung entfalten können¹¹⁹.

5.5 Abschließende Beurteilung und Limitationen

Somit konnte durch die vorliegende Arbeit gezeigt werden, dass durch 200 µmol/l NAC beim Fehlen von oxidativem Stress eine Erhöhung von zellulären Glutathiongehalten nicht stattfindet. Weiterhin kommt es durch Inkubation mit NAC nur unter Bedingung von oxidativem Stress und gleichzeitigem Cysteinmangel zu einer tendenziell verminderten zinkbedingten Glutathiondepletion. Dies ist verwunderlich, als dass verschiedene Arbeitsgruppen in hämatopoetischen Stammzellen mit Konzentrationen unter 500 µmol/l NAC deutliche zinkantagonistische Effekte, die wahrscheinlich durch eine erhöhte Glutathionsynthese begründet sind, fanden^{25,42}. Andererseits fand sich durch die Inkubation mit 1000 µmol/l NAC, aber nicht mit 100 µmol/l NAC ein Schutzeffekt vor oxidativen Schäden in A549 Zellen, wobei auch bei 1 mmol/l NAC im Vergleich zu Kontrollen nur ein leicht erhöhter Glutathiongehalt beschrieben ist⁷. In einer Arbeit der eigenen Arbeitsgruppe, in der NAC deutlich besser zinkantagonistisch wirkte, als es einer reinen Komplexbildung entsprochen hätte, war NAC in einer Konzentration von 2 mmol/l eingesetzt und damit in ca. 10fachem Überschuss zu Zink. Es erscheint damit gut vorstellbar, dass durch die in der vorliegenden Arbeit verwendete NAC-Konzentration von 200 µmol/l kein relevanter GSH-synthesesteigernder Effekt hervorgerufen werden konnte.

Letztendlich ist noch eine Toxizität von D-Derivaten der Aminosäuren in den Ansätzen mit NADC nicht auszuschließen. Toxische Effekte sind z. B. für D-Valin bekannt, welches eine erhebliche Toxizität insbesondere für Fibroblasten besitzt. Dies wird z.B. für eine Zells Selektion in Laboratorien verwendet um Fibroblastenverunreinigungen aus Zellgemischen zu entfernen. Aber auch für D-Cystein sind in E. coli Zellen toxische Effekte beschrieben, wobei allerdings für Eukarionten keine Hinweise auf eine Toxizität von D-Cystein bestehen

¹⁰⁶. Sollte in den vorliegenden Fällen NADC und damit eventuell D-Cystein auch toxische Effekte verursachen, so hätte allerdings ein positiver Effekt von NAC verstärkt hervortreten müssen. Da jedoch ein positiver Effekt von NAC (im Vergleich zu NADC) nur tendenziell zu erkennen war, ist eine gesonderte Toxizität des hier verwendeten D-Derivates von NAC wohl eher zu verneinen.

6. Zusammenfassung

Nach inhalativer Aufnahme kann Zink ein bedrohliches, toxisch-bedingtes akutes Lungenversagen auslösen. Der früher diskutierte pharmakologisch-therapeutische Einsatz von Glukokortikoiden hat sich hier bis jetzt als nutzlos erwiesen. Nach Inkubation von Alveolarepithelzellen mit Glukokortikoiden ist die Zinktoxizität weiter erhöht, als Ursache wird eine durch die Steroide verursachte Verminderung des intrazellulären Glutathions angesehen.

Die zink-induzierte Toxizität wird zumindest teilweise durch Glutathion reguliert. Während die intrazelluläre Glutathionreduktase schon in der frühen Phase durch Zink gehemmt wird, scheint Glutathionsynthese nicht beeinflusst zu sein. Als ein limitierender Faktor bei der Glutathionsynthese gilt die Verfügbarkeit von Cystein.

Da das N-Acetylcystein ein anerkannter Cysteindonator ist, wurde in der vorliegenden Arbeit versucht zu klären, ob sich der zelluläre Glutathiongehalt von zwei als Alveolarepithel Typ II charakterisierten Zelllinien (L2, A549) durch Gabe von N-Acetylcystein erhöhen lässt.

Des weiteren stellte sich die Frage, ob vor oder während der Zinkbelastung durchgeführte NAC-Gabe die zink-bedingte Zellschädigung vermindert.

Neben der Eigenschaft als Cysteindonator für die Glutathionsynthese hat NAC weitere zinkantagonistische Effekte. So kann NAC als Zinkchelator fungieren und die wirksame freie Zinkkonzentration vermindern.

In der ersten Versuchsreihe fand die Inkubation mit NAC vor der Inkubation mit Zink statt, eine direkte Interaktion von NAC mit Zink extrazellulär wurde somit vermieden.

In der zweiten Versuchsreihe wurden die Zellen simultan zur Zinkbelastung mit N-Acetylcystein inkubiert. Als Kontrolle diente hier das D-Derivat N-Acetyl-D-cystein, das die gleichen zinkkomplexierenden und antioxidativen Eigenschaften wie NAC besitzt, allerdings nicht als biologischer Donator von Cystein für die Glutathionsynthese wirken kann.

Als nächstes interessierte, ob die erhöhte Sensitivität der Alveolarepithelzellen nach Vorbehandlung mit Hydrocortison wiederum durch Unterstützung der Glutathionsynthese durch NAC aufhebbar ist.

Diesbezüglich wurden die Zellen in beiden Versuchsreihen teilweise mit Hydrocortison für zwei Tage vorbehandelt, als Kontrolle dienten nicht vorbehandelte Ansätze.

Als Parameter für Zinktoxizität bzw. Sensibilität der Zellen wurden die zinkkonzentrationsabhängige Abnahme des intrazellulären Gesamtglutathions (Glutathiondepletion), der Anstieg des Anteils von oxidiertem Glutathion am Gesamtglutathion und als unspezifischer Parameter die Verminderung der Proteinsynthese (Einbauhemmung von radioaktiv markiertem Methionin) herangezogen.

Ergebnisse:

1. Nach einer Vorbehandlung der L2 bzw. A549 Zellen mit 200 $\mu\text{mol/l}$ NAC war keine Erhöhung der zellulären Glutathiongehalte im Vergleich zu nicht vorbehandelten Zellen zu finden.
2. Bei Verminderung des Cystein-Gehaltes im Medium von 100 auf 10 bzw. 1 $\mu\text{mol/l}$ für 3 h (L2) bzw. 4 h (A549) zeigte sich eine Abnahme des zellulären Glutathiongehaltes auf ca. 60-70 %.
3. Unter fehlender Zinkbelastung war bei vermindertem Cystein-Gehalt im Medium auch durch die Gabe von 200 $\mu\text{mol/l}$ NAC im Vergleich zu NADC-Kontrollen keine Erhöhung des zellulären Glutathiongehaltes zu bewirken.
4. Durch eine simultane Inkubation mit NAC während der Zinkbelastung zeigte sich lediglich bei starkem Cysteinmangel im Medium (1 $\mu\text{mol/l}$) ein günstiger Einfluss von NAC in Vergleich zu NADC auf die Glutathiondepletion und die anderen untersuchten Toxizitätsparameter.
5. Nach Vorbehandlung der L2 bzw. A549 Zellen mit 100 $\mu\text{mol/l}$ Hydrocortison konnte die in der Literatur beschriebene Glutathiondepletion bestätigt werden. Die durch Hydrocortison bedingte erhöhte Zinktoxizität konnte nur in geringem Ausmaß durch die NAC-Gabe aufgehoben werden.

Insgesamt konnte durch die vorliegenden Untersuchungen gezeigt werden, dass beim Fehlen von oxidativem Stress eine NAC-Substitution keine Erhöhung des intrazellulären Glutathiongehaltes in L2 und A549 Zellen bewirkt. Eine NAC-Gabe führt nur bei gleichzeitigem oxidativen Stress und Cysteinmangel im Medium zu einer geringen Verminderung der Zinktoxizität in Typ 2 Alveolarepithelzelllinien.

So erscheint es wahrscheinlich, dass die Inkubation mit N-Acetylcystein in der verwendeten Konzentration bei der Zinkbelastung keinen relevanten GSH-synthesesteigernden Effekt hat.

7. Literaturnachweis

1. Abraham E, Park YC, Covington P, Conrad SA und Schwartz M. Liposomal prostaglandin E1 in acute respiratory distress syndrome: a placebo-controlled, randomized, double-blind, multicenter clinical trial. *Crit Care Med.* **24**, 10-15 (1996).
2. Adhikari N, Burns KE und Meade MO. Pharmacologic therapies for adults with acute lung injury and acute respiratory distress syndrome. *Cochrane. Database. Syst. Rev.* CD004477 (2004).
3. Allen JC, Vaillancourt SJ und Haedrich L. Glucocorticoid and polyamine involvement in zinc uptake by COMMA-1D mammary epithelial cells. *Biol. Trace Elem. Res.* **39**, 229-243 (1993).
4. Allen JN, Pacht ER, Gadek JE und Davis WB. Acute eosinophilic pneumonia as a reversible cause of noninfectious respiratory failure. *N. Engl. J. Med.* **321**, 569-574 (1989).
5. Amdur MO, McCarthy JF und Gill MW. Respiratory response of guinea pigs to zinc oxide fume. *Am. Ind. Hyg. Assoc. J* **43**, 887-889 (1982).
6. Anzueto A, Baughman RP, Guntupalli KK, Weg JG, Wiedemann HP, Raventos AA, Lemaire F, Long W, Zaccardelli DS und Pattishall EN. Aerosolized surfactant in adults with sepsis-induced acute respiratory distress syndrome. Exosurf Acute Respiratory Distress Syndrome Sepsis Study Group. *N. Engl. J. Med.* **334**, 1417-1421 (1996).
7. Arakawa M, Ushimaru N, Osada N, Oda T, Ishige K und Ito Y. N-acetylcysteine selectively protects cerebellar granule cells from 4-hydroxynonenal-induced cell death. *Neurosci. Res.* **55**, 255-263 (2006).
8. Artigas A, Bernard GR, Carlet J, Dreyfuss D, Gattinoni L, Hudson L, Lamy M, Marini JJ, Matthay MA, Pinsky MR, Spragg R und Suter PM. The American-European Consensus Conference on ARDS, part 2: Ventilatory, pharmacologic, supportive therapy, study design strategies, and issues related to recovery and remodeling. Acute respiratory distress syndrome. *Am. J. Respir. Crit Care Med.* **157**, 1332-1347 (1998).
9. Aruoma OI, Halliwell B, Hoey BM und Butler J. The antioxidant action of N-acetylcysteine: its reaction with hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide, and hypochlorous acid. *Free Radic. Biol. Med* **6**, 593-597 (1989).
10. Asayama K, Hayashibe H, Dobashi K, Uchida N und Kato K. Effect of dexamethasone on antioxidant enzymes in fetal rat lungs and kidneys. *Biol. Neonate* **62**, 136-144 (1992).
11. Bernard GR. N-acetylcysteine in experimental and clinical acute lung injury. *Am. J Med* **91**, 54S-59S (1991).
12. Bernard GR, Artigas A, Brigham KL, Carlet J, Falke K, Hudson L, Lamy M, Legall JR, Morris A und Spragg R. The American-European Consensus Conference on

- ARDS. Definitions, mechanisms, relevant outcomes, and clinical trial coordination. *Am. J. Respir. Crit Care Med.* **149**, 818-824 (1994).
13. Bernard GR, Luce JM, Sprung CL, Rinaldo JE, Tate RM, Sibbald WJ, Kariman K, Higgins S, Bradley R, Metz CA und . High-dose corticosteroids in patients with the adult respiratory distress syndrome. *N. Engl. J. Med.* **317**, 1565-1570 (1987).
 14. Bernard GR, Wheeler AP, Arons MM, Morris PE, Paz HL, Russell JA und Wright PE. A trial of antioxidants N-acetylcysteine and procysteine in ARDS. The Antioxidant in ARDS Study Group. *Chest* **112**, 164-172 (1997).
 15. Bone RC, Fisher CJ, Jr., Clemmer TP, Slotman GJ und Metz CA. Early methylprednisolone treatment for septic syndrome and the adult respiratory distress syndrome. *Chest* **92**, 1032-1036 (1987).
 16. Brewer GJ. Molecular mechanisms of zinc action on cells. *Agents Actions Suppl* **8**, 37-49 (1981).
 17. Buhl R, Vogelmeier C, Critenden M, Hubbard RC, Hoyt RF, Jr., Wilson EM, Cantin AM und Crystal RG. Augmentation of glutathione in the fluid lining the epithelium of the lower respiratory tract by directly administering glutathione aerosol. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **87**, 4063-4067 (1990).
 18. Cantin AM und Begin R. Glutathione and inflammatory disorders of the lung. *Lung* **169**, 123-138 (1991).
 19. Choi J, Liu RM und Forman HJ. Adaptation to oxidative stress: quinone-mediated protection of signaling in rat lung epithelial L2 cells. *Biochem. Pharmacol* **53**, 987-993 (1997).
 20. Corcoran GB und Wong BK. Role of glutathione in prevention of acetaminophen-induced hepatotoxicity by N-acetyl-L-cysteine in vivo: studies with N-acetyl-D-cysteine in mice. *J Pharmacol Exp. Ther.* **238**, 54-61 (1986).
 21. Cotes JE & Steel J. Work-related lung disorders. (1987).
 22. Cotgreave I, Moldeus P und Schuppe I. The metabolism of N-acetylcysteine by human endothelial cells. *Biochem. Pharmacol* **42**, 13-16 (1991).
 23. Cousins RJ, Liuzzi JP und Lichten LA. Mammalian zinc transport, trafficking, and signals. *J Biol. Chem.* **281**, 24085-24089 (2006).
 24. Cowan GAB. Unusual case of poisoning by zinc sulphate. *Brit Med J* **1**, 451-452 (1947).
 25. Danfour M, Schorah CJ und Evans SW. Changes in sensitivity of a human myeloid cell line (U937) to metal toxicity after glutathione depletion. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* **21**, 277-293 (1999).
 26. Domingo JL, Llobet JM, Paternain JL und Corbella J. Acute zinc intoxication: comparison of the antidotal efficacy of several chelating agents. *Vet. Hum. Toxicol* **30**, 224-228 (1988).

27. Douglas WH, Sommers-Smith SK und Johnston JM. Phosphatidate phosphohydrolase activity as a marker for surfactant synthesis in organotypic cultures of type II alveolar pneumonocytes. *J Cell Sci.* **60**, 199-207 (1983).
28. Elstner EF. Der Sauerstoff. BI Wissenschaftsverlag Mannheim, (1991).
29. Englmann L. Management des akuten Lungenversagens Diagnostik-Beatmung-Entwöhnung. *Der Internist* **46**, 298-309 (2005).
30. Epler GR, Colby TV, McLoud TC, Carrington CB und Gaensler EA. Bronchiolitis obliterans organizing pneumonia. *N. Engl. J. Med.* **312**, 152-158 (1985).
31. Evans EH. Casualties following exposure to zinc chloride smoke. *Lancet* **II**, 368-370 (1945).
32. Failla ML und Cousins RJ. Zinc accumulation and metabolism in primary cultures of adult rat liver cells. Regulation by glucocorticoids. *Biochim. Biophys. Acta* **543**, 293-304 (1978).
33. Failli P, Palmieri L, D'Alfonso C, Giovannelli L, Generini S, Rosso AD, Pignone A, Stanflin N, Orsi S, Zilletti L und Matucci-Cerinic M. Effect of N-acetyl-L-cysteine on peroxynitrite and superoxide anion production of lung alveolar macrophages in systemic sclerosis. *Nitric. Oxide.* **7**, 277-282 (2002).
34. Frazier JM. Application of the basic toxicological screening process to problems in bound residue toxicity. *Drug Metab Rev* **22**, 821-827 (1990).
35. Freedman JH, Ciriolo MR und Peisach J. The role of glutathione in copper metabolism and toxicity. *J Biol. Chem.* **264**, 5598-5605 (1989).
36. Freshney RI. Cultures of animal cells. - A manual of basic technique -. Alan R. Liss, Inc, New York (1987).
37. Gagnon S, Boota AM, Fischl MA, Baier H, Kirksey OW und La Voie L. Corticosteroids as adjunctive therapy for severe *Pneumocystis carinii* pneumonia in the acquired immunodeficiency syndrome. A double-blind, placebo-controlled trial. *N. Engl. J. Med.* **323**, 1444-1450 (1990).
38. Gaither LA und Eide DJ. The human ZIP1 transporter mediates zinc uptake in human K562 erythroleukemia cells. *J Biol. Chem.* **276**, 22258-22264 (2001).
39. Gillissen A, Jaworska M, Orth M, Coffiner M, Maes P, App EM, Cantin AM und Schultze-Werninghaus G. Nacystelyn, a novel lysine salt of N-acetylcysteine, to augment cellular antioxidant defence in vitro. *Respir Med* **91**, 159-168 (1997).
40. Gillissen A und Nowak D. Characterization of N-acetylcysteine and ambroxol in antioxidant therapy. *Respir Med* **92**, 609-623 (1998).
41. Godfrey JC, Godfrey NJ und Novick SG. Zinc for treating the common cold: review of all clinical trials since 1984. *Altern. Ther. Health Med.* **2**, 63-72 (1996).
42. Gogu SR und Agrawal KC. The protective role of zinc and N-acetylcysteine in modulating zidovudine induced hematopoietic toxicity. *Life Sci* **59**, 1323-1329 (1996).

43. Goldstein G und Luce JM. Pharmacologic treatment of the adult respiratory distress syndrome. *Clin. Chest Med.* **11**, 773-787 (1990).
44. Gordon T, Chen LC, Fine JM, Schlesinger RB, Su WY, Kimmel TA und Amdur MO. Pulmonary effects of inhaled zinc oxide in human subjects, guinea pigs, rats, and rabbits. *Am. Ind. Hyg. Assoc. J* **53**, 503-509 (1992).
45. Gregory TJ, Steinberg KP, Spragg R, Gadek JE, Hyers TM, Longmore WJ, Moxley MA, Cai GZ, Hite RD, Smith RM, Hudson LD, Crim C, Newton P, Mitchell BR und Gold AJ. Bovine surfactant therapy for patients with acute respiratory distress syndrome. *Am. J. Respir. Crit Care Med.* **155**, 1309-1315 (1997).
46. Griffith O.W. und Meister A. Translocation of intracellular glutathione to membrane-bound γ -glutamyltranspeptidase as a discrete step in the γ -glutamyl-cycle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **76**, 268-272 (1979).
47. Harford C und Sarkar B. Induction of metallothionein by simultaneous administration of cadmium(II) and zinc(II). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **177**, 224-228 (1991).
48. Hartwig A. Role of DNA repair inhibition in lead- and cadmium-induced genotoxicity: a review. *Environ. Health Perspect.* **102 Suppl 3**, 45-50 (1994).
49. Hay R, Macy M, Chen TR, McClintock P & Reid Y. ATCC: Catalogue of cell lines & hybridomas. Rockville, Maryland (1992).
50. Headley AS, Tolley E und Meduri GU. Infections and the inflammatory response in acute respiratory distress syndrome. *Chest* **111**, 1306-1321 (1997).
51. Helm KU und Renovanz H-D. Die Zinknebelvergiftung und ihre Behandlung. Beschreibung einer Intensivtherapie unter besonderer Berücksichtigung der Erfahrungen mit extrem hohen inhalativen und parenteralen Glukokortikoiddosierungen. *Wehrmed Mschr* **15**, 236-243 (1971).
52. Hjortso E, Qvist J, Bud MI, Thomsen JL, Andersen JB, Wiberg-Jorgensen F, Jensen NK, Jones R, Reid LM und Zapol WM. ARDS after accidental inhalation of zinc chloride smoke. *Intensive Care Med.* **14**, 17-24 (1988).
53. HOEKSTRA JA. [Sequelae of the exposure to the content of smoke screen containers.]. *Ned. Milit. Geneesk. Tijdschr.* **16**, 141-147 (1963).
54. Hoffer E., Baum Y. und Tabak A. N-acetylcysteine increases the glutathione content and protects rat alveolar type II cells against paraquat-induced cytotoxicity. *Toxicology Letters* **84**, 7-12 (1996).
55. Homma S, Jones R, Qvist J, Zapol WM und Reid L. Pulmonary vascular lesions in the adult respiratory distress syndrome caused by inhalation of zinc chloride smoke: a morphometric study. *Hum. Pathol.* **23**, 45-50 (1992).
56. Hooper RG und Kearn RA. Established adult respiratory distress syndrome successfully treated with corticosteroids. *South. Med. J.* **89**, 359-364 (1996).

57. Hudson LD, Milberg JA, Anardi D und Maunder RJ. Clinical risks for development of the acute respiratory distress syndrome. *Am. J. Respir. Crit Care Med.* **151**, 293-301 (1995).
58. Inczédy J und Maróthy J. Metal complexes on N-acetyl-cysteine. *Acta Chim Acad Sci Hung* **86**, 1-2 (1975).
59. Jepsen S, Herlevsen P, Knudsen P, Bud MI und Klausen NO. Antioxidant treatment with N-acetylcysteine during adult respiratory distress syndrome: a prospective, randomized, placebo-controlled study. *Crit Care Med* **20**, 918-923 (1992).
60. Kaufman B und Dhar P. Acute respiratory distress syndrome: Potential pharmacologic interventions. *J Pharm Pract* **11**, 466-485 (1998).
61. Kim EY, Chang SY, Chung JM, Ryu BR, Joo CK, Moon HS, Kang K, Yoon SH, Han PL und Gwag BJ. Attenuation of Zn²⁺ neurotoxicity by aspirin: role of N-type Ca²⁺ channel and the carboxyl acid group. *Neurobiol. Dis* **8**, 774-783 (2001).
62. Lai YK, Shen CH, Cheng TJ, Hou MC und Lee WC. Enhanced phosphorylation of a 65 kDa protein is associated with rapid induction of stress proteins in 9L rat brain tumor cells. *J Cell Biochem.* **51**, 369-379 (1993).
63. Lam HF, Peisch R und Amdur MO. Changes in lung volumes and diffusing capacity in guinea pigs exposed to a combination of sulfur dioxide and submicron zinc oxide mixed in a humidified furnace. *Toxicol Appl. Pharmacol* **66**, 427-433 (1982).
64. Levenson CW. Zinc supplementation: neuroprotective or neurotoxic? *Nutr. Rev* **63**, 122-125 (2005).
65. Lieber M, Smith B, Szakal A, Nelson-Rees W und Todaro G. A continuous tumor-cell line from a human lung carcinoma with properties of type II alveolar epithelial cells. *Int. J Cancer* **17**, 62-70 (1976).
66. Lu SC, Ge JL, Kuhlenkamp J und Kaplowitz N. Insulin and glucocorticoid dependence of hepatic gamma-glutamylcysteine synthetase and glutathione synthesis in the rat. Studies in cultured hepatocytes and in vivo. *J. Clin. Invest* **90**, 524-532 (1992).
67. Luce JM. Acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. *Crit Care Med.* **26**, 369-376 (1998).
68. Luhr OR, Antonsen K, Karlsson M, Aardal S, Thorsteinsson A, Frostell CG und Bonde J. Incidence and mortality after acute respiratory failure and acute respiratory distress syndrome in Sweden, Denmark, and Iceland. The ARF Study Group. *Am. J Respir Crit Care Med* **159**, 1849-1861 (1999).
69. Lundin S, Mang H, Smithies M, Stenqvist O und Frostell C. Inhalation of nitric oxide in acute lung injury: results of a European multicentre study. The European Study Group of Inhaled Nitric Oxide. *Intensive Care Med.* **25**, 911-919 (1999).
70. MACAULAY MB und MANT AK. SMOKE-BOMB POISONING. A FATAL CASE FOLLOWING THE INHALATION OF ZINC CHLORIDE SMOKE. *J.R. Army Med Corps* **110**, 27-32 (1964).

71. Maret W. The function of zinc metallothionein: a link between cellular zinc and redox state. *J. Nutr.* **130**, 1455S-1458S (2000).
72. Meduri GU, Headley AS, Golden E, Carson SJ, Umberger RA, Kelso T und Tolley EA. Effect of prolonged methylprednisolone therapy in unresolving acute respiratory distress syndrome: a randomized controlled trial. *JAMA* **280**, 159-165 (1998).
73. Meister A. Glutathione deficiency produced by inhibition of its synthesis, and its reversal; applications in research and therapy. *Pharmacol Ther.* **51**, 155-194 (1991).
74. Meshitsuka S, Ishizawa M und Nose T. Uptake and toxic effects of heavy metal ions: interactions among cadmium, copper and zinc in cultured cells. *Experientia* **43**, 151-156 (1987).
75. Millar BC und Jinks S. Studies on the relationship between the radiation resistance and glutathione content of human and rodent cells after treatment with dexamethasone in vitro. *Int. J Radiat. Biol. Relat Stud. Phys. Chem. Med* **47**, 539-552 (1985).
76. Milliken JA. Acute interstitial pulmonary fibrosis caused by a smoke bomb. *Canad Med Ass J* **88**, 33-39 (1963).
77. Mossad SB, Macknin ML, Medendorp SV und Mason P. Zinc gluconate lozenges for treating the common cold. A randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Ann. Intern. Med.* **125**, 81-88 (1996).
78. Mueller EJ und Seger DL. Metal fume fever--a review. *J Emerg. Med* **2**, 271-274 (1985).
79. Murphy JV. Intoxication following ingestion of elemental zinc. *JAMA* **212**, 2119-2120 (1970).
80. Neal R, Matthews RH, Lutz P und Ercal N. Antioxidant role of N-acetyl cysteine isomers following high dose irradiation. *Free Radic. Biol. Med* **34**, 689-695 (2003).
81. Nemery B. Metal toxicity and the respiratory tract. *Eur. Respir. J* **3**, 202-219 (1990).
82. Olbruck H, Seemayer NH, Voss B und Wilhelm M. Supernatants from quartz dust treated human macrophages stimulate cell proliferation of different human lung cells as well as collagen-synthesis of human diploid lung fibroblasts in vitro. *Toxicol Lett.* **96-97**, 85-95 (1998).
83. Ortolani O, Conti A, De Gaudio AR, Masoni M und Novelli G. Protective effects of N-acetylcysteine and rutin on the lipid peroxidation of the lung epithelium during the adult respiratory distress syndrome. *Shock* **13**, 14-18 (2000).
84. Pacht ER, Timerman AP, Lykens MG und Merola AJ. Deficiency of alveolar fluid glutathione in patients with sepsis and the adult respiratory distress syndrome. *Chest* **100**, 1397-1403 (1991).
85. Pettila V, Takkunen O und Tukiainen P. Zinc chloride smoke inhalation: a rare cause of severe acute respiratory distress syndrome. *Intensive Care Med.* **26**, 215-217 (2000).

86. Phelps DT, Deneke SM, Daley DL und Fanburg BL. Elevation of glutathione levels in bovine pulmonary artery endothelial cells by N-acetylcysteine. *Am J Respir Cell Mol Biol.* **7**, 293-299 (1992).
87. Piantadosi CA und Schwartz DA. The acute respiratory distress syndrome. *Ann. Intern. Med.* **141**, 460-470 (2004).
88. Prasad A.S. Clinical, biochemical and pharmacological role of zinc. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 393-426 (1970).
89. Raftos JE, Dwarte TM, Luty A und Willcock CJ. Direct measurement of the rate of glutathione synthesis in 1-chloro-2,4-dinitrobenzene treated human erythrocytes. *Redox. Rep.* **11**, 9-14 (2006).
90. Rahman I und MacNee W. Role of transcription factors in inflammatory lung diseases. *Thorax* **53**, 601-612 (1998).
91. Ramu K, Perry CS, Ahmed T, Pakenham G und Kehrer JP. Studies on the basis for the toxicity of acrolein mercapturates. *Toxicol Appl. Pharmacol* **140**, 487-498 (1996).
92. Read SM und Northcote DH. Minimization of variation in the response to different proteins of the Coomassie blue G dye-binding assay for protein. *Anal. Biochem.* **116**, 53-64 (1981).
93. Reed DJ. Glutathione: toxicological implications. *Annu. Rev Pharmacol Toxicol* **30**, 603-631 (1990).
94. Ripa S und Ripa R. Zinc and immune function. *Minerva Med.* **86**, 315-318 (1995).
95. Ritter D, Knebel JW, Aufderheide M und Mohr U. Development of a cell culture model system for routine testing of substances inducing oxidative stress. *Toxicol in Vitro* **13**, 745-751 (1999).
96. ROHRS LC. Metal-fume fever from inhaling zinc oxide. *AMA. Arch. Ind. Health* **16**, 42-47 (1957).
97. Rubin H und Koide T. Early cellular responses to diverse growth stimuli independent of protein and RNA synthesis. *J. Cell Physiol* **86**, 47-58 (1975).
98. Salgueiro MJ, Zubillaga M, Lysionek A, Cremaschi G, Goldman CG, Caro R, De Paoli T, Hager A, Weill R und Boccio J. Zinc status and immune system relationship: a review. *Biol. Trace Elem. Res.* **76**, 193-205 (2000).
99. Schaidt G, Geldmacher-von Mallinckrodt M und Opitz O. [Zinc distribution in body fluids and organs after fatal zinc smoke poisoning]. *Beitr. Gerichtl. Med* **37**, 351-355 (1979).
100. Schaidt G, Geldmacher-von Mallinckrodt M und Opitz O. [Zinc distribution in body fluids and organs after fatal zinc smoke poisoning]. *Beitr. Gerichtl. Med* **37**, 351-355 (1979).
101. Schmahl K. [Clinical signs in zinc-chloride smoke intoxication (author's transl)]. *Pneumonologie.* **150**, 161-169 (1974).

102. Schonfeld SA, Ploysongsang Y, DiLisio R, Crissman JD, Miller E, Hammerschmidt DE und Jacob HS. Fat embolism prophylaxis with corticosteroids. A prospective study in high-risk patients. *Ann Intern. Med* **99**, 438-443 (1983).
103. Shankar AH und Prasad AS. Zinc and immune function: the biological basis of altered resistance to infection. *Am. J. Clin. Nutr.* **68**, 447S-463S (1998).
104. Smith RM & Martell AE. Critical stability constants. Plenum Press, New York, (1975).
105. Solomons NW. Mild human zinc deficiency produces an imbalance between cell-mediated and humoral immunity. *Nutr. Rev.* **56**, 27-28 (1998).
106. Soutourina J, Blanquet S und Plateau P. Role of D-cysteine desulphhydrase in the adaptation of Escherichia coli to D-cysteine. *J Biol. Chem.* **276**, 40864-40872 (2001).
107. Spagnuolo G, D'anto V, Cosentino C und Rengo S. Effect of N-acetyl-L-cysteine on ROS production and cell death caused by HEMA in human primary gingival fibroblasts. *Biomater* **27**, 1803-1809 (2006).
108. St Croix CM, Leelavaninchkul K, Watkins SC, Kagan VE und Pitt BR. Nitric oxide and zinc homeostasis in acute lung injury. *Proc. Am. Thorac. Soc.* **2**, 236-242 (2005).
109. Steinebach OM und Wolterbeek HT. Effects of zinc on rat hepatoma HTC cells and primary cultured rat hepatocytes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **118**, 245-254 (1993).
110. Suter PM, Domenighetti G, Schaller MD, Laverriere MC, Ritz R und Perret C. N-acetylcysteine enhances recovery from acute lung injury in man. A randomized, double-blind, placebo-controlled clinical study. *Chest* **105**, 190-194 (1994).
111. Tapiero H und Tew KD. Trace elements in human physiology and pathology: zinc and metallothioneins. *Biomed. Pharmacother.* **57**, 399-411 (2003).
112. Taylor KM, Morgan HE, Johnson A und Nicholson RI. Structure-function analysis of a novel member of the LIV-1 subfamily of zinc transporters, ZIP14. *FEBS Lett.* **579**, 427-432 (2005).
113. Taylor KM und Nicholson RI. The LZT proteins; the LIV-1 subfamily of zinc transporters. *Biochim. Biophys. Acta* **1611**, 16-30 (2003).
114. Taylor RW, Zimmerman JL, Dellinger RP, Straube RC, Criner GJ, Davis K, Jr., Kelly KM, Smith TC und Small RJ. Low-dose inhaled nitric oxide in patients with acute lung injury: a randomized controlled trial. *JAMA* **291**, 1603-1609 (2004).
115. Tietze F. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. *Anal. Biochem.* **27**, 502-522 (1969).
116. Todd JK. Therapy of toxic shock syndrome. *Drugs* **39**, 856-861 (1990).
117. Vallee BL und Falchuk KH. The biochemical basis of zinc physiology. *Physiol Rev.* **73**, 79-118 (1993).

118. Vincent JL, Brase R, Santman F, Suter PM, McLuckie A, Dhainaut JF, Park Y und Karmel J. A multi-centre, double-blind, placebo-controlled study of liposomal prostaglandin E1 (TLC C-53) in patients with acute respiratory distress syndrome. *Intensive Care Med.* **27**, 1578-1583 (2001).
119. Walther SC. Einfluß von Antioxidantien auf den Glutathion-Metabolismus unter Zinkbelastung in kultivierten Lungenzellen. 2007. Dissertation Ludwig-Maximilians-Universität München.
120. Walther UI, Mückter H, Fichtl B und Forth W. Effect of hydrocortisone pretreatment on decreased proteine synthesis in various lung cells after zinc chloride incubation. *In Vitro Mol Toxicol* **12**, 109-117 (1999).
121. Walther UI, Czermak A, Muckter H, Walther SC und Fichtl B. Decreased GSSG reductase activity enhances cellular zinc toxicity in three human lung cell lines. *Arch. Toxicol* **77**, 131-137 (2003).
122. Walther UI, Muckter H, Fichtl B und Forth W. Influence of glutathione on zinc-mediated cellular toxicity. *Biol. Trace Elem. Res.* **67**, 97-107 (1999).
123. Walther UI, Muckter H, Wallner B, Bergen U, Duggen S, Unsinn G, Walther SC und Fichtl B. Effect of low level zinc pretreatment on zinc-mediated toxicity in different lung cell lines. *Biol. Trace Elem. Res.* **88**, 45-57 (2002).
124. Walther UI, Wilhelm B, Walther S, Muckter H und Fichtl B. Zinc toxicity in various lung cell lines is mediated by glutathione and GSSG reductase activity. *Biol. Trace Elem. Res.* **78**, 163-177 (2000).
125. Ware LB und Matthay MA. The acute respiratory distress syndrome. *N. Engl. J. Med.* **342**, 1334-1349 (2000).
126. Ware LB und Matthay MA. Alveolar fluid clearance is impaired in the majority of patients with acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. *Am. J. Respir. Crit Care Med.* **163**, 1376-1383 (2001).
127. Weigelt JA, Norcross JF, Borman KR und Snyder WH, III. Early steroid therapy for respiratory failure. *Arch. Surg.* **120**, 536-540 (1985).
128. Werner SH *et al.* Macro and Trace Elements. Anke M, Müller R, Schäfer U & Stoeppler M (eds.), pp. 13-18 (Schubert Verlag, Leipzig, 2002).
129. Weser U, Seeber S und Warnecke P. [Effect of divalent zinc on nucleic acid biosynthesis in ascites tumor cells]. *Experientia* **25**, 489-490 (1969).
130. WHO. VITAMIN AND MINERAL REQUIREMENTS IN HUMAN NUTRITION. 1998.
131. Wilhelm B, Walther UI und Fichtl B. Effects of zinc chloride on glutathione and glutathione synthesis rates in various lung cell lines. *Arch. Toxicol* **75**, 388-394 (2001).

132. Zeki Y. und Mahir K. Attenuation of bleomycin-induced lung-fibrosis by oral sulfhydryl containing antioxidants in rats: erdosteine and N-acetylcysteine. *Pulmonary Pharmacology and Therapeutics* **18**, 367-373 (2005).
133. Zerahn B und Kofoed-Enevoldsen A. Pulmonary damage after modest exposure to zinc chloride smoke. *Respir Med* **93**, 885-890 (1999).

8. Danksagung

Herrn Privatdozenten Dr. Udo Walther danke ich ganz herzlich für die Überlassung des Themas, intensive wissenschaftliche Betreuung, seine stetige Unterstützung bei der Planung, Diskussion und Anteilnahme am Entstehen dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. P. Eyer und Herrn Prof. Dr. B. Fichtl danke ich für die Überlassung des Arbeitsplatzes und Förderung dieser Arbeit.

Allen Mitarbeitern des Walther-Straub-Instituts für Pharmakologie und Toxikologie der Ludwig-Maximilians-Universität München, insbesondere meinen Laborkollegen danke ich für die ständige Hilfsbereitschaft, gute Zusammenarbeit und freundschaftliche Atmosphäre.

9. Lebenslauf

Name: Temrück

Vorname: Olga

Geboren: 27.08.1975 in Frunse, Kyrgyzistan

Schulbildung: 1982 – 1992 Mittelschule Nr. 56 in Frunse, Kyrgyzistan
1996 – 1997 Gymnasium Marktoberdorf, Abitur

Studium: 1992 – 1994 Studium der Germanistik an der Kyrgyischen Staatlichen
Universität in Frunse, Kyrgyzistan
1998 – 2004 Studium der Medizin an der Ludwig-Maximilian-
Universität in München
2004 Approbation als Ärztin

Promotion: seit 2002 am Walther-Straub-Institut für Pharmakologie und Toxikologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Beschäftigung: seit 2005 Assistenzärztin in der Fachrichtung Neurologie am Klinikum
Ingolstadt