

Aus der Abteilung für klinische Immunologie und Asthmapoliklinik
Charite
Campus Virchow Klinikum
Prof. Dr. G. Kunkel

DISSERTATION

**Die Regulation antioxidativer Enzyme
nach Ozonexposition
am Kulturmodell der menschlichen
Nasenschleimhaut**

Zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae (Dr. med.)

An der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt Universität zu Berlin

Vorgelegt von Ralf Otto-Knapp

Dekan: Prof. Dr. J. D. Dudenhausen

Gutachter: 1. Prof. Dr. G. Kunkel
2. Prof. Dr. H. Lode
3. Prof. Dr. R. Loddenkemper

eingereicht: 29.11.2000

Datum der Promotion: 29.06.2001

Zusammenfassung

Die antioxidativen Enzyme Katalase (KAT), Glutathion-Peroxidase (GPX), Glutathion-Reduktase (GR), Superoxid-Dismutase (SOD) und Glutathion-S-Transferase (GST) sind an der intrazellulären Abwehr von oxidativem Stress beteiligt. Diverse Arbeitsgruppen fanden eine Hochregulation der antioxidativen Enzyme (AOEs) nach Exposition auf Ozon. In der vorliegenden Studie sollte an einem von Schierhorn und Mitarbeitern entwickelten Kulturmodell der nasalen Mukosa des Menschen untersucht werden, ob Aktivitätsänderungen der AOEs nach Ozonexposition in vitro zu verzeichnen sind. Zu diesem Zweck wurde die nasale Mukosa von 67 Patienten, die sich wegen nasaler Atmungsbehinderung einer Conchotomie unterzogen hatten, 24 Stunden bei 37 °C und 5% CO₂ kultiviert und parallel unter den selben Bedingungen einer zusätzlichen Ozonkonzentration von 120 ppb ausgesetzt. Tendenzielle Aktivitätsänderungen durch Ozon ließen sich bei der GPX (13.8 auf 17.7 mU/mg Protein, 28% Steigerung) und der SOD (8.4 auf 9.7 U/mg Protein, 15% Steigerung) feststellen. Diese Aktivitätszunahmen wiesen jedoch keine Signifikanz auf. Aktivitätsänderungen bei KAT, GR und GST durch die Ozonexposition wurden nicht gefunden. Alter der Patienten, Geschlecht und Zigarettenrauchen nahmen den Ergebnissen dieser Studie nach keinen Einfluß auf die Regulation der AOEs nach Ozonexposition.

Die Deletion der Glutathion-S-Transferase M1, die bei etwa 50% der mitteleuropäischen Bevölkerung zu finden ist, veränderte die Regulation der SOD nach in vitro Ozonexposition. Die GST-defizienten Patienten dieser Studie beantworteten die Ozonexposition mit einer signifikanten Hochregulation der SOD ($p < 0.01$), während die Patienten, für die keine GSTM1-Defizienz gefunden wurde, keine signifikante Änderung der enzymatischen SOD-Aktivität nach Ozon aufwiesen. Für die KAT, GPX, GR und GST war die GSTM1-Defizienz bezüglich ihrer Aktivitätsänderungen nach Ozon ohne Relevanz.

Schlußfolgerungen: Am Modell der menschlichen Nasenschleimhaut in vitro ließ sich keine signifikante Änderung der antioxidativen Enzymaktivitäten nach 24-stündiger Ozonexposition von 120 ppb beobachten. Vermutlich spielen die antioxidativen Enzyme

keine Rolle bei der Abwehr einer oxidativen Ozonbelastung dieser Dauer und Konzentration. Bei Glutathion-S-Transferase M1 Defizienz findet eine Hochregulation der Superoxid-Dismutase nach Ozonexposition statt. Dieses Ergebnis könnte auf eine modulierte enzymatische Regulation durch den GSTM1-Polymorphismus hinweisen.

Abstract

Antioxidant enzymes as catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPX), superoxide dismutase (SOD) and glutathione S-transferase (GST) are thought the primary cellular defense mechanism against reactive oxygen species. Ozone, a highly reactive oxidant, is known to cause respiratory symptoms at ambiental doses. A number of studies have shown the mucosa of the respiratory tract to be the first target site of ozone toxicity. Other animal studies demonstrated an upregulation of mucosal antioxidant enzymes after ozone exposition. Concerning to the antioxidant defense mechanisms of the human nasal mucosa no studies are found so far.

The purpose of this study was to determine if in vitro ozone exposure of human nasal mucosa results in changes in the activity of CAT, GPX, SOD, GST and glutathione reductase (GR). Nasal mucosa from 67 patients was cultivated in a specially designed in vitro organ culture and exposed to 120 ppb ozone for 24 hours. The results were compared with the histamin release which is known to be upregulated from human nasal mucosa after ozone exposition (60-200 ppb).

Schlagwörter:

Antioxidative Enzyme, Ozon, GSTM1, Kulturmodell menschlicher nasaler Mukosa

Keywords:

antioxidative enzymes, ozone, GSTM1, culture modell of human nasal mucosa

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	6
1.1. Oxidativer Stress	6
1.1.1. Ozon (O ₃) als Bestandteil des saisonalen photochemischen Smogs	6
1.1.2. Physiologische Auswirkungen der Ozonbelastung	7
1.1.3. Biochemische Grundlagen der Ozonwirkung am Epithel	8
1.1.4. Zellulärer oxidativer Stress und seine physiologischen Abwehrmechanismen	9
1.2. Antioxidative Enzyme (AOEs)	10
1.2.1. Katalase (KAT)	10
1.2.2. Glutathion-Redoxzyklus	11
1.2.3. Die Superoxid-Dismutase (SOD)	13
1.2.4. Glutathion-S-Transferase (GST)	15
1.2.5. Polymorphismus der Glutathion-S-Transferase M1 (GSTM1)	17
1.2.6. Die Bedeutung der antioxidativen Enzyme als Abwehrmechanismus bei Ozonexposition	18
1.3. Histamin als Mediator der ozoninduzierten Lungensymptomatik	19
1.4. Das Kulturmodell der Nasenschleimhaut	20
1.5. Zielsetzung der Arbeit	21
2. MATERIAL UND METHODEN	22
2.1. Beschreibung des Kollektivs	22
2.2. Materialgewinnung und Aufarbeitung	22
2.2.1. Organkultur und Ozonexposition	23
2.2.2. Aufbereitung der Proben zur enzymatischen Analyse	24
2.3. Bestimmung des Proteingehaltes	26
2.4. Bestimmung der enzymatischen Aktivitäten im Zelllysate	28
2.4.1. Katalase	28
2.4.2. Glutathion-Peroxidase	30
2.4.3. Glutathion-Reduktase	32

2.4.4.	Superoxid-Dismutase.....	34
2.4.5.	Glutathion-S-Transferase.....	36
2.5.	Bestimmung des Histamingehaltes aus dem Kulturüberstand.....	38
2.6.	Klassifizierung des GSTM1-Polymorphismus	40
2.6.1.	Aufreinigung der DNS aus Nasenschleimhautgewebe	40
2.6.2.	Bestimmung des GSTM1-Genes	41
2.7.	Statistik.....	45
3.	ERGEBNISSE	46
3.1.	Veränderungen bei der Histaminfreisetzung durch 24 Stunden 120 ppb Ozonexposition	46
3.2.	Veränderungen der Aktivität antioxidativer Enzyme durch 24 Stunden 120 ppb Ozonexposition....	48
3.2.1.	Katalase	48
3.2.2.	Glutathion-Peroxidase	51
3.2.3.	Glutathion-Reduktase	51
3.2.4.	Superoxid-Dismutase.....	54
3.2.5.	Glutathion-S-Transferase.....	54
3.3.	Vergleich der Enzymregulation mit individuellen Faktoren	56
3.3.1.	Geschlecht der Patienten.....	56
3.3.2.	Raucher und Nichtraucher	57
3.3.3.	Alter der Patienten	58
3.4.	Der Polymorphismus der GSTM1	59
3.4.1.	Regulation antioxidativer Enzyme bei GSTM1-Defizienz	60
3.4.2.	Die Regulation der SOD bei GSTM1-Defizienz	61
4.	DISKUSSION	64
4.1.	Höhe der enzymatischen Gesamtaktivitäten.....	64
4.1.1.	Katalase	64
4.1.2.	Glutathion-Peroxidase	65
4.1.3.	Glutathion-Reduktase	67
4.1.4.	Superoxid-Dismutase.....	68

4.1.5.	Glutathion-S-Transferase.....	69
4.2.	Veränderungen antioxidativer Enzymaktivitäten durch 24-stündige Ozonexposition (120 ppb).....	70
4.2.1.	Katalase	71
4.2.2.	Glutathion-Peroxidase	72
4.2.3.	Glutathion-Reduktase	73
4.2.4.	Superoxid-Dismutase.....	74
4.2.5.	Glutathion-S-Transferase.....	75
4.2.6.	Geschlechterspezifische Unterschiede.....	76
4.2.7.	Unterschiede zwischen Rauchern und Nichtrauchern	77
4.2.8.	Altersabhängige Unterschiede	77
4.3.	Hochregulation der Superoxid-Dismutase bei GSTM1 - Defizienz.....	78
4.3.1.	SOD-Hochregulation durch Substratakkumulation bei GSTM1-Defizienz.....	79
4.3.2.	Beeinflussung der SOD-Aktivität über die Modulation der physiologischen Signaltransduktion.....	79
4.3.3.	Hochregulation der SOD durch unabhängige Faktoren.....	81
4.4.	Nicht enzymatische Wege der antioxidativen Abwehr.....	82
5.	LITERATURVERZEICHNIS	84

1. Einleitung

1.1. Oxidativer Stress

1.1.1. Ozon (O_3) als Bestandteil des saisonalen photochemischen Smogs

Ozon ist ein Molekül, das vor allem in den Sommermonaten im bodennahen photochemischen Smog entsteht und durch Jahr für Jahr zunehmende Konzentrationen ins Licht der Öffentlichkeit geraten ist.

Das sehr reaktive Ozonmolekül entsteht in zwei Schichten der Atmosphäre. In der Stratosphäre schützt es die Erde vergleichbar mit einem Filter, der einen Teil der UV-Strahlung durch photochemische Reaktion absorbiert.

In der erdnahen Troposphäre entsteht Ozon unter UV-Strahlung durch Reaktion mit Stickstoffmonoxid (NO), Stickstoffdioxid (NO_2) und höheren Stickoxiden (NO_x), welche bei Verbrennungsprozessen (v.a. Kraftfahrzeugabgase) entstehen. Hierbei wird aus NO_2 ein Sauerstoffradikal frei, welches mit dem Luftsauerstoff zu O_3 reagiert. Nach Wegfall der Sonneneinstrahlung wird das Ozon durch Rückreaktion mit Stickoxiden abgebaut, was zum allabendlichen Abfall der Ozonwerte in städtischen Gebieten führt. In ländlichen Gegenden, wo eine Erhöhung der Ozonkonzentration vor allem durch Verwehung des sogenannten Smogs aus der Stadt gegeben ist, fehlt der nächtliche Abbau, da die Belastung durch Stickoxide wesentlich geringer ist. Dieser Umstand kann zum Fortbestehen der erhöhten Ozonkonzentration auch während der Nacht führen [1].

Das Ozongesetz der BRD schreibt einen Grenzwert von 120 ppb Ozon vor, von der WHO werden sogar 60 ppb vorgeschlagen. Spitzenkonzentrationen liegen in Deutschland über 150 ppb, in Mexico City sind Ozonwerte von bis zu 400 ppb gemessen worden. In den folgenden Ausführungen werden Ozonkonzentrationen von 120 ppb und weniger als ambientale, also in den Sommermonaten häufig erreichte Ozonwerte bezeichnet.

1.1.2. Physiologische Auswirkungen der Ozonbelastung

Die ubiquitäre Dauerbelastung durch Ozon während der Sommermonate hat erwiesenermaßen gesundheitliche Auswirkungen auf die Lungenfunktion des Menschen. In zahlreichen klinischen und epidemiologischen Studien wurde ein Zusammenhang zwischen verschlechterten Lungenfunktionsparametern (Funktionelle Vitalkapazität (FVC), Forciertes Expiratorisches Volumen pro Sekunde (FEV_1), Peak Flow Rate (PEFR), Provokation mit Metacholin (PD_{100})) und ambientaler Ozonbelastung hergestellt [beispielsweise 2, 3]. Die Änderungen der Lungenfunktion sind abhängig von der Ozonkonzentration, der Expositionsdauer, dem Ausmaß der körperlichen Betätigung und der Lungenventilation [4-6]. Man geht davon aus, daß die sogenannte externe Dosis, definiert als Ozonkonzentration x Expositionsdauer x Ventilation pro Minute, mit einer Verminderung des FEV_1 einhergeht, wobei die Wertigkeit der verschiedenen Faktoren diskutiert wird [4, 7].

Ein Anteil von etwa 10-15% der Bevölkerung reagiert bezüglich der Lungenfunktion empfindlicher als der übrige Teil auf Ozon [8]. Eine sogenannte potentiell ozonsensitive Population wurde auch im Tierexperiment beobachtet [9]. Es wird evaluiert, ob diese Sensitivitätsunterschiede mit Geschlecht, Alter [10], Lebensgewohnheiten wie Zigarettenrauchen [11], genetischen Faktoren [12] oder Grundkrankheiten wie Asthma bronchiale [13] in Verbindung steht. Eine Diskrepanz besteht allerdings zwischen der Erhöhung von inflammatorischen Markern in der Lunge und der Reduktion von

Lungenfunktionsparametern bei der Einteilung in sensitive und nicht sensitive Populationen [14-16].

Morphologisch läßt sich nach Ozoneinfluß ein Influx von polymorphen mononuklearen Leukozyten (PMNs) feststellen. Die von neutrophilen und eosinophilen Granulozyten sowie Makrophagen begleitete Entzündungsreaktion [17, 18] kann zur Metaplasie von Mukuszellen führen, wie an nasalen Epithelien der Ratte beobachtet wurde [19]. Ödem, Zellnekrosen und erhöhte Proliferationstätigkeit wurden ebenso wie Permeabilitätsänderungen der Membranen beobachtet [16, 20, 21]. Die hier genannten Veränderung in Lunge und Atemwegsepithel nach Ozoneinfluß werden von der epithelialen Ausschüttung zahlreicher Mediatoren begleitet [22, 23, Übersicht in 24], die eine noch nicht vollständig geklärte Rolle in der Vermittlung der Entzündungsreaktion spielen.

1.1.3. Biochemische Grundlagen der Ozonwirkung am Epithel

Das Ozonmolekül ist ein hochreaktives Oxidationsmittel und verhält sich gegenüber biologischem Material äußerst reagibel. Hauptreaktionsort bleibt das Atemwegsepithel und seine schützenden Schichten (epithelial lining fluid). Es wird angenommen, daß nur ein geringer Teil des Ozon bis in die epithelialen Zellen vordringt [25]. Beim Kontakt mit den Epithelzellen oxidiert O_3 ungesättigte Fettsäuren der membranständigen Lipide [26] und es entstehen langkettige Aldehyde und Hydroxyhydroperoxide [27], auch als Ozonolyseprodukte oder Ozonoide bezeichnet. Diese Oxidationsprodukte sind stabiler als das Ozon selbst, können von der Membran in das Zytosol der Zelle diffundieren und dort weiterreagieren, was ozoninduzierte Veränderungen innerhalb der Epithelzelle, aber auch an epithelfernen Geweben erklären könnte [24].

Die Modulation der Phospholipase A2 durch Ozonolyseprodukte [28] wird beispielsweise für die Aktivierung des Eikosanoidmetabolismus nach Ozoneinfluß verantwortlich gemacht [22, 29]. Die hierbei freigesetzten Entzündungsmediatoren

(Leukotriene, Prostglandine, etc.) sind für die Vermittlung einer Entzündungsreaktion mit Neutrophileninflux und ihre bronchokonstriktorische Wirkung [30] hinreichend bekannt. Darüber hinaus spielen die Eikosanoide eine Rolle bei der Entstehung von chronischen Atemwegserkrankungen und Asthma bronchiale [Übersicht in 31], was nahelegt, daß die Aktivierung dieser Mediatorenkaskade unter chronischer Ozonbelastung längerfristig zur Schädigung des Respirationsorganes führen kann.

1.1.4. Zellulärer oxidativer Stress und seine physiologischen Abwehrmechanismen

Die Zelle des Säugetieres wird unter aeroben Bedingungen fortwährend durch oxidativ wirksame Agenzien belastet. In der Atmungskette werden zum Beispiel physiologischerweise freie Radikale produziert, sie werden jedoch schon innerhalb der Mitochondrien durch die Cytochromoxidase metabolisiert und schädigen daher die Zelle nicht [32, 33]. Unter hyperoxischen Bedingungen jedoch können radikale Zwischenprodukte der Atmungskette kumulieren, so daß der Abbau durch die Cytochromoxidase überlastet wird und oxidativer Streß entsteht. Es sollte ein Gleichgewicht von Redoxprozessen bestehen, das zum einen von der Menge der oxidativen Substanzen und zum anderen von den Ressourcen des antioxidativen Systems abhängt [34, 35]. Dieses Gleichgewicht kann von endogenen wie auch exogenen Einflüssen gestört werden und über einen Exzeß an Oxidanzien zu oxidativem Streß und zur Schädigung der Zelle führen.

Das Atemwegsepithel ist aufgrund des direkten Kontaktes mit der Außenluft besonders durch exogene Noxen gefährdet. Die wichtigsten exogenen Einflüsse, die zu oxidativem Streß in den Atemwegen führen können, sind die Inhalation von xenobiotischen Substanzen, Tabakrauch, anorganischen Partikeln und organischen Gasen, wie Stickoxide oder Ozon. Wird der Organismus ihnen ausgesetzt, entstehen unter anderem Epoxide, Aldehyde und Peroxide, welche weiterreagieren zu

Sauerstoffradikalen ($O_2\cdot^-$) und Wasserstoffperoxiden (H_2O_2). Diese können bei Anwesenheit von freien Metallionen in der Art einer Haber-Weiss-Reaktion Hydroxylradikale ($\cdot OH$) produzieren. Vor allem die Hydroxylradikale, aber auch $O_2\cdot^-$ und H_2O_2 sind in der Lage der Zelle erheblichen Schaden zuzufügen [35, 36]. Sie bewirken eine neutrophile Entzündungsreaktion und eine Peroxidation von Lipiden [37], welche die Permeabilität der Zellmembran erhöhen kann. Sie binden an Sulfhydrylgruppen einiger Enzyme [38], was deren Funktion beeinträchtigen kann, und schädigen die Strukturen des Zytoskelettes [39].

Das extrazelluläre System der antioxidativen Abwehr ist im epithelial lining fluid (ELF) lokalisiert, wo beispielsweise Glutathion (GSH) 100fach höher als im Blutplasma konzentriert ist. Ascorbinsäure, Vitamin E, Ceruloplasmin, Transferritin, Ferritin und andere Serumproteine sind ebenfalls Bestandteil des ELF und tragen zur extrazellulären Abwehr von Oxidanzien bei. Die intrazelluläre antioxidative Abwehr besteht hauptsächlich aus den antioxidativen Enzymen (AOEs) des Glutathion-Redoxzyklus (Glutathion-Reduktase und Glutathion-Peroxidase), der Katalase, der Superoxid-Dismutase und der Glutathion-S-Transferase [Zusammenfassung bei 40].

1.2. Antioxidative Enzyme (AOEs)

1.2.1. Katalase (KAT)

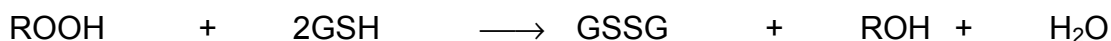
Die Katalase ist ein tetrameres Hämoprotein mit einer Umsatzrate von $10^7/(M\cdot s)$ bei Reaktionskinetik zweiter Ordnung. Das Enzym hat eine hohe Reaktionskapazität, jedoch geringe Affinität zum Substrat. Es katalysiert vornehmlich die Reduktion von Wasserstoffperoxid und Methyl- oder Ethylhydroperoxiden [41]. Der Grund hierfür ist das aktive Zentrum der Katalase, in dem sich eine Häm-Eisen-Struktur befindet, die

die Reaktion mit höhermolekularen Substraten nicht zuläßt [42]. Innerhalb der menschlichen Zelle ist die Katalase vornehmlich in den Peroxisomen zu finden [43]. Im menschlichen Organismus ist sie in den höchsten Konzentrationen in Hepatozyten und Erythrozyten vorhanden. Die niedrigsten Konzentrationen finden sich in Gehirnzellen, Myozyten, Pankreaszellen und Lungengewebe [44]. Verhältnismäßig große Mengen an Katalase wurden auch im ELF der Lunge gefunden. Es wird davon ausgegangen, daß sie von abgestorbenen Epithelzellen des Alveolarraumes stammt.

1.2.2. Glutathion-Redoxzyklus

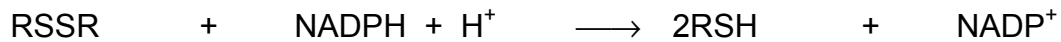
Die zentralen Enzyme dieses Zykluses zur Abwehr von intrazellulären Peroxiden sind Glutathion-Peroxidase (GPX) und Glutathion-Reduktase (GR).

Die GPX ist ein tetrameres Protein mit vier Selen-Atomen, gebunden als Selenocystein im aktiven Zentrum. Für seine katalytische Aktivität benötigt das Enzym reduziertes Glutathion (GSH) als Coenzym für die Reduktion von Peroxiden (ROOH).



Die Glutathion-Reduktase, ein dimeres Protein, sorgt dafür, daß das anfallende oxidierte Glutathion (GSSG) wieder reduziert wird und stellt sicher, daß ein hoher GSH / GSSG Quotient innerhalb der Zelle aufrecht erhalten wird. Dieser Quotient ist nicht nur für den Glutathion-Redoxzyklus wichtig. Verschiedene andere GSH-abhängige Reaktionen profitieren diesbezüglich ebenfalls von der Aktivität der GR [Zusammenfassung bei 45].

Für die Reduktion von GSSG und anderen Disulfiden (RSSR) benötigt die GR als Wasserstoffdonator Nikotinamid Adenin Dinukleotidphosphat in der reduzierten Form (NADPH).



Eine der NADPH - Quellen in der menschlichen Zelle ist der Pentosephosphatweg, wo unter Katalyse von Glukose-6-Phosphatase (G-6-PD) NADP zu NADPH reduziert wird und somit wiederum anderen reduzierenden Reaktionen zur Verfügung steht.

Der Glutathion-Redoxzyklus ist vom GSH / GSSG - Quotienten abhängig und wird somit von der Aktivität der GR limitiert, nur die GPX kann jedoch durch eine reduzierende Reaktion die Zelle von Peroxiden befreien.

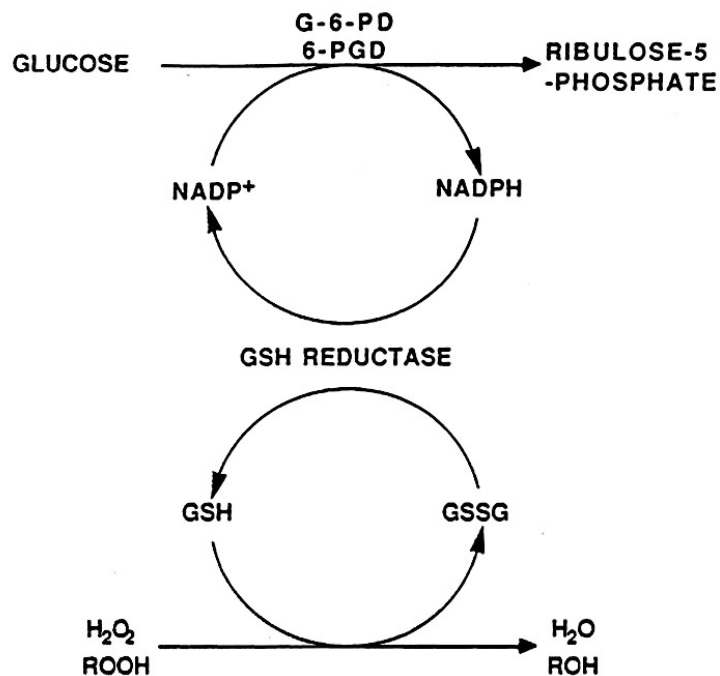


Abbildung 1: Die Grafik zeigt den Transport von Wasserstoff aus dem Pentosephosphatweg über die Glutathion-Reduktase zum Glutathion, welches in reduzierender Weise Wasserstoffperoxide und organische Peroxide entgiftet [40].

GPX und GR sind hauptsächlich im Zytosol lokalisiert; Aktivität beider Enzyme wurde jedoch auch in den Mitochondrien gefunden. Hohe GSH-Redox-Aktivität zeigen Erythrozyten und Leberzellen, in der Lunge wurde gegenüber anderen Zelllinien eine mittelhohe Aktivität festgestellt [46].

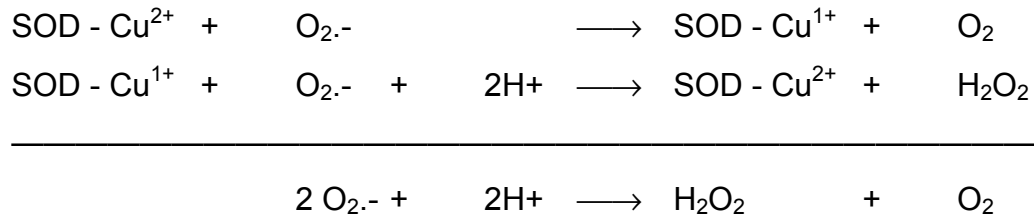
Hinsichtlich ihrer Substratspezifität überschneiden sich die Katalase und der Glutathion-Redoxzyklus. Es wird jedoch vermutet, daß die GPX von größerer Bedeutung für die antioxidative Abwehr in Säugetierzellen ist. Dies wurde auch an Endothelzellen in Kultur festgestellt [47]. Ein Grund dafür könnte sein, daß die Reduktion durch Katalase hauptsächlich in den Peroxisomen stattfindet, während die zytosolische GPX mehr Kontakt zu Oxidanzien erreichen kann. Des weiteren ist die GPX in der Lage höhermolekulare Peroxide zu reduzieren [48]. Höhermolekulare Peroxide entstehen beispielsweise bei der Peroxidation von Lipiden und gelten als Mediatoren zellulärer Schäden nach oxidativem Streß [24]. Experimentell unterstreichen mehrere Studien die Bedeutung des Glutathionzyklus bei extrazellulär zugeführten oxidativen Noxen an endothelialen Zellen [47, 49].

1.2.3. Die Superoxid-Dismutase (SOD)

Die SOD ist ein sehr effizientes Enzym mit einer Umsatzrate von 2×10^9 / (M·s) und katalysiert die Reduktion von Sauerstoffradikalen (O_2^-), welche dadurch 10^4 mal schneller von statten geht als der spontane Zerfall des Sauerstoffradikales [50]. Man kategorisiert drei Untergruppen der humanen SOD, welche sich hinsichtlich ihrer metallischen Verbindung und ihrer Lokalisation innerhalb des Organismus voneinander unterscheiden.

Die CuZn-Superoxid-Dismutase befindet sich vor allem im Zytosol der Zelle, wurde aber auch im Zellkern gefunden [51]. Hohe Konzentrationen sind in Leber, Gehirn, Hoden und geringere in Erythrozyten, Pankreas und Lunge vorhanden [44]. Das Coenzym der CuZn-SOD ist Kuprozink, wobei Kupfer für die Enzymaktivität und Zink für die

Proteinstruktur essentiell ist [52]. Das Cu^{2+} -Ion wird während des katalytischen Prozesses reduziert und reoxidiert.



Die Mn-Superoxid-Dismutase ist hauptsächlich in den Mitochondrien der Zelle lokalisiert und katalysiert die Reduktion von Sauerstoffradikalen, die während des Elektronentransportes der Atmungskette entstehen [53].

Die Cu-Superoxid-Dismutase wiederum befindet sich in den höchsten Konzentrationen im Blutplasma des Menschen [54] und ist daher in der vorliegenden Studie nicht von Bedeutung.

Das Enzym SOD bildet mit der Katalase und dem Glutathion-Redoxzyklus ein Enzymsystem, das die Zelle vor den Folgereaktionen durch oxidative Sauerstoffradikale und H_2O_2 bewahrt. Die einzelnen Komponenten dieses Enzymsystems sind von der Kapazität der anderen Enzyme abhängig. Sauerstoffradikale können die Funktion der Katalase und der Glutathion-Peroxidase hemmen, wenn die Detoxifikation durch SOD unzureichend ist [55, 56]. Ebenso können Wasserstoffperoxide die von der SOD katalysierte Reduktion des Sauerstoffradikales hemmen, sobald der Abbau durch Katalase vermindert ist und die H_2O_2 -Konzentration intrazellulär steigt. Bei geringer Katalasekonzentration kann die SOD durch Produktion von H_2O_2 sogar zu Gewebeschäden beitragen. Neben dem Katalasemangel kann zusätzlich eine erhöhte Fe^{3+} -Konzentration dazu führen, daß Sauerstoffradikale in der Haber-Weiss-Reaktion verstärkt Fe^{3+} zu Fe^{2+} reduzieren und weiteres zytotoxisches $\cdot\text{OH}$ entsteht [57].

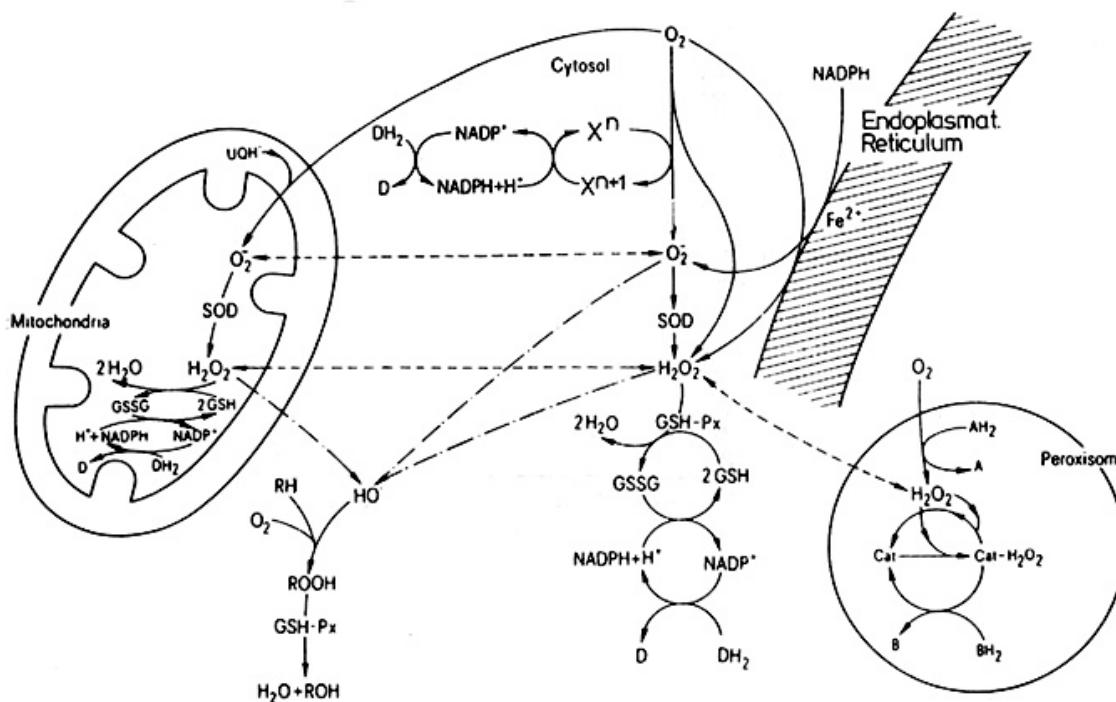


Abbildung 2: Die Grafik stellt einen Ausschnitt aus dem komplexen Zusammenspiel der antioxidativen Enzyme Katalase (Cat), Glutathion-Peroxidase (GSH-Px) und Superoxid-Dismutase (SOD) bei der intrazellulären Abwehr von oxidativem Stress dar [58].

1.2.4. Glutathion-S-Transferase (GST)

Es handelt sich bei den GST um eine Familie von multifunktionalen Enzymen, die bei der Detoxifikation bestimmter Noxen eine zentrale Rolle übernehmen. Die Überexpression der GST in präneoplastischen Stadien und Tumorzellreihen und der Zusammenhang zwischen GST-Expression und individueller Resistenz gegenüber zytotoxischen Substanzen wie auch diverser Drogen machen sie unter anderem für die onkologische Forschung interessant [Zusammenfassung bei 59].

In den letzten Jahren wurde eine Vielzahl von Subtypen der GST identifiziert und deren Klassifizierung mehrmals geändert. Durchgesetzt hat sich die Einteilung in drei

unterschiedliche Klassen (α , μ und π), denen wiederum verschiedene Subtypen angehören. Diese Einteilung nach Mannervik [60] richtet sich nach den Kriterien der Substratspezifität, der Inhibition katalytischer Aktivität, der immunologischen Erkennung durch Antikörper und Übereinstimmungen in der primären Proteinstruktur verschiedener Subtypen. Über diese Klassifizierung hinaus sind diverse andere GST-Subtypen in verschiedenen Geweben identifiziert worden.

Die GSTs sind Bestandteil der Biotransformation und katalysieren die Entgiftung von elektrophilen, xenobiotischen Stoffen, indem sie diese mit dem nukleophilen Glutathion konjugieren. Durch diese Reaktion wird das GSH-Konjugat auf den Transport aus der Zelle heraus vorbereitet [61, 62]. Zu der großen Anzahl an Substraten der GSTs zählen volatile Karzinogene, Epoxide, wie sie im Tabakrauch vorhanden sind [63], aber auch Aldehyde und Produkte der Ozonierung von Fettsäuren [64]. Diese sind als Mediatoren der toxischen Ozonwirkung bekannt.

Neben ihrer enzymatischen Aktivität agiert die GST als intrazelluläres Transportprotein für diverse hydrophobe Moleküle, wie Billirubin, Häm, Steroidhormone und einige Drogen [65, 66]. Des Weiteren ist die Funktion der GST, vor allem der α -Klasse, als sogenannte selen-unabhängige Glutathion-Peroxidase bei der Reduktion von Lipidhydroperoxiden entdeckt worden [67].

Hinsichtlich der Konzentration, der Aktivität der GST und der quantitativen Verteilung der Subtypen innerhalb des menschlichen Körpers, aber auch innerhalb eines Gewebes bestehen erhebliche Unterschiede [Zusammenfassung bei 68]. Diese weitreichende Variabilität könnte mit geschlechtsspezifischen Unterschieden und dem Entwicklungsstadium eines Organismus [69], der subjektiv unterschiedlichen Exposition auf verschiedene Noxen und den genetischen Unterschieden in der individuellen Expression einer GST-Klasse erklärt werden. Ein gut untersuchtes Beispiel für diese genetischen Faktoren ist der Polymorphismus der μ -GST, auf den im folgenden Abschnitt eingegangen wird [70].

Die Nasenschleimhaut ist fortwährend Prokarzinogenen, Promutagenen und oxidativen Noxen ausgesetzt. Gerade in Hinblick auf äußerst reaktive Agenzien, wie das Ozonmolekül, könnte sie eine wichtige Stellung bei der Detoxifikation übernehmen. Die GSTs wurden bereits in der menschlichen nasalen Mukosa gefunden. An Schleimhautproben von jeweils 5 Frauen und Männern wurde eine gegenüber anderen Geweben mittelhohe GST-Aktivität von 76.7 nmol/min/mg Protein festgestellt. [71, 72].

1.2.5. Polymorphismus der Glutathion-S-Transferase M1 (GSTM1)

Auf dem Chromosom 1 des Menschen befindet sich ein Cluster von 5 μ -GST-Genen in der Region 1p13.3 [73]. Sie werden als GSTM1-M5 bezeichnet. Die GSTM1 ist polymorph im menschlichen Erbmateriale. Beschrieben wurden die Allele GSTM1*A und GSTM1*B, die sich nur hinsichtlich eines K172N Aminosäureaustausches unterscheiden und ansonsten funktionell identisch zu sein scheinen [74]. Die GSTM1*0 ist das Resultat der Deletion des GSTM1-Gens [75]. Man nimmt an, daß ein ungleiches „crossing over“ 5 kB strangabwärts vom GSTM1 Genlocus stattfindet [76] und hierdurch eine Sequenz von 18 kB einschließlich des gesamten GSTM1-Gens verlorenggeht. Die Frequenz der GSTM1-Deletion bewegt sich verschiedenen Studien nach in der europäischen Bevölkerung um etwa 50% [Zusammenfassung bei 77]. Ein Charakteristikum der GSTM1 ist ihre Substratspezifität für Epoxide [78], welche als Karzinogene bekannt sind. Die Bedeutung GSTM1-Defizienz als Risikofaktor bei der Entstehung von Lungenkarzinomen wurde kontrovers diskutiert. Studien neueren Datums unterstützen die Hypothese, daß der GSTM1*0-Genotyp zusammen mit anderen Faktoren, wie Zigarettenrauchen, das Risiko für eine Karzinogenese erhöht [79, 80].

1.2.6. Die Bedeutung der antioxidativen Enzyme als Abwehrmechanismus bei Ozonexposition

Es wird angenommen, daß sowohl der Glutathion-Redoxzyklus, Katalase und SOD als auch die GST-Enzyme von tragender Bedeutung für die Abwehr oxidativen Stresses in menschlichen Zellen sind. Die Funktion der antioxidativen Enzyme bei der epithelialen Antwort auf Ozon als toxischen Reiz scheint jedoch komplex und nur unvollständig geklärt.

Weitgehend unbestritten ist, daß die Ozonwirkung und somit auch deren Abwehr abhängig von der Expositionsdauer und der Konzentration des Moleküls ist [4, 7]. Bei kurzzeitiger Ozonexposition (3-7 Tage) und Konzentrationen von 100-800 ppb konnte in verschiedenen Tiermodellstudien eine Erhöhung der Enzymaktivität der SOD, der GPX, der GR und der Katalase festgestellt werden [81-86]. Vermehrte mRNS-Expression der CuZn-SOD, Katalase und GPX wurde nach 3 Tagen und 700 ppb Ozon beobachtet [87].

Bei längerer Expositionsdauer und geringeren Ozonkonzentrationen ist die Bedeutung der AOEs umstritten. In einer Studie von Plopper [88] wurde nach Langzeitexposition bronchialer Schleimhaut von Ratten über 90 Tage, bzw. 2 Monate eine erhöhte Aktivität der GPX, der SOD und der GST schon bei ambientaler Ozonkonzentration gefunden. Die Autoren dieser und einer vorherigen Studie [89] stellten fest, daß der toxische Effekt auf die Schleimhaut der Atemwege nicht nur zwischen verschiedenen Spezies sondern auch innerhalb einer Spezies und sogar entlang verschiedener Atemwegssegmente eines Individuums stark variiert. Gravierende Unterschiede bestehen hinsichtlich der antioxidativen Kapazitäten in verschiedenen Regionen der Lunge für die GST und GPX, nicht aber für SOD und Katalase [89]. Ein Zusammenhang zwischen der enzymatischen Ausstattung und dem Ausmaß des Zellschadens wurde allerdings bis heute nicht gefunden. Die Regulation der AOEs nach Ozoneinwirkung ist abhängig vom individuellen Aktivitätsmuster der Region, der fokalen Ozonkonzentration und der Dauer der Exposition [88]. Aufgrund der Variabilität der enzymatischen Regulation entlang des

Atemtraktes, können Untersuchungen des Lungenhomogenats keine Aussage über fokale Veränderungen der einzelnen Regionen des respiratorischen Organs machen. Die Gewebestanz in Kultur bietet in dieser Hinsicht den Vorteil der differenzierteren Untersuchung einer Region des Atemtraktes.

1.3. Histamin als Mediator der ozoninduzierten Lungensymptomatik

Histamin, bekannt als Mediator, der von Mastzellen ausgeschüttet wird, ist in die Vermittlung der ozoninduzierten Bronchokonstriktion involviert. Diese Beobachtung basiert auf einem Experiment von Gertner und Mitarbeitern [90], bei dem sich Veränderungen des peripheren Lungenwiderstandes nach kurzzeitiger Ozonexposition von 100 ppb durch selektive Hemmung des Histamin H1-Rezeptors signifikant reduzieren ließen. Bei Hunden wurde in vivo nach wiederholter 5-minütiger Ozonexposition (100 ppb) in der bronchoalveolären Lavage 1 Minute nach Exposition eine signifikante Erhöhung der Histaminkonzentration festgestellt, die durch Histamin H1-Rezeptor Blockade mit Chlorpheniraminmaleat (5 mg/kg Körpergewicht) um 30% reduzierbar war [91].

Eine erhöhte Histaminausschüttung in der Lunge direkt nach kurzzeitiger Ozonexposition wurde mehrfach festgestellt [92, 93] und konnte in vitro am Kulturmodell der menschlichen Nasenschleimhaut von Schierhorn und Mitarbeitern [23] bei Ozonkonzentrationen im ambientalen Bereich (60 - 200 ppb) nachvollzogen werden. Diese Beobachtungen sind Grund genug anzunehmen, daß Histamin ein effektiver Mediator der reduzierten Lungenfunktion unter Ozoneinfluß ist und somit als Indikator einer Lungenschädigung nach Ozon dienen kann.

1.4. Das Kulturmodell der Nasenschleimhaut

Hauptreaktionsort des Ozonmoleküls ist der Atemtrakt, wobei aufgrund seiner hohen Reagibilität schon ein großer Teil der Radikale im Nasopharynx mit dem ELF und dem Epithel reagiert [94, 95]. Die morphologischen Veränderungen, Entzündungsreaktion mit Influx von PMNs, Mukuszellmetaplasie und leichte Basalzellhyperplasie lassen sich am nasalen Epithel der Ratte bei kurzzeitiger und längerfristiger Ozonexposition nachweisen [19]. Die Enzymaktivitäten der GST, der GPX und der GR wurden in der nasalen Schleimhaut von Ratten nach 3 Tagen intermittierender Ozonexposition von 400 ppb nicht erhöht gefunden [96]. Andere AOE's wurden bisher nicht gemessen. Studien, die das Verhalten der AOE's im nasalen Epithel des Menschen nach Ozoneinfluss beobachten, liegen derzeit nicht vor. Aufgrund der Variabilität der enzymatischen Regulation entlang des Atemtraktes und der lokal differierenden ozontoxischen Effekte auf das Epithel [88, 89] können Untersuchungen des Lungenhomogenats keine Aussage über spezifische Veränderungen der einzelnen Regionen des respiratorischen Organs machen. Die Ergebnisse aus Tierexperimenten können aufgrund der speziesspezifischen Unterschiede in Ausstattung und Regulation der AOE's nicht ohne weiteres auf den Menschen übertragen werden [89, 97]. Ob die AOE's in der humanen Nasenschleimhaut, als Ort der ersten Ozonabwehr, bei im Sommer üblichen Ozondosen eine Rolle spielen, bleibt nach Durchsicht der Literatur unklar und soll Gegenstand dieser Arbeit sein.

Am Menschen ist man bei der Betrachtung ozoninduzierter Folgereaktionen in vivo auf die bronchiale oder nasale Spülung angewiesen, da eine Gewebeentnahme nach Ozonexposition nicht durchführbar wäre. Die Entwicklung von Kulturmodellen menschlicher Schleimhaut, welche die in situ Reaktionen simulieren können, ist daher von großer Bedeutung für die Erforschung der ozoninduzierten Pathologie. Das einzige Kulturmodell, an dem bis dato die Regulation der AOE's nach in vitro Ozonexposition untersucht wurde, ist das Modell der menschlichen alveolären Typ II Zellen, kultiviert

nach Alink und Mitarbeitern [98]. In dieser Studie wurde eine Hochregulation der SOD nach Ozoneinfluß festgestellt.

Schierhorn und Mitarbeiter entwickelten ein Kulturmodell der menschlichen Nasenschleimhaut [99], an dem die Steigerung des Eikosanoidmetabolismus und einiger Mediatoren, inklusive Histamin, nach Ozonexposition von ambientaler Dosis (60 bis 200 ppb) beobachtet wurde [22, 23]. Mit Hilfe dieses Modelles könnte die Möglichkeit bestehen, etwaige Aktivitätsänderungen der Antioxidanzien in vitro festzustellen.

1.5. Zielsetzung der Arbeit

Am in vitro Modell der nasalen Mukosa des Menschen sollte in der hier präsentierten Studie die Regulation der antioxidativen Enzyme auf kurzzeitige Exposition (24 Stunden) von ambientaler Ozondosis (120 ppb) untersucht werden. Hierzu wurde die Aktivität der antioxidativen Enzyme Katalase, Glutathion-Peroxidase, Glutathion-Reduktase, Superoxid-Dismutase und Glutathion-S-Transferase im Homogenat der nasalen Mukosa vor und nach Ozonexposition bestimmt. Histamin, einer der Mediatoren der ozonvermittelten Entzündungsreaktion, diente als Indikator für das Vorhandensein einer Wirkung der verwendeten Ozondosis auf die Zellen der Organkultur. Des weiteren wurden die Änderungen der Enzymaktivität nach individuellen Einflußgrößen (Zigarettenrauchen, Alter und Geschlecht) wie auch nach der genetischen Defizienz an Glutathion-S-Transferase M1 gruppiert, um nach Ansatzpunkten zur Erklärung der interindividuellen Unterschiede bei der enzymatischen Antwort des Menschen auf Ozonbelastung zu suchen.

2. Material und Methoden

2.1. Beschreibung des Kollektivs

Die verwendeten Nasenschleimhautstanzen stammten von 61 Patienten der HNO-Abteilung des Virchow-Klinikums, Berlin, und von 6 Patienten des ambulanten OP-Zentrums Dr. Thoma, Berlin. Von diesen 67 Patienten wurden jeweils 3 Stenzen, insgesamt also 201 Proben untersucht. Alle Patienten unterzogen sich einer Conchotomie der unteren Nasenmuschel wegen nasaler Atmungsbehinderung.

Das Patientenkollektiv bestand aus 44 Männern und 23 Frauen, wobei das Alter zum Zeitpunkt der Operation zwischen 21 und 77 Jahren, also im Mittel bei 44.7 Jahren lag. Die Conchotomien wurden zwischen September 1995 und Februar 1997 durchgeführt. Unter den Patienten befanden sich 25 Raucher und 37 Nichtraucher, von 5 Patienten fehlte diese Angabe.

2.2. Materialgewinnung und Aufarbeitung

Die Conchotomie zur Gewinnung der Schleimhautproben wurde in Allgemeinnarkose ohne Vorbehandlung mit Vasokonstriktoren durchgeführt. Die Schleimhaut der unteren Nasenmuschel, d.h. Gewebe welches operationsbedingt als „Abfallprodukt“ anfällt, wurde unmittelbar in ein steriles Transportmedium (Hepes-Puffer: pH 7,4; 137 mM NaCl, 4 mM KCl (Merck, Darmstadt), 11 mM Glucose (Braun, Melsungen), 10 mM Hepes, 100 µg/ml Gentamicin (Sigma, St. Louis, USA)) überführt, bei 4°C gelagert und innerhalb von 30 Minuten auf Eis ins Labor transportiert. Unter sterilen Bedingungen wurden daraufhin im Labor hämorrhagische und nekrotische Teile des Gewebes manuell entfernt. Anschließend wurden aus nicht entzündlich veränderten Bereichen

der Präparate mittels Biopsiestanze (\varnothing 4 mm; Stiefel, Offenbach a.M.) für die vorliegende Studie 3 Gewebestücken gewonnen. Diese wurden 3 mal in HEPES-Puffer gewaschen um Blut- und Schleimreste zu entfernen.

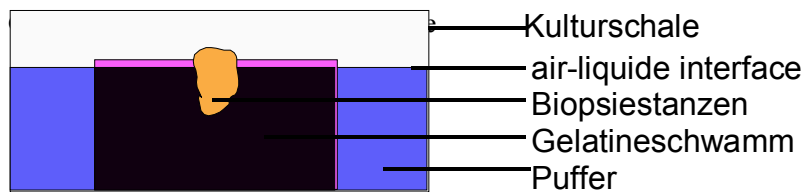


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Kultivierungsmethode anhand einer Kulturschale.

2.2.1. Organkultur und Ozonexposition

Die Gewebestücken aus intakter, vollständiger Nasenschleimhaut wurden einzeln mit dem Epithel nach oben in 1 x 1 x 0,7 cm große Stücke kollagenhaltiger Gelatineschwämme (Gelfoam, Upjohn, Kalamazoo, USA), die für mindestens 4 Stunden mit Kulturmedium prähydriert worden waren, implantiert und einzeln in Kulturschalen (Nunclon, Roskilde, Dänemark) platziert. Die Schleimhautoberflächen wurden jeweils unter einem Stereomikroskop (Zeiss, Oberkochen) beurteilt. Auf diese Weise wurde sicher gestellt, daß sich das Epithel oberhalb der flüssigen Phase befand. (air-liquide interface). (Abbildung 3)

Jede Kulturschale enthielt 4 ml HEPES-Puffer (137 mM NaCl, 4 mM KCl, 1 mM CaCl₂, (Merck), 11 mM Glucose, 10 mM HEPES, 1,1 mM MgCl₂ x 6 H₂O, 50 µg/ml Gentamicin (Sigma)).

Alle Gewebekulturen wurden für 1 Stunde bei 37 °C und 5% CO₂ vorinkubiert. Eine Vergleichsprobe je Patient wurde 24 Stunden in einem Inkubator (Heraeus,

Hanau) bei 37 °C und 5% CO₂ kultiviert. Parallel dazu wurde in einem anderen Begasungsbrutschrank (ebenfalls Heraeus), der an eine Ozondosierungsanlage (OZOCONTROL, Sorbios, Berlin) angeschlossen war, eine Versuchskultur des selben Patienten unter den gleichen Bedingungen kultiviert und zusätzlich einer Ozonkonzentration von 120 ppb (entsprechend 0,12 ppm oder 240 µg/m³) ausgesetzt. Um einen direkten Kontakt zwischen dem Gewebe und Ozon zu gewährleisten, wurden die Gewebekulturschalen unbedeckt gehalten.

Die flüssige Phase wurde nach 24 Stunden Inkubation abgenommen und bei -70°C eingefroren (GFL, Burgwedel), um später die Histaminausschüttung des Gewebes zu messen. Die Gewebestanden wurden bis zur weiteren Bearbeitung bei -80 °C (Herafreeze, Heraeus Instruments GmbH, Osterode) gelagert.

Der Kultivierung entsprechend wird die Vergleichsprobe als CO₂ und die ozonbegaste Probe als CO₂ + O₃ bezeichnet. Eine Gewebestanze jedes Patienten wurde ohne jegliche Behandlung direkt nach der Entnahme aus der Nasenmuschel bei -80 °C tiefgekühlt. Diese unbehandelte Probe trägt den Namen Kontrolle.

Für die Histaminbestimmung wurde ein Teil des Kulturmediums nach 1 Stunde Vorinkubation abgenommen und als Kontrolle tiefgefroren.

2.2.2. Aufbereitung der Proben zur enzymatischen Analyse

Die gefroren Nasenschleimhautstanzen wurden in 200 µl Puffer (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline without Calcium and Magnesium, steril, PAA Laboratories GmbH, Linz, Österreich) aufgeschlossen. In Pufferlösung wurden die Proben 3 Sekunden mit einem Ultraschallhomogenisator (20 kHz, 3 mm Schallkopf, Sonifier B-12 Cell Disruptor, Branson Sonic Power Company, Danbury, Connecticut, USA) behandelt, um die Mukosazellen zu lysieren. Anschließend wurden die Lösung bei -80 °C schockgefroren (Herafreeze) und während des Auftauens ein weiteres mal für 3 Sekunden dem Ultraschall ausgesetzt. Die Lysate wurden 15 Minuten bei 14000 Umdrehungen pro Minute (9860 g) zentrifugiert (Centrifuge 5402, Eppendorf, Hamburg). Der Überstand

des Zentrifugates wurde in Aliquote aufgeteilt, bei -80 °C (Herafreeze) eingefroren und zur Analyse des Antioxidanzienstatus aufbewahrt. Der jeweilige Bodensatz wurde ebenfalls bei -80 °C tiefgefroren und zur späteren Genotypisierung gelagert. Während der gesamten Aufbereitung wurde das Probenmaterial auf Trockeneis gehalten, um eine Denaturierung der Proteinstrukturen zu verhindern.

2.3. Bestimmung des Proteingehaltes

Prinzip: 1) Protein + Cu²⁺ $\xrightarrow{\text{OH}^-}$ tetradentate - Cu⁺¹ Komplex

2) Cu¹⁺ + 2 BCA $\xrightarrow{\hspace{2cm}}$ BCA - Cu⁺¹ Komplex

Abkürzungen: Cu¹⁺ = Kupfer-Ion, einwertig positiv geladen
 Cu²⁺ = Kupfer-Ion, zweiwertig positiv geladen
 BCA = bicinchoninic acid

Bedingungen: T = 37 °C, pH 11.25, λ = 535 nm

Methode: **Spektrophotometrische Meßung**

Reagenzien: BCA Protein Assay Kit (Pierce, Rockford, USA)
 enthält laut Hersteller:

BCA Reagenz A: sodium carbonate, sodium bicarbonate,
 bicinchoninic acid, sodium tartrate in 0.2 N sodium hydroxide

BCA Reagenz B: 4% cupric sulfate

Arbeitsreagenz: 50 Teile BCA Reagenz A
 1 Teil BCA Reagenz B

Albumin-Standard

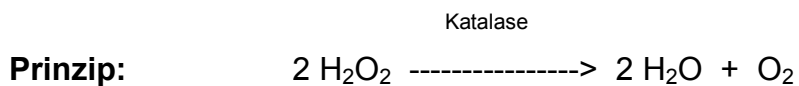
enthält bovines Serumalbumin (BSA) der Konzentration 2.0 mg/ml in einer Lösung von 0.9% saline und 0.005% sodium azide. Zur Erstellung einer Verdünnungsreihe im Meßbereich wurden mit Aqua bidest. Konzentrationen zwischen 2.0 und 0.025 mg BSA / ml angelegt.

Ablauf: Die Bestimmung nach Lowry [100] basiert auf der Reduktion von Cu^{2+} zu Cu^{1+} durch Proteine in basischem Milieu. Zur Bestimmung der Gesamtkonzentration an Protein wurden 10 μl der Probenlösungen auf eine Mikrotiterplatte (Greiner GmbH, Frickenhausen) pipetiert. Dazu wurden jeweils 200 μl der Arbeitsreagenz gegeben. Die Platte wurde abgedeckt und 30 Minuten im Brutschrank (Heraeus Instruments) bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Platte innerhalb von 5 Minuten auf Raumtemperatur gekühlt, und die Absorbtion des BCA- Cu^{+1} -Komplexes wurde bei $\lambda = 535 \text{ nm}$ auf einem Mikroplatten - Lesegerät (Thermomax, MWG-Biotech, Ebersberg) gemessen. Mit jeder Platte wurde ein Albumin-Standard der oben genannten BSA-Konzentrationen bestimmt. Die Proteinkonzentration steht in linearem Zusammenhang mit der Absorbtion des BCA- Cu^{+1} -Komplexes, so daß der Proteingehalt der Proben durch Vergleich mit dem Albumin-Standard bestimmt werden konnte.

Referenzen: [100], [101]

2.4. Bestimmung der enzymatischen Aktivitäten im Zelllysate

2.4.1. Katalase



Abkürzungen: H_2O_2 = Wasserstoffperoxid
 H_2O = Wasser
 O_2 = Sauerstoff

Bedingungen: T = 25 °C, pH 7.0, λ = 240 nm

Methode: Kontinuierliche spektrophotometrische Messung der Umsatzrate

Reagenzien: PBS-Phosphatpuffer, pH 7.4:
 PBS Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
 w/o Natriumbicarbonat
 (Life Technologies LTD, Paisley, Schottland)

0.036 % H_2O_2 (Sigma, Deishofen)

Die 3 %ige Lösung wurde mit PBS-Phosphatpuffer bis zu einer Absorption von 0.550 bis 0.520 bei $\lambda=240$ nm verdünnt.

Ablauf: Zur Bestimmung der spezifischen Katalaseaktivität wurden 10 µl der Probenlösung in einer Küvette mit 1 ml Wasserstoffperoxidlösung vermischt, um den enzymatisch katalysierten Zerfall des H₂O₂ bei λ = 240 nm im Spektrophotometer (UV-160, Shimadzu Scientific Instruments, Inc., Columbia, Maryland, USA) beobachten zu können. Dokumentiert wurde der Zeitraum, in dem die Absorption des Substrates Wasserstoffperoxid von 0.450 auf 0.400 gefallen ist. Die enzymatische Aktivität verhält sich dabei umgekehrt proportional zur benötigten Zeit. Der natürliche Zerfall des Wasserstoffperoxides ist in Anbetracht der Kürze der gemessenen Zeiträume zu vernachlässigen. Um die gleichbleibende Qualität der Messungen gewährleisten zu können, wurde in regelmäßigen Abständen eine Katalaselösung bekannter Konzentration bestimmt.

$$\text{Berechnung: } \quad \mathbf{U / mg Protein} = \frac{\mathbf{(3.45) \times (df)}}{\mathbf{(t) \times (V) \times (mg Protein / ml Enzym)}}$$

Abkürzungen: df = Verdünnungsfaktor
 t = Zeit, benötigt für den Substratverbrauch
 V = Volumen der Probenlösung (in ml)
 3.45 = reaktionsspezifischer Faktor

Referenzen: [102], [103]

2.4.2. Glutathion-Peroxidase



Abkürzungen: $\beta\text{-NADPH}$ = β -Nikotinamid Adenin Dinukleotidphosphat,
reduzierte Form
 $\beta\text{-NADP}$ = β -Nikotinamid Adenin Dinukleotidphosphat
oxidierte Form
GSSG = Glutathion, oxidierte Form
GSH = Glutathion, reduzierte Form

Bedingungen: $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$, $\text{pH } 7.01$, $\lambda = 340 \text{ nm}$

Methode: Kontinuierliche spektrophotometrische Messung der Umsatzrate

Reagenzien: PBS-Phosphatpuffer ($\text{pH } 7.4$) + 0.40 mM EDTA ($\text{pH } 7.0$, $25 \text{ }^\circ\text{C}$)
PBS Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
ohne Natriumbicarbonat
+ EDTA (Titriplex® III z.A., Merck, Darmstadt)

1.0 mM Natriumazidlösung (Merck)
hergestellt in PBS-Phosphatpuffer + EDTA

1.0 mg $\beta\text{-NADPH}$ (Tetra-Natriumsalz, Sigma, Deisenhofen)

100 U/ml Glutathion-Reduktase-Lösung
(Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz) hergestellt in Aqua bidest.

200 mM Glutathion-Lösung (Sigma) hergestellt in Aqua bidest.

0.042 % H₂O₂-Lösung (Sigma) hergestellt in Aqua bidest.

Arbeitsreagenz	1 mg	β-NADPH
	+ 9.2 Teile	Natriumazidlösung
	+ 0.1 Teile	Glutathion-Reduktase-Lösung
	+ 0.05 Teile	GSH-Lösung
	(eingestellt auf pH 7.0, 25 °C)	

Ablauf: Die Glutathion-Peroxidaseaktivität wurde über den Verbrauch einer konstanten Konzentration an reduziertem Glutathion bestimmt. In einer ersten, GPX-katalysierten Reaktion wurde Glutathion unter Anwesenheit von Wasserstoffperoxid oxidiert und in einer gekoppelten, zweiten Reaktion mit Hilfe GR reduziert, wobei der Verbrauch an β-NADPH in der zweiten Reaktion spektrophotometrisch meßbar war. Die Aktivität der Glutathion-Peroxidase verhält sich hierbei proportional zum Verbrauch an β-NADPH.

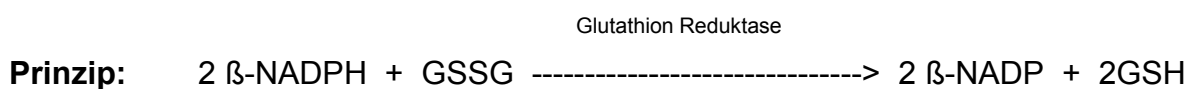
Jeweils 10 µl der Probenlösung wurden auf Mikrotiterplatten pipetiert und 200 µl der Arbeitsreagenz dazugegeben. Die Reaktion wurde durch Addition von 10 µl der H₂O₂ - Lösung gestartet. Der Verbrauch an β-NADPH wurde bei einer Wellenlänge von 340 nm über 40 Minuten protokolliert (Titerteck Multiscan® MCC/340, Labsystems, Finnland).

Berechnung:
$$U / \text{mg Protein} = \frac{\Delta E / \text{min (Probe-Leerwert)} \times (V_t) \times (2) \times (\text{df})}{(6.22) \times (V_p) \times (\text{mg Protein / ml Enzym})}$$

Abkürzungen: $\Delta E / \text{min}$ = Extinktionsänderung pro Minute bei $\lambda = 340 \text{ nm}$
 (2) = 2 μmol GSH produziert von 1 μmol β -NADPH
 V_t / V_p = gesamtes Volumen / Volumen der Probe
 (6.22) = millimolarer Extinktionskoeffizient β -NADPH bei $\lambda = 340 \text{ nm}$
 df = Verdünnungsfaktor

Referenzen: [104]

2.4.3. Glutathion-Reduktase



Abkürzungen: β -NADPH = β -Nikotinamid Adenin Dinukleotidphosphat, reduzierte Form
 β -NADP = β -Nikotinamid Adenin Dinukleotidphosphat, oxidierte Form
 GSSG = Glutathion, oxidierte Form
 GSH = Glutathion, reduzierte Form

Bedingungen: T = 25 °C, pH 7.6, $\lambda = 340 \text{ nm}$

Methode: Kontinuierliche spektrophotometrische Messung der Umsatzrate

Reagenzien: 20 mM GSSG (Sigma, Deisenhofen)
5 mM EDTA (Titriplex[®] III z.A., Merck, Darmstadt)
1 mM β -NADPH (Tetra-Natriumsalz, Sigma, Deisenhofen)

Alle Lösungen wurden in PBS-Phosphatpuffer (pH 7.4) hergestellt.

Arbeitsreagenz: 1.0 Teil GSSG
1.0 Teil EDTA
1.5 Teile β -NADPH
6.5 Teile PBS Phosphatpuffer

Ablauf: Die Aktivität der Glutathionreduktase konnte über die Reduktion einer konstanten Konzentration von oxidiertem Glutathion bestimmt werden. Das bei dieser GR-katalysierten Reaktion verbrauchte β -NADPH verhält sich nach obiger Reaktionsgleichung proportional zur Aktivität des Enzymes und wurde spektrophotometrisch bestimmt.
10 μ l der Probenlösung wurden mit jeweils 200 μ l der Arbeitsreagenz vermischt. Die Absorptionsänderung des Substrates β -NADPH wurde über 10 Minuten auf dem Gerät Titerteck Multiscan[®] MCC/340 (Labsystems, Finnland) bei einer Wellenlänge von $\lambda = 340$ nm festgehalten.

Berechnung:
$$U / \text{mg Protein} = \frac{\Delta E / \text{min (Probe-Leerwert)} \times (V_t) \times (df)}{(6.22) \times (V_P) \times (\text{mg Protein} / \text{ml Enzym})}$$

Abkürzungen: $\Delta E / \text{min}$ = Extinktionsänderung pro Minute bei $\lambda = 340 \text{ nm}$
 V_t / V_P = gesamtes Volumen / Volumen der Probe
 (6.22) = millimolarer Extinktionskoeffizient β -NADPH bei $\lambda = 340 \text{ nm}$
 df = Verdünnungsfaktor

Referenzen: [105],[106]

2.4.4. Superoxid-Dismutase

Prinzip: TTBF $\xrightarrow{\text{SOD}}$ Chromophore

Abkürzungen: TTBF = 5,6,6a,11b-tetrahydro3,9,10-trihydroxybenzofluorene

Bedingungen: $T = 37 \text{ }^\circ\text{C}$, $\text{pH } 8.8$, $\lambda = 525 \text{ nm}$

Methode: Kontinuierliche spektrophotometrische Messung der Umsatzrate

Reagenzien: **BIOXYTECH® SOD-525™**
 Spectrophotometric Assay for Superoxide Dismutase
 (OXIS International, Inc., Portland, OR, USA)
 Die Reagenzien enthalten laut Hersteller:

Pufferlösung

50 mM 2-amino-2-methyl-1,3-propanediol,
3.3 mM boric acid und 0.11 mM DTPA

Reagenz 1

0.66 mM TTBF in 32 mM HCl, 0.5 mM DTPA, 2.5% ethanol

Reagenz 2

33.3 mM TVT in 1 mM HCl

Ablauf: Die Bestimmung der Superoxid-Dismutaseaktivität zielt darauf ab, den maximalen durch SOD katalysierten Umsatz einer konstanten TTBF-Konzentration zu Chromophore zu bestimmen. Hierbei wird nicht zwischen Cu-Zn- und Mn-SOD unterschieden.

40 μ l der Probenlösung wurden mit 900 μ l Puffer sowie 30 μ l Reagenz 2 versetzt und nach Durchmischung 1 Minute im Wasserbad inkubiert, um die Mercaptane an TVT zu binden und zu verhindern, daß sie mit der Bestimmung der SOD-Aktivität interferieren können. Nach dieser Vorbehandlung wurden 30 μ l von Reagenz 1 dazugegeben und die Absorbtion des entstehenden Chromophore wurde bei $\lambda = 525$ nm in Intervallen von 10 Sekunden über 3 Minuten gemessen. Zur Berechnung der SOD-Enzymaktivität wurde aus der Absorbtion_($\lambda = 525$ nm) / Zeit – Kurve einer Probe der steilste Anstieg zwischen zwei Meßwerten gewählt und die Steigung zwischen den beiden Punkten ermittelt (v_s). Diese Meßung und Berechnung wurde ebenso mit Aqua bidest. als Leerwert durchgeführt (v_c). Der Quotienten der maximalen Chromophore-Extinktionsänderung (v_s / v_c) verhält sich bei diesem Verfahren proportional zur Aktivität der SOD.

$$0.93 \times (v_s / v_c - 1) \times (df)$$

Berechnung: U /mg Protein = $\frac{0.93 \times (v_s / v_c - 1) \times (df)}{1.073 - 0.073 \times (v_s/v_c) \times V \times (\text{mg Protein} / \text{ml Enzym})}$

Abkürzungen: HCl = Salzsäure

TVT=1,4,6-Trimethyl-2-vinylpyridinium trifluormethanesulfonate

DTPA = Diethylenetriaminepentaacetic acid

v_s / v_c = Quotienten der maximalen Chromophore-Extinktionsänderung

V = Volumen der Probenlösung

df = Verdünnungsfaktor

Referenzen: [107], [108], [109]

2.4.5. Glutathion-S-Transferase

Prinzip: DNCB + GSH $\xrightarrow{\text{Glutathion-S-Transferase}}$ DNP-GSH

Abkürzungen: DNCB = 1-Chloro-2,4-dinitrobenzene

DNP-GSH = S-2,4-Dinitrophenylglutathion

Bedingungen: T = 25 °C, pH 6.5 , λ = 340 nm

Methode: Kontinuierliche spektrophotometrische Messung der Umsatzrate

Reagenzien: 125 mM Phosphatpuffer, pH 6.5 (Merck, Darmstadt)

2 mM GSH – Lösung (Merck) hergestellt in Aqua bidest.

2 mM DNCB (Merck) aufgelöst in Aqua bidest.

Arbeitsreagenz:	1 Teil	Phosphatpuffer
	1 Teil	GSH – Lösung
	1 Teil	DNCB

Ablauf: Die Aktivitätsbestimmung der Glutathion-S-Transferase beruht auf der enzymatisch katalysierten Bindung von Glutathion an DNCB, welches als Reaktionsprodukt DNP-GSH photometrisch quantifizierbar ist. Die Entstehung von DNP-GSH verhält sich proportional zur Aktivität der Glutathion-S-Transferase.

Auf ein Probenvolumen von 10 µl wurden 200 µl Arbeitsreagenz gegeben. Nach kurzem Mischen wurde auf einer Mikrotiterplatte bei $\lambda = 340$ nm photometrisch über 10 Minuten die Extinktion des Reaktionsproduktes DNP-GSH gemessen (Titerteck Multiscan[®] MCC/340).

Berechnung:
$$U / \text{mg Protein} = \frac{\Delta E / \text{min (Probe-Leerwert)} \times (V_t) \times (df)}{(9.6) \times (V_p) \times (\text{mg Protein} / \text{ml Enzym})}$$

Abkürzungen: $\Delta E / \text{min}$ = Extinktionsänderung pro Minute bei $\lambda = 340$ nm
 V_t / V_p = gesamtes Volumen / Volumen der Probe
 (9.6) = millimolarer Extinktionskoeffizient DNP-GSH bei $\lambda = 340$ nm
 df = Verdünnungsfaktor

Referenzen: [110, 111]

2.5. Bestimmung des Histamingehaltes aus dem Kulturüberstand

Prinzip: Histamin + OPT -----> Histamin-OPT + H₂O

Abkürzungen: OPT = o-Phtalaldehyd
NaOH = Natriumhydroxid
H₂SO₄ = Schwefelsäure

Bedingungen: T = 25 °C , pH 13.0 , λ = 450-460 nm

Methode: photometrische Messung nach Fluoreszenzmethode

Reagenzien:

4%ige Perchlorsäure	(Merck)
1 und 2.5 N NaOH	(Merck)
0.2 und 0.6 N H ₂ SO ₄	(Merck)
n-Butanol, n-Heptan	(Merck)
OPT	(Merck)
10 ng/ml Histamin-Standardlösung	(Merck)

Ablauf: Zur Bestimmung des Histamingehaltes wurde im Gegensatz zu den Mukosalysaten bei der Enzymbestimmung die Pufferlösung benutzt, die während der Inkubation und Begasung die jeweilige Schleimhautstanze umgeben hatte. Das Prinzip der Bestimmung beruht auf der Bildung eines stabilen Kondensationsproduktes aus Histamin und OPT. Die Fluoreszenz der Histamin-OPT-Verbindung ist bei 450 nm photometrisch meßbar und verhält sich proportional zur Histaminkonzentration.

Die zu bestimmende Probe wurde zur Proteinfällung 1:1 mit Perchlorsäure versetzt und der Überstand 2 Minuten bei 12000 U/min zentrifugiert. Nach Alkalisierung mit 2.5 N NaOH wurde die Probe mittels n-Butanol extrahiert, um sie von interferierenden Substanzen zu reinigen. Die histaminhaltige organische Phase wurde durch Zugabe von 0.2 N H₂SO₄ angesäuert und mittels n-Heptan extrahiert. Nachfolgend wurde die histaminhaltige wässrige Phase abgenommen, durch 1 N NaOH alkalisiert und mit OPT versetzt. Die Bildung der Histamin-OPT-Verbindung fand bei pH 13 statt und wurde mit 0.6 N H₂SO₄ gestoppt. Die Fluoreszenzmessung erfolgte in einem Fluorometer (FluoroMonitor™ III, Modell 1311, Filter Fluorometric Detector, Fluorescence Detector, LDC Analytical, Thermo Instrument Systems Inc., Riviera Beach, Florida, USA) mit einer modifizierten Probenzuführung (Technicon® AutoAnalyser, bestehend aus Sampler IV, Isolation Transformer und Pump III Single Speed, Technicon Ltd. Swords, Co. Dublin / Bad Vibel). Die Anregungswellenlinie betrug 355 nm und die Fluoreszenz wurde bei 450 nm gemessen.

Durch Vergleich mit einer Histamin-Standardlösung wurde der Histamingehalt der Probe ermittelt. Die Eigenfluoreszenz des Kulturmediums wurde abgezogen.

Referenzen: [112] modifiziert nach [113].

2.6. Klassifizierung des GSTM1-Polymorphismus

2.6.1. Aufreinigung der DNS aus Nasenschleimhautgewebe

Der bei der Aufbereitung der Nasenschleimhautstanzen (2.1.2) entstandene Bodensatz einer jeden Probe wurde zur Bestimmung des GSTM1-Genotypes benutzt. Die Aufreinigung der Gewebe-DNS wurde nach dem „QIAamp Blood Kit and QIAamp Tissue Kit Handbook“ (QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland) durchgeführt.

Reagenzien: ATL-Puffer („tissue lysis buffer“), Proteinkinase A,
AL-Puffer, AW-Puffer (nicht näher bezeichnet),
AE-Puffer („elution buffer“) (QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland)
Ethanol (96-100%) (Sigma)

Ablauf: Das vorhandene Nasenschleimhautgewebe wurde mechanisch mit einem Skalpell zerkleinert und in 180 µl ATL-Puffer gegeben. Es wurden 20 µl Proteinase K addiert und nach gründlichem Durchmischen bei 55 °C inkubiert bis sich die Gewebestücke vollständig aufgelöst hatten. Im nächsten Schritt wurden 200 µl AL-Puffer zugegeben, für 10 Minuten bei 70 °C inkubiert und daraufhin mit 210 µl Ethanol aufgefüllt. Das entstandene Gemisch wurde in die QIAamp „spin“ Säule (QIAGEN GmbH) gegeben, welche in einem Sammelgefäß (QIAGEN GmbH) positioniert worden war. Der verschlossene Behälter wurde bei 6000 g für 1 Minute zentrifugiert (Centrifuge 5402, Eppendorf, Hamburg). Der abfiltrierte Puffer wurde verworfen und die Säule mit 500 µl AW-Puffer gefüllt. Es folgte eine weitere Zentrifugation bei 6000 g für 1 Minute. Das Filtrat wurde wiederum verworfen, die Säule mit 500 µl AW-Puffer gefüllt und bei maximaler

Umdrehung (9860 g) für 3 Minuten zentrifugiert. Abschließend wurde die QIAamp „spin“ Säule in ein neues Reaktionsgefäß plaziert und die DNS mit 2 x 200 µl AE-Puffer (70 °C) eluiert. Das Eluat wurde 1 Minute bei Raumtemperatur inkubiert und 1 Minute bei 6000 g zentrifugiert. Bis zur Bestimmung des GSTM1-Polymorphismus durch PCR-Analyse wurde der Überstand der Eluate bei –30°C eingeforen.

2.6.2. Bestimmung des GSTM1-Genes

Methode: Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Prinzip: Die Polymerase Kettenreaktion ermöglicht die enzymatische Amplifikation eines DNS-Bereiches, der von zwei bekannten Sequenzabschnitten eingeschlossen wird.

Zu Beginn werden die doppelsträngigen DNS-Moleküle durch Hitze zu zwei Einzelsträngen denaturiert. An die bekannten Sequenzabschnitte, welche sich an jeweils einem der beiden DNS-Stränge befinden, werden Oligonukleotidprimer hybridisiert. Von diesen Primern ausgehend werden die Einzelstränge wieder zu Doppelsträngen aufgefüllt, so daß zwei neue DNS-Moleküle entstehen, die an den Primersequenzen enden. Diese Reaktion wird von der DNS-Polymerase katalysiert. Die Substrate werden in Form von Desoxy-Nukleosid-Triphosphaten (dNTP) hinzugegeben. Bei mehrfacher Durchführung dieses Ablaufes steigt die Anzahl der gewünschten DNS-Abschnitte exponentiell (Abbildung 4). Nach einer geeigneten Anzahl von Zyklen läßt sich der gesuchte DNS-Abschnitt mittels Elektrophorese darstellen, sofern er in der Probe vorhanden ist.

Polymerase Kettenreaktion

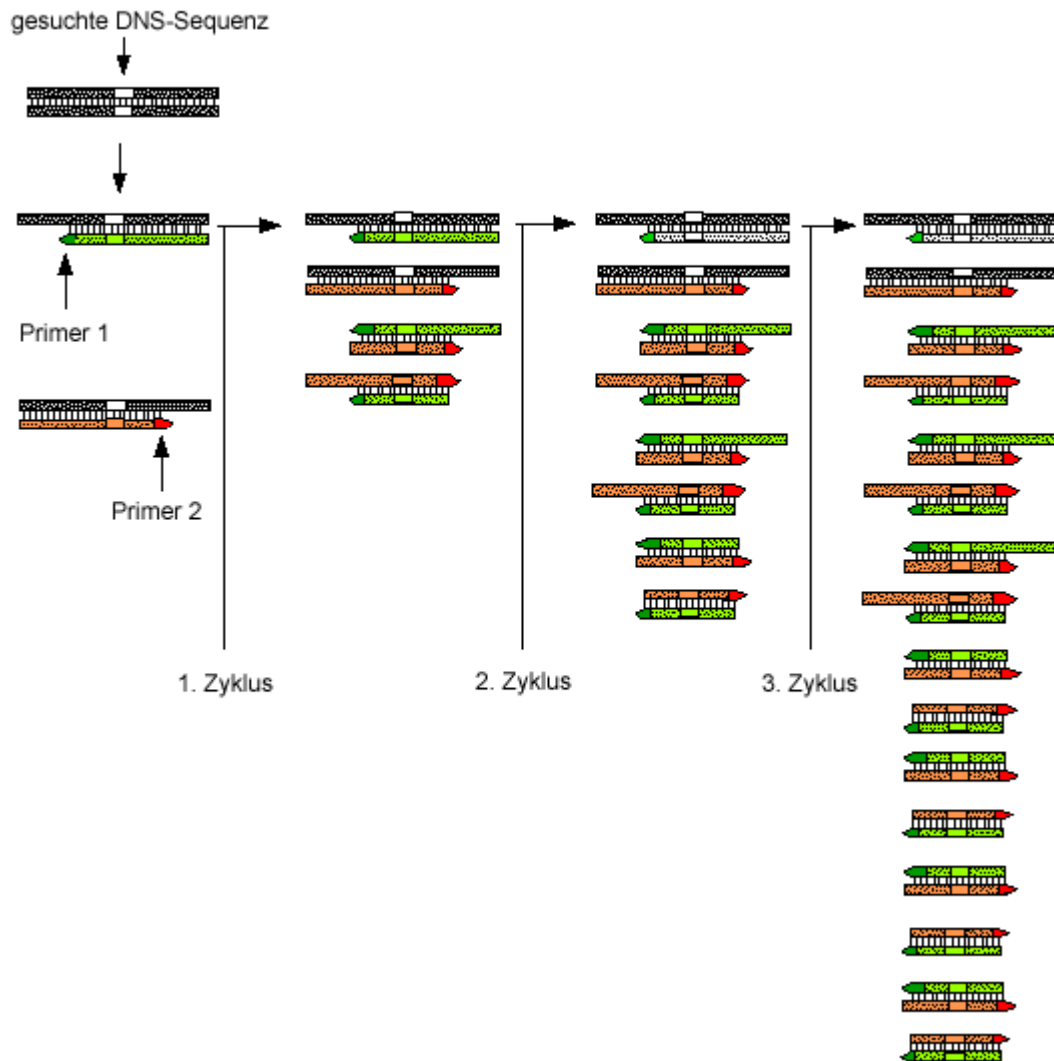


Abbildung 4: Die Abbildung zeigt die ersten drei Schritte der Amplifikation einer DNS-Sequenz, die mittels Primer erkannt wird. Mit steigender Anzahl von Zyklen wird der gesuchte Abschnitt exponentiell vermehrt

Arbeitsreagenz für die PCR-Amplifikation im Thermocycler:

50 µl	PCR-Puffer II	(10 mM Tris HCl, pH 8.3, 50 mM KCl)
+ 10 µl	200 µM	dATP
+ 10 µl	200 µM	dCTP
+ 10 µl	200 µM	dGTP
+ 10 µl	200 µM	dTTP
+ 5 µl	2.5 U / 100 µl	AmpliTaq [®] DNS-Polymerase
+ 30 µl	2,5 mM	MgCl ₂ -Lösung
		(Perkin Elmer, Roche Molecular Systems, Inc., Branchburg, New Jersey, USA)
+ 4 µl	10 µM	Primer 1 (5'-CTGGATTGTAGCAGATCATGC-3')
+ 4 µl	10 µM	Primer 2 (5'-CTCCTGATTATGACAGAAGCC-3')
+ 4 µl	1 µM	Primer 3 (5'-CAACTTCATCCACGTTCCACC-3')
+ 4 µl	1 µM	Primer 4 (5'-GAAGAGCCAAGGACAGGTAC-3')
		(MWG-Biotech AG Germany, Ebersberg)
+ 329 µl		Aqua bidest.
<hr/>		
470 µl		Arbeitsreagenz

Reagenzien für die Elektrophorese:

2%iges Agarosegel (Amresco, Ohio, USA) gelöst in 1 x TAE-Puffer

Ethidiumbromid (GIBCO BRL, Gaithersburg, USA)

Auftragspuffer (50% Glycerin, 0.2% SDS 0.05% Bromphenolblau,
0.05% Xylencyanol in 1 x TAE-Puffer)

DNS-Marker (low DNA mass ladder, GIBCO, USA)

Ablauf: Die 470 µl Arbeitsreagenz oben beschriebener Zusammensetzung enthielten die Primer 1 und 2 [114] zur Bestimmung eines 625 bp Fragmentes des humanen GSTM1-Genes sowie die Primer 3 und 4 für ein 268 bp Fragment des humanen β-Globin-Genes als Vergleichsbande in der Elektrophorese. Die PCR-Amplifikation wurde im Thermocycler von MWG Biotech (Ebersberg) durchgeführt.

Jeweils 3 µl der aufbereiteten Probe wurden mit 22 µl Arbeitsreagenz vermischt und im Thermocycler initial 5 Minuten bei 94°C denaturiert. Es schlossen sich 23 Zyklen der folgenden Sequenz an: Denaturierung bei 94°C für 48 Sekunden, Primeranlagerung bei 60 °C für 48 Sekunden und 1.5 Minuten Primerextension bei 72°C. Abgeschlossen wurde mit 5 Minuten Extension bei 72°C.

Die Elektrophorese wurde auf 2% Agarosegel, welches Ethidiumbromid enthielt, durchgeführt. Das PCR-Produkt wurde dazu mit 5 µl Auftragspuffer [115] versetzt. 20 µl dieses Gemisches wurden in die Geltaschen, des mit 1 x TAE gepufferten Ethidiumbromidgeles pipetiert. Die Proben liefen bei einer konstanten Spannung von 60 Volt. Die Banden wurden in einem Ultraviolet Transilluminator (UVP, Upland, CA, USA) sichtbar gemacht und die Ergebnisse fotografisch festgehalten. Um die Lage der Banden besser beurteilen zu können wurde jedem Gel ein DNS-Marker beigefügt.

Referenz: [114-116]

2.7. Statistik

Für die statistischen Berechnungen und die Grafiken des Ergebnisteiles wurde das Programm SPSS Version 7.5 2G genutzt.

Die Vergleiche zwischen Kontrolle und Vergleichsprobe (1 Stunde Vorinkubation + 24 Stunden CO₂ Exposition), bzw. zwischen Vergleichsprobe und ozonexponierter Probe (1 Stunde Vorinkubation + 24 Stunden CO₂ + O₃ Exposition) wurde der Wilcoxon-Test für zwei verbundene Stichproben verwendet.

Der Einfluß von Geschlecht und Zigarettenrauchen auf die prozentuale Aktivitätsänderung der Enzyme wurde mit Hilfe des Mann-Whitney-Testes für zwei unabhängige Stichproben untersucht.

Die Durchschnittswerte der enzymatischen Gesamtaktivitäten aller untersuchten Proben werden im Ergebnisteil als Median angegeben, um beim Vergleich der Enzymaktivitäten Extremwerte auszuschließen.

Sofern nicht anders bezeichnet wird in Tabelle 5 des Diskussionsteiles der Mittelwert \pm Standardabweichung (SD) für die Basisaktivitäten der Enzyme verwandt, da die Vergleichswerte in der gefundenen Literatur auf diese Weise ermittelt wurden.

3. Ergebnisse

3.1. Veränderungen bei der Histaminfreisetzung durch 24 Stunden 120 ppb Ozonexposition

Zur Bestimmung der aus dem Gewebe freigesetzten Histaminkonzentration wurde das Kulturmedium verwendet, in das die Nasenschleimhautstanzen während der Kultivierung und Inkubation gebettet waren. Der Histamingehalt pro Milliliter Kulturmedium wurde im Gegensatz zu den Enzymaktivitäten auf das Naßgewicht der jeweiligen Stanze bezogen. Für die Wiedergabe der Enzymaktivität war der Proteingehalt als Bezugsgröße unentbehrlich, da die Enzymmenge im Zellysate entscheidend davon abhing, wieviel Gesamtprotein bei der Aufbereitung der Proben in Lösung gegangen war. Die Histaminausschüttung jedoch wurde nicht auf Protein bezogen, da die in das Kulturmedium freigesetzte Menge in keinem Zusammenhang mit der späteren Homogenisierung der Proben stand. Als Kontrolle für die Histaminausschüttung wurde das Kulturmedium nach 1 Stunde Vorinkubation bezeichnet, um eine Beeinträchtigung der Versuchsergebnisse durch eventuell verletzungsbedingt freigesetzte Mediatoren zu vermeiden.

Der Median der Histaminkonzentration der Kontrolle, **145** ng/mg Naßgewicht, unterschied sich signifikant ($p < 0.001$) von der Sekretion nach 24 h Begasung mit CO₂, **2317** ng/mg Naßgewicht. Dieser differierte wiederum signifikant ($p < 0.01$) vom Median der Histaminkonzentration nach CO₂ und Ozon, **2675** ng/mg Naßgewicht. Die Histaminausschüttung wurde durch additive Ozonbegasung um **15.5 %** erhöht. Sowohl die Kulturbedingungen als auch der zusätzliche Einfluß des Ozon bewirkten eine signifikante Steigerung der Histaminkonzentration. (Abbildung 5)

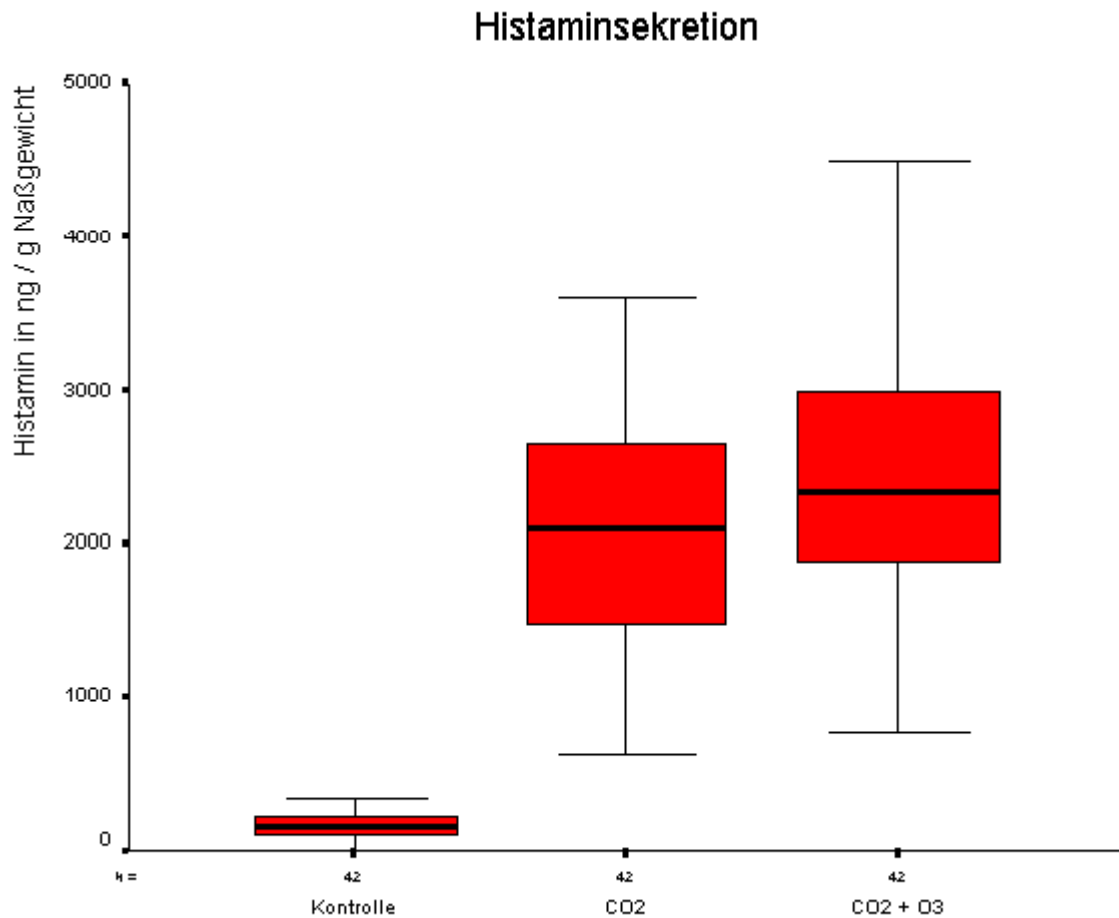


Abbildung 5: Die Abbildung zeigt die Histaminkonzentration im Kulturmedium von Kontrolle (1 Stunde Vorinkubation), CO₂ (Vorinkubation + 24 Stunden bei 37 °C und 5% CO₂) und CO₂ + O₃ (Vorinkubation + 24 Stunden bei 37 °C, 5% CO₂ und 120 ppb Ozon). Bei einer Fallzahl von n=42 wurde der Median der untersuchten Proben dargestellt. Die obere Grenze der Box zeigt die 25te und die untere die 75te Perzentile. Minimum und Maximum werden durch die Balken präsentiert

3.2. Veränderungen der Aktivität antioxidativer Enzyme durch 24 Stunden 120 ppb Ozonexposition

Zur grafischen Darstellung der Ergebnisse wurde für jedes der antioxidativen Enzyme der Median der Aktivitäten aller untersuchten Proben gewählt. Mit Kontrolle werden die unbehandelten Proben bezeichnet. Die vorinkubierten und anschließend exponierten Proben tragen weiterhin die Bezeichnungen CO₂ und CO₂ + O₃ je nach Behandlung.

3.2.1. Katalase

Das Enzym Katalase zeigte weder zwischen Kontrolle und CO₂ –Exposition (**p=0.98**) noch zwischen CO₂ und zusätzlichen 120 ppb Ozon (**p=0.896**) eine signifikante Änderung der Aktivität. Gegenüber den Proben der Kontrolle mit einem Median von **54.8** U/mg Protein sank die Aktivität der Katalase nach 24 h CO₂ –Exposition auf **54.5** U/mg Protein. Nach Inkubation mit CO₂ und Ozon betrug der Median der spezifischen Aktivität **52.4** U/mg Protein, was tendenziell einen Verlust von **3.9** % durch additive Ozonexposition bedeutet. (Abbildung 6)

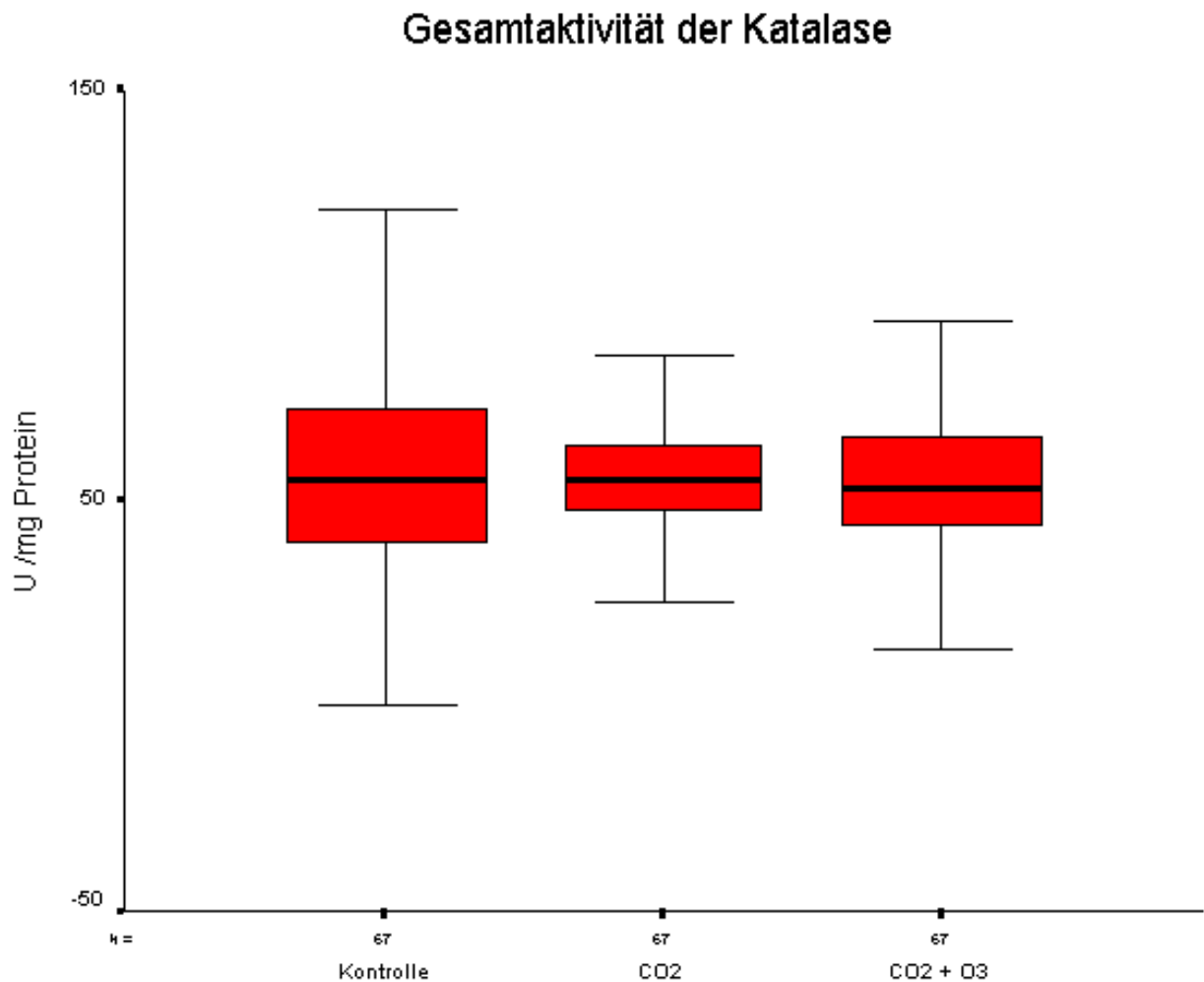


Abbildung 6: Die Abbildung zeigt die enzymatische Katalase-Gesamtaktivität von Kontrolle, CO₂ (Vorinkubation + 24 Stunden bei 37 °C und 5% CO₂) und CO₂ + O₃ (Vorinkubation + 24 Stunden bei 37 °C, 5% CO₂ und 120 ppb Ozon). Bei einer Fallzahl von n = 67 wurde der Median der untersuchten Proben dargestellt. Die obere Grenze der Box zeigt die 25te und die untere die 75te Perzentile. Minimum und Maximum werden durch die Balken präsentiert.

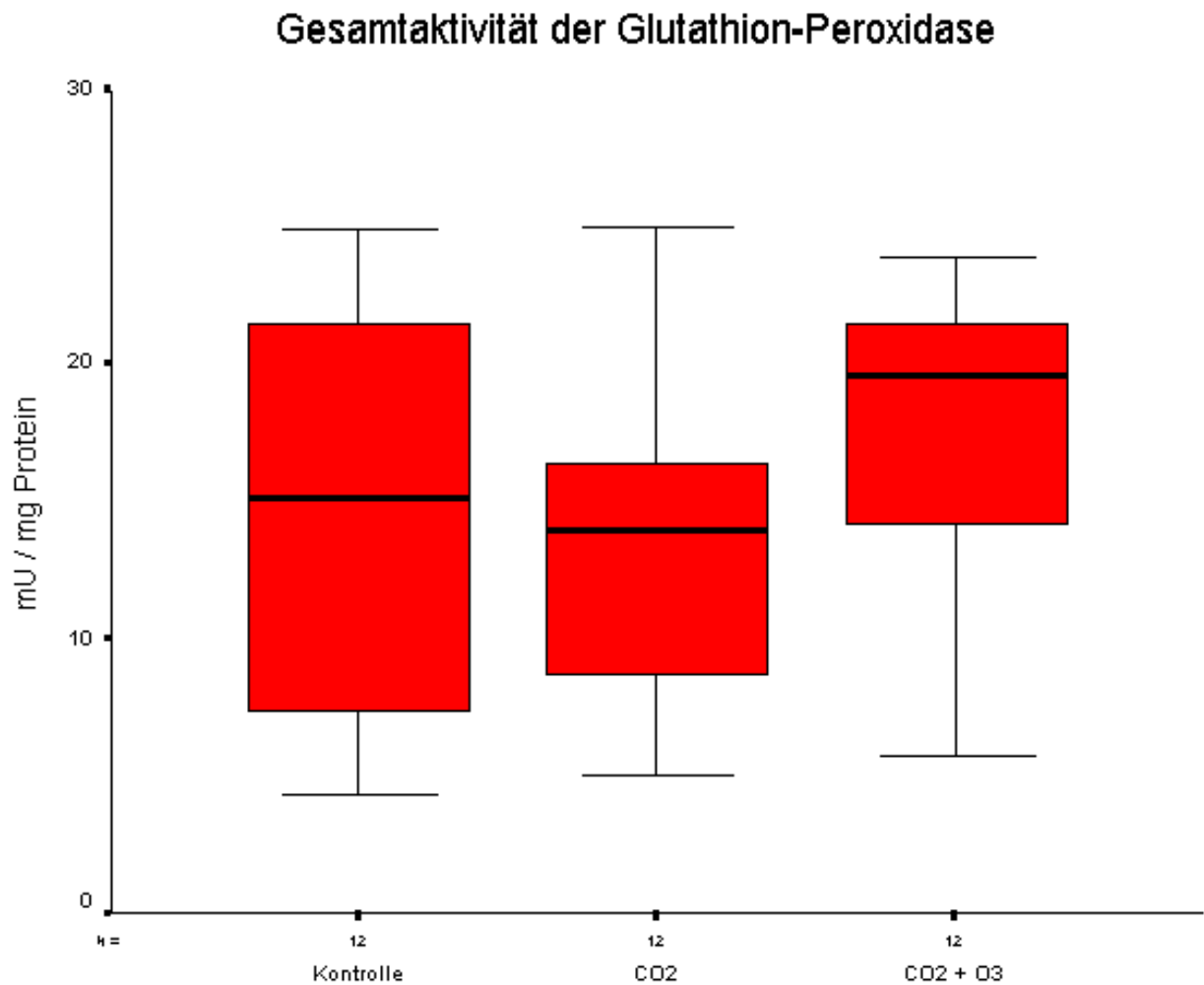


Abbildung 7: Die Abbildung zeigt die enzymatische Glutathion-Peroxidase-Gesamtaktivität von Kontrolle, CO₂ (Vorinkubation + 24 Stunden bei 37 °C und 5% CO₂) und CO₂ + O₃ (Vorinkubation + 24 Stunden bei 37 °C, 5% CO₂ und 120 ppb Ozon). Bei einer Fallzahl von n = 12 wurde der Median der untersuchten Proben dargestellt. Die obere Grenze der Box zeigt die 25te und die untere die 75te Perzentile. Minimum und Maximum werden durch die Balken präsentiert.

3.2.2. Glutathion-Peroxidase

Gegenüber der Kontrolle verringerte sich die Enzymaktivität der Glutathion-Peroxidase durch die Bedingungen der 24 Stunden CO₂ – Exposition von **14,5** mU/mg Protein auf **13,8** mU/mg Protein als Median der verwendeten Proben (**p=0.368**). Durch zusätzliche Ozonbegasung steigerte sich die GPX-Aktivität um **28 %** auf **17.7** mU/mg Protein (**p=0.272**). Beide Aktivitätsveränderungen sind als nicht signifikant anzusehen (Abbildung 7).

3.2.3. Glutathion-Reduktase

Die 24-stündigen Kulturbedingungen bewirkten eine signifikante Steigerung der Gesamtaktivität der Glutathion-Reduktase von **418** mU/mg Protein als Median der Kontrolle auf **621** mU/mg Protein nach CO₂ –Exposition (**p<0.001**). Unter additiver Ozonbegasung sank der Median der GR-Aktivitäten um **1 %** auf **615** mU/mg Protein. (Abbildung 8) Dieser Verlust an Enzymaktivität durch Ozon stellte sich jedoch nicht als signifikant dar. (**p=0.279**)

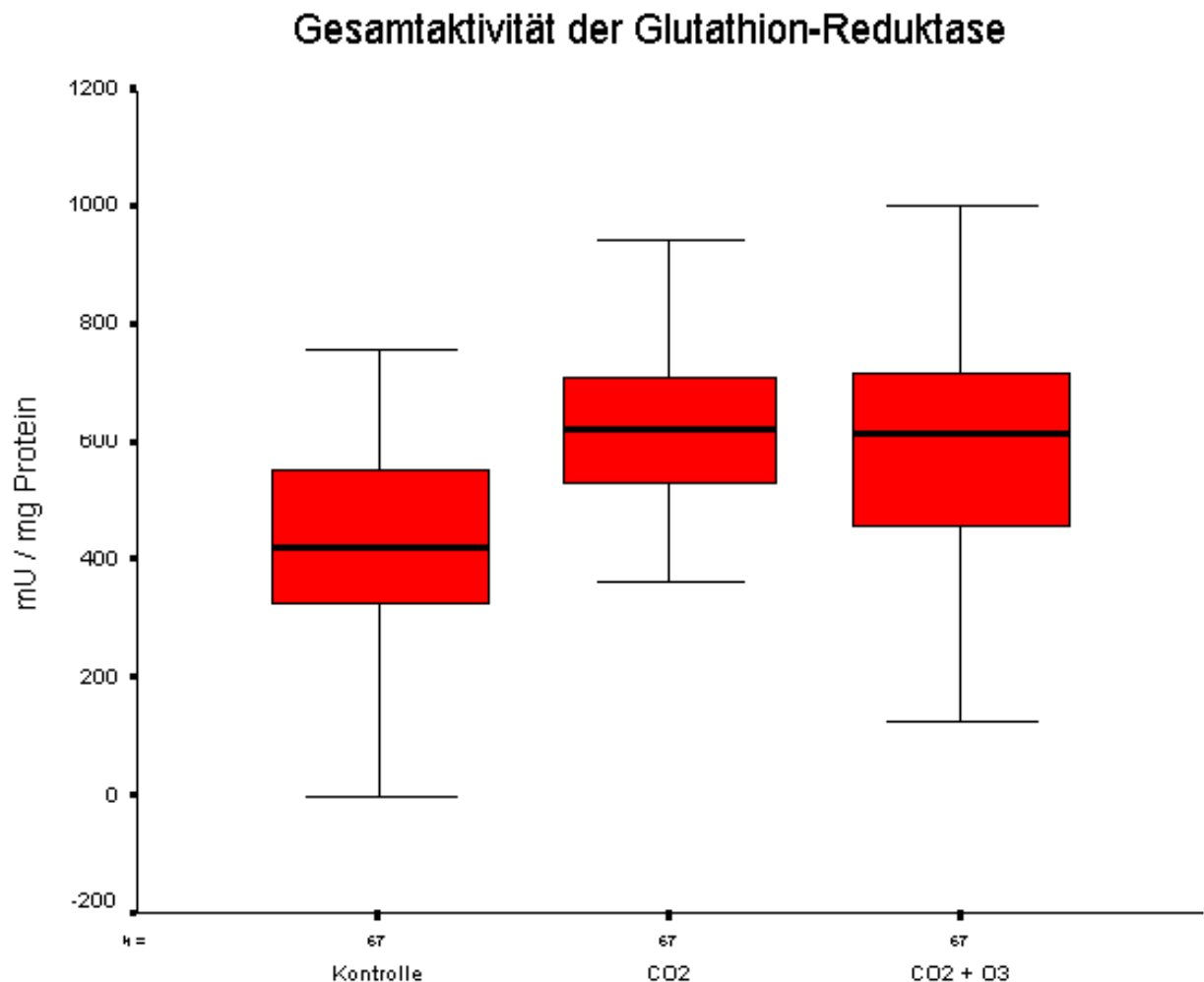


Abbildung 8: Die Abbildung zeigt die enzymatische Glutathion–Reduktase-Gesamtaktivität von Kontrolle, CO₂ (Vorinkubation + 24 Stunden bei 37 °C und 5% CO₂) und CO₂ + O₃ (Vorinkubation + 24 Stunden bei 37 °C, 5% CO₂ und 120 ppb Ozon). Bei einer Fallzahl von n = 67 wurde der Median der untersuchten Proben dargestellt. Die obere Grenze der Box zeigt die 25te und die untere die 75te Perzentile. Minimum und Maximum werden durch die Balken präsentiert.

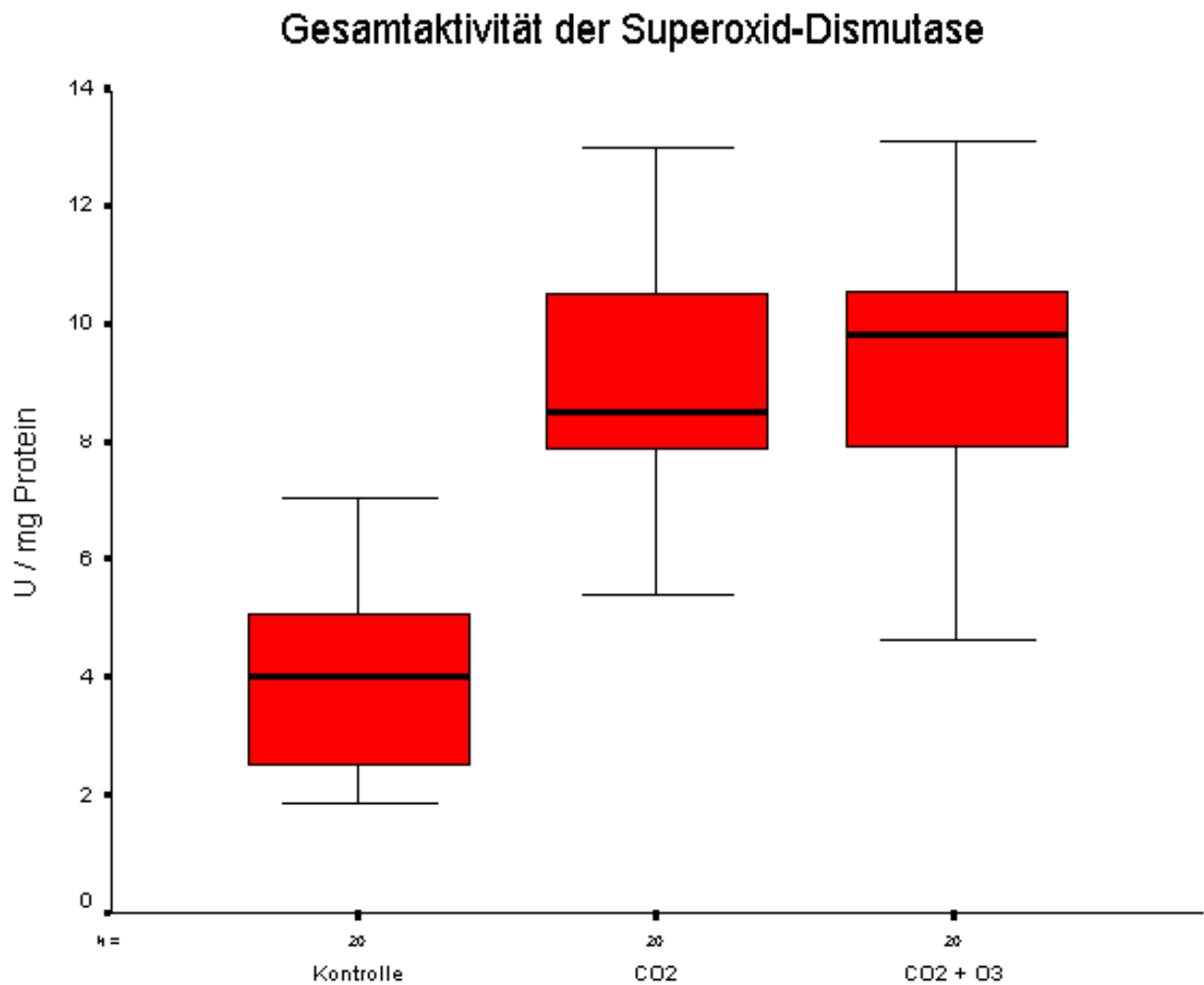


Abbildung 9: Die Abbildung zeigt die enzymatische Superoxid-Dismutase-Gesamtaktivität von Kontrolle, CO₂ (Vorinkubation + 24 Stunden bei 37 °C und 5% CO₂) und CO₂ + O₃ (Vorinkubation + 24 Stunden bei 37 °C, 5% CO₂ und 120 ppb Ozon). Bei einer Fallzahl von n = 20 wurde der Median der untersuchten Proben dargestellt. Die obere Grenze der Box zeigt die 25te und die untere die 75te Perzentile. Minimum und Maximum werden durch die Balken präsentiert.

3.2.4. Superoxid-Dismutase

Die Aktivität der Superoxid-Dismutase wurde durch die Bedingungen des Kulturmodells mit 24-stündiger CO₂ – Exposition signifikant gesteigert (**p<0.001**). Der Median der SOD-Aktivität betrug in der Kontrolle **4,02** U/mg Protein, nach 24 Stunden CO₂ – Exposition **8,42** U/mg Protein und nach 24 Stunden Exposition auf CO₂ und Ozon **9,68** mU/mg Protein (Abbildung 9). Die Steigerung der SOD-Aktivität um **15 %** durch die zusätzliche Ozonbegasung ergab keine statistische Signifikanz (**p=0,291**).

3.2.5. Glutathion-S-Transferase

Die Enzymaktivität der Glutathion-S-Transferase steigerte sich durch die Kulturbedingungen gegenüber der Kontrolle signifikant (**p<0.01**), der zusätzliche Ozoneinfluß bewirkte jedoch keine signifikante Aktivitätssteigerung (**p=0.411**). Der Median der Kontrollproben ergab eine GST-Aktivität von **24.9** mU/mg Protein, der der CO₂-exponierten Proben **37.0** mU/mg Protein und der Median der zusätzlich ozonexponierten Proben betrug **34.4** mU/mg Protein (Abbildung 10). Dies bedeutet eine Abnahme von **7 %** durch additiven von Ozoneinfluß.

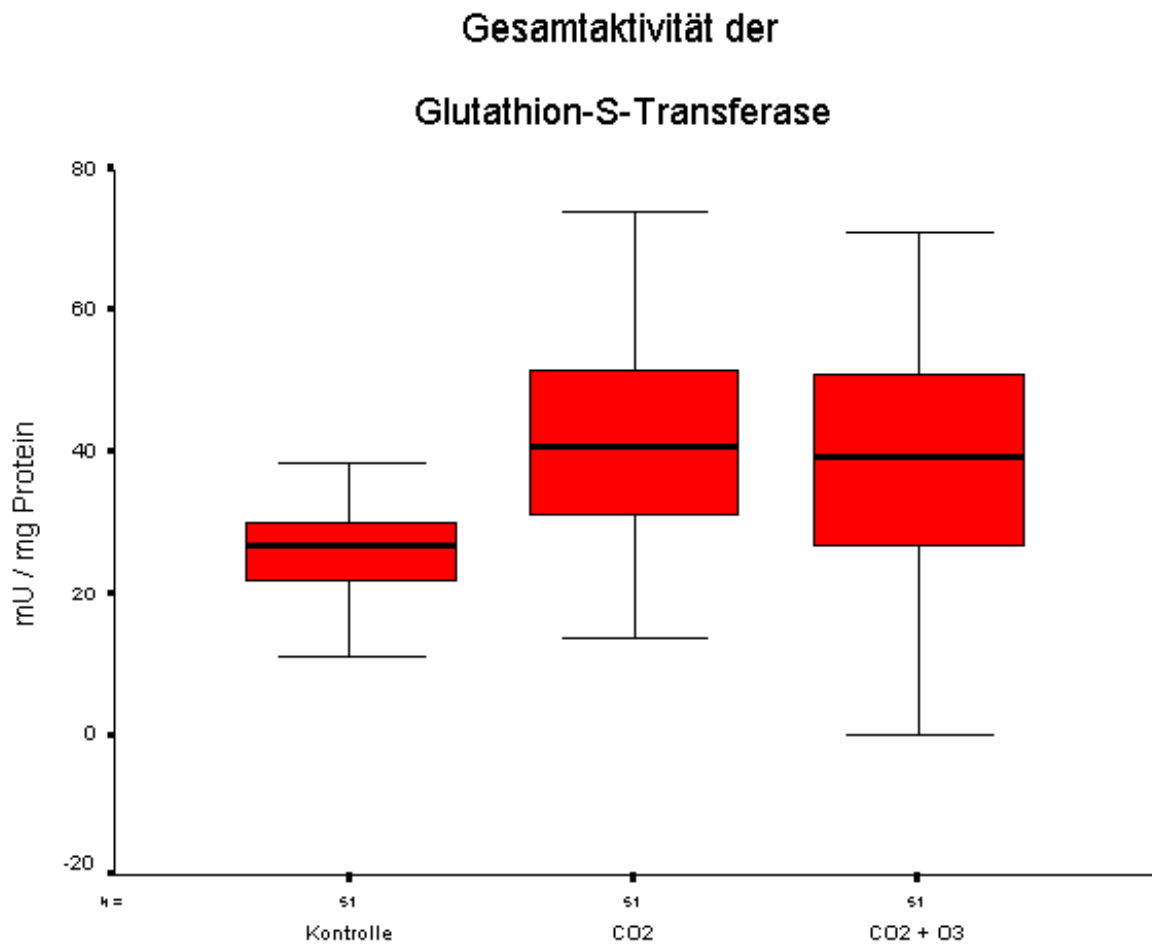


Abbildung 10: Die Abbildung zeigt die enzymatische Glutathion-S-Transferase-Gesamtaktivität von Kontrolle, CO₂ (Vorinkubation + 24 Stunden bei 37 °C und 5% CO₂) und CO₂ + O₃ (Vorinkubation + 24 Stunden bei 37 °C, 5% CO₂ und 120 ppb Ozon). Bei einer Fallzahl von n = 51 wurde der Median der untersuchten Proben dargestellt. Die obere Grenze der Box zeigt die 25te und die untere die 75te Perzentile. Minimum und Maximum werden durch die Balken präsentiert.

3.3. Vergleich der Enzymregulation mit individuellen Faktoren

Zum Vergleich individueller Faktoren mit der Reaktion der Nasenschleimhaut auf ambientale Ozondosen von 120 ppb wurden die prozentualen Aktivitätsänderungen der jeweiligen Enzyme von Vergleichsproben, CO₂ (Vorinkubation + 24 Stunden bei 37 °C und 5% CO₂), zu ozonexponierten Proben, CO₂ + O₃ (Vorinkubation + 24 Stunden bei 37 °C, 5% CO₂ und 120 ppb Ozon), herangezogen. Das Patientenkollektiv wurde nach Geschlecht, bzw. Raucher und Nichtraucher geteilt und die prozentualen Aktivitätsänderungen der Gruppen miteinander verglichen. Der Zusammenhang zwischen Alter und prozentualer Aktivitätsänderung wurde grafisch anhand von Streudiagrammen vorgenommen.

3.3.1. Geschlecht der Patienten

Tabelle 1: Die Tabelle zeigt die zweiseitigen asymptotischen Signifikanzen (Mann-Whitney-U-Test) für die unabhängigen Variablen der prozentualen Enzymaktivitätsänderungen durch 24 Stunden 120 ppb Ozon gruppiert nach Geschlecht.

	SOD	GST	GPX	GR	KAT
asymptotische Signifikanz (2-seitig)	0.747	0.107	0.659	0.633	0.044

In der vorliegenden Studie ergab sich der einzig signifikante Unterschied bezüglich

einer Geschlechterdifferenz in der Reaktion der Nasenschleimhautstanzen auf Ozonbegasung bei der **Katalase** (Tabelle 1). Der Median der Aktivitätsänderungen bei Männern betrug **-2.2 %**, während bei den Frauen eine mittlere Aktivitätssteigerung von **7.6 %** zu verzeichnen war. Alle anderen untersuchten antioxidativen Enzyme zeigten keine geschlechterspezifischen Unterschiede in der Reaktion auf 24-stündige Ozonexposition von 120 ppb.

3.3.2. Raucher und Nichtraucher

Tabelle 2: Die Werte der Tabelle geben die zweiseitigen asymptotischen Signifikanzen nach dem Mann-Whitney-U-Test für zwei unabhängige Variablen beim Vergleich von Rauchern und Nichtrauchern hinsichtlich ihrer prozentualen Enzymaktivitätsänderungen durch 24 Stunden 120 ppb Ozonexposition gegenüber der Vergleichsprobe wieder.

	SOD	GST	GPX	GR	KAT
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	0.253	0.274	0.570	0.567	0.725

Der Vergleich der Schleimhautstanzen humaner nasaler Mukosa von Rauchern und Nichtrauchern konnte hinsichtlich der prozentualen Änderung der Enzymaktivität durch Ozonexposition keine statistisch signifikanten Unterschiede zeigen (Tabelle 2).

3.3.3. Alter der Patienten

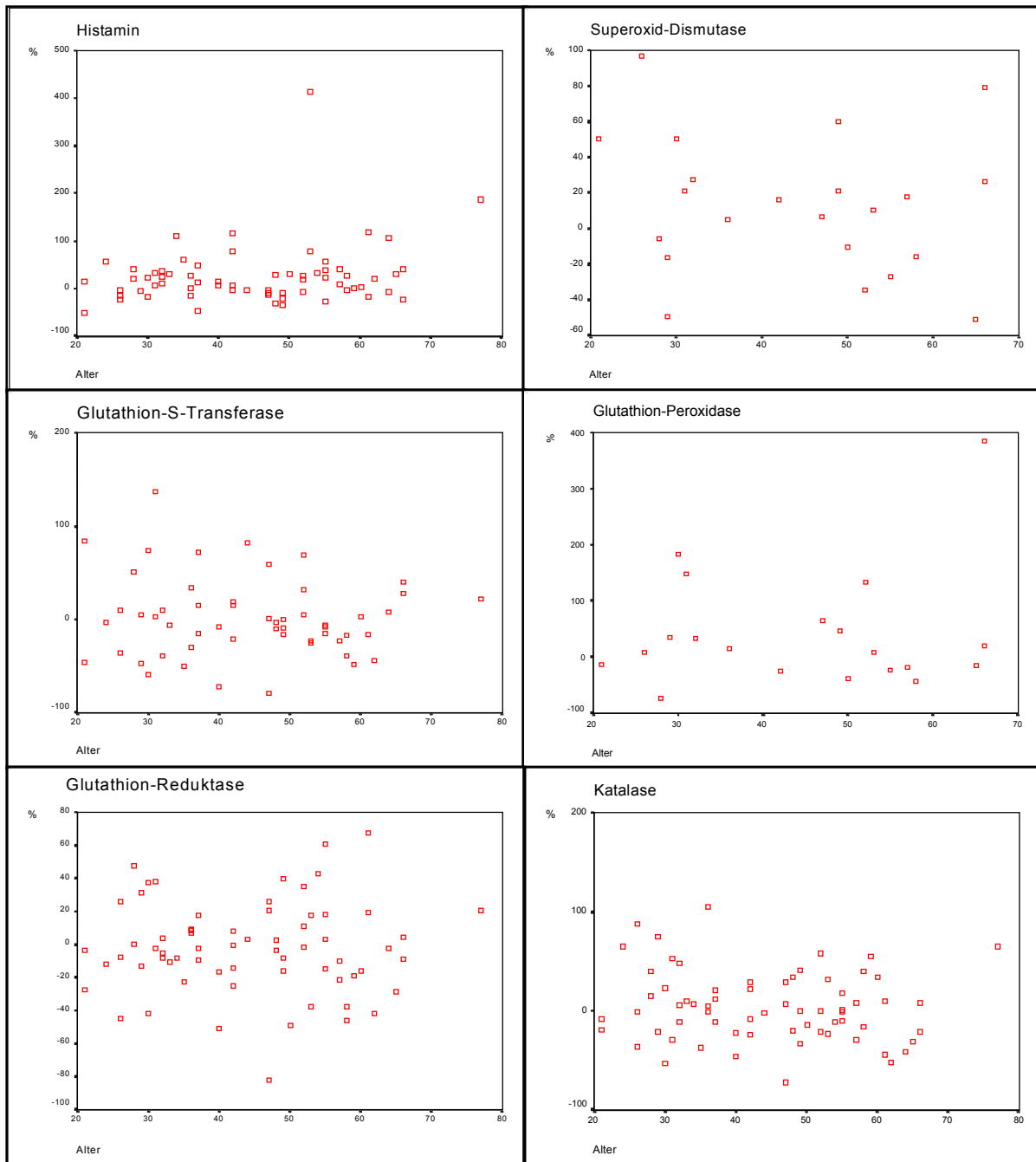


Abbildung 11: Die Abbildung zeigt die prozentuale enzymatische Aktivitätssteigerung durch 24 Stunden 120 ppb Ozon gegenüber der Vergleichsprobe in Abhängigkeit vom Alter des jeweiligen Patienten als Streudiagramm.

Zwischen den prozentualen Veränderungen der Enzymaktivitäten durch 24-stündige Ozonexposition (120 ppb) und dem Alter der Patienten ließ sich im Streudiagramm (Abbildung 11) kein Zusammenhang erkennen.

3.4. Der Polymorphismus der GSTM1



Abbildung 12: Die Abbildung zeigt exemplarisch die fotografische Darstellung der durch die Elektrophorese kenntlich gemachten DNS-Fragmente nach PCR-Analyse. Die untere Bande ist artifiziell, bei der mittleren Bande handelt es sich um humanes β -Globin und die obere Bande stellt, falls vorhanden, das 625 bp Fragment des humanen GSTM1-Genes dar.

Mittels PCR wurde bei **28** Patienten das Vorhandensein der Glutathion-S-Transferase M1 festgestellt während sich **38** Patienten defizient hinsichtlich der GSTM1 zeigten. Dies entspricht einer Defizienz von **58%** im Patientenkollektiv dieser Studie. Bei einem der 67 Patienten führte die Untersuchung zu keinem eindeutigen Ergebnis.

3.4.1. Regulation antioxidativer Enzyme bei GSTM1-Defizienz

Tabelle 3 und Tabelle 4 geben die zweiseitigen asymptotischen Signifikanzen nach dem Wilcoxon-Test für zwei verbundene Stichproben an. Dargestellt werden die Signifikanzen der enzymatischen Aktivitätsänderungen von Vergleichsproben, CO₂ (Vorinkubation + 24 Stunden bei 37 °C und 5% CO₂), zu ozonexponierten Proben, CO₂ + O₃ (Vorinkubation + 24 Stunden bei 37 °C, 5% CO₂ und 120 ppb Ozon). Tabelle 3.3 zeigt die Aktivitätsänderungen von GSTM1-defizienten Patienten und Tabelle 3.4 von Patienten mit genetisch vorhandener GSTM1.

	SOD	GST	GPX	GR	KAT
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	0.01	0.11	0.31	0.15	0.33

Für GSTM1-defiziente Patienten

Tabelle 4:

	SOD	GST	GPX	GR	KAT
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	0.21	0.45	0.69	0.81	0.14

für Patienten mit GSTM1

3.4.2. Die Regulation der SOD bei GSTM1-Defizienz

Der Vergleich von Patienten mit genetischer Defizienz für die GSTM1 gegenüber Patienten, die diese Defizienz nicht aufwiesen, ergab für die Superoxid-Dismutase einen statistisch signifikanten Unterschied in der Aktivitätsänderung durch Ozoneinfluß. Die Aktivität der SOD nahm bei GSTM1-defizienten Patienten zu während die Patienten mit vorhandener GSTM1 keine signifikante Veränderung der SOD-Aktivität durch 24 Stunden 120 ppb Ozon zeigten. Der Median der SOD-Aktivitäten GSTM1-defizienter Patienten betrug nach CO₂-Exposition in Kultur **8.23** mU/mg Protein, nach CO₂ und Ozon betrug er **10.1** mU/mg Protein (Abbildung 13). Dieser Anstieg um **22.7** % ist nach dem Wilcoxon-Test für zwei verbundene Stichproben signifikant (**p=0.011**) (Tabelle 3). Die mit dem GSTM1-Gen ausgestatteten Patienten hatten nach CO₂-Exposition eine mediane Aktivität von **9.23** mU/mg Protein, nach CO₂ und Ozon **8.87** mU/mg Protein (Abbildung 13). Diese Verminderung um **3.9** % zeigt jedoch keine statistische Signifikanz (**p=0.214**) (Tabelle 4).

Für die Enzyme GST, GPX, GR und KAT ließen sich nach der Gruppierung in GSTM1-Defizienz und Vorhandensein des Genes keine signifikanten Änderungen der Enzymaktivitäten durch additive Ozonexposition feststellen (Tabelle 3 und 4).

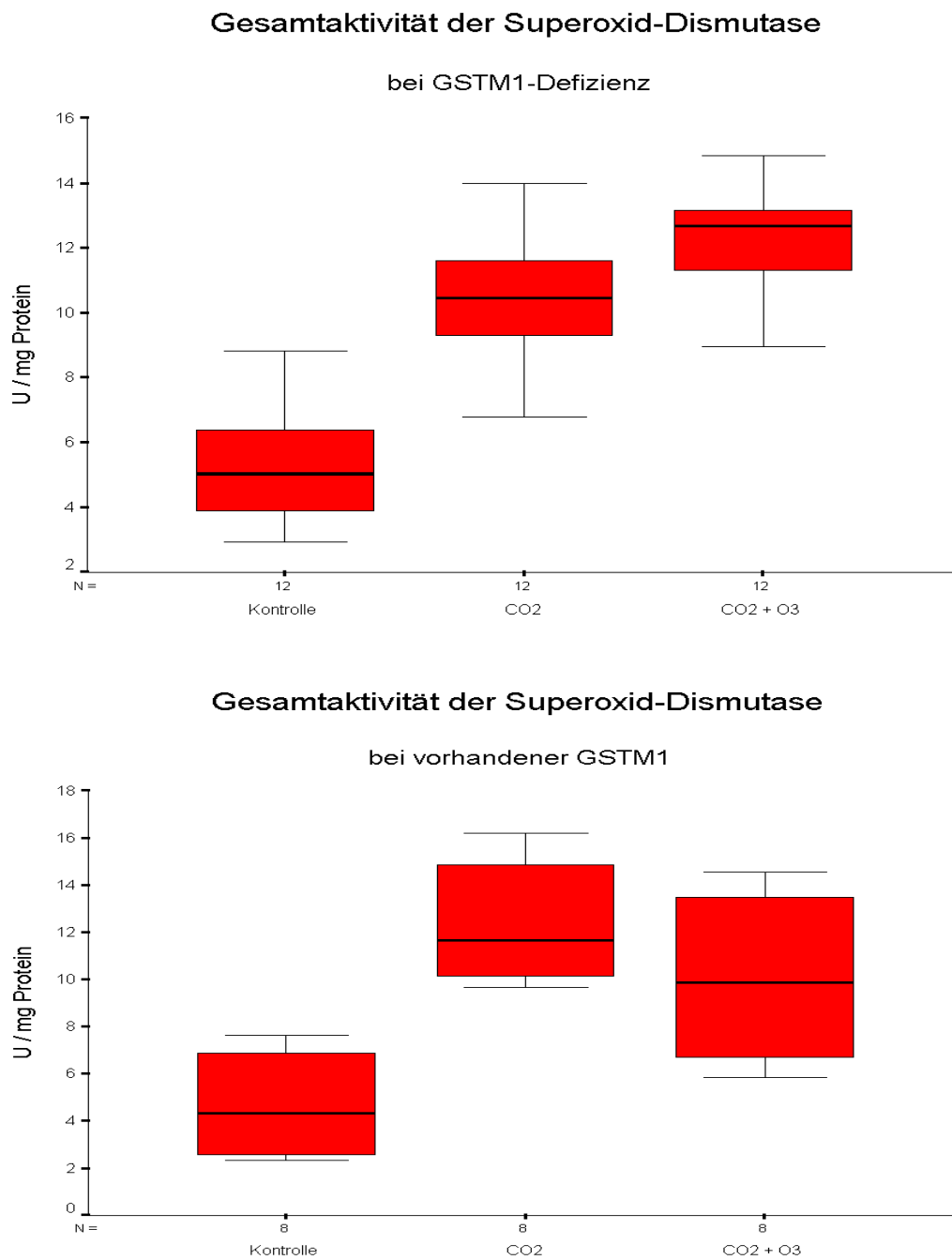


Abbildung 13: Die Abbildung zeigt die Gesamtaktivität an Superoxid-Dismutase bei GSTM1 Defizienz bzw. vorhandener GSTM1 als Median. Dargestellt sind Kontrolle, CO₂ (Vorinkubation + 24 Stunden bei 37 °C und 5% CO₂) und CO₂ + O₃ (Vorinkubation + 24 Stunden bei 37 °C, 5% CO₂ und 120 ppb Ozon). Die Fallzahl betrug n = 12 (GSTM1-Defizienz) bzw. n = 8 (GSTM1 vorhanden). Die obere Grenze der Box zeigt die 25te und die untere die 75te Perzentile. Minimum und Maximum werden durch die Balken präsentiert.

Tabelle 5: Die Referenzwerte der enzymatischen Aktivitäten werden präsentiert als Mittelwert \pm SD

	Katalase in U / mg Protein	GPX in mU / mg Protein	GR in mU / mg Protein	SOD in U / mg Protein	GST in mU / mg Protein
Ergebnisse der vorliegenden Studie	59.9 \pm 30.6 (n=67)	15.1 \pm 7.1 (n=19)	449 \pm 148 (n=67)	5.58 \pm 3.1 (n=20)	26.6 \pm 9.4 (n=59)
Lungenhomogenat des Menschen [97]	65*** (n=5)	45*** (n=5)	n.g.	9.74 \pm 4.5 (n=5)	250*** (n=5)
Lungenhomogenat der Ratte [97]	20*** (n=6)	130*** (n=6)	n.g.	12.47 \pm 4.26 (n=6)	150*** (n=6)
Homogenat nasalen Epithels der Ratte [96]	n.g.	48.6* \pm 4.3 (n=20)	275* \pm 16 (n=20)	n.g.	490* \pm 32 (n=20)
Lungenhomogenat der Ratte [117]	n.g.	159 \pm 5** (n=6)	49 \pm 1** (n=6)	n.g.	n.g.
Distale Trachea der Ratte [89]	0.097 (n=8-9)	440 \pm 100 (n=6-9)	n.g.	281 \pm 51 (n=5-8)	170*** (n=8-10)
Lungenhomogenat der Ratte [89]	0.09 \pm 0.02 (n=8-9)	150*** (n=6-9)	n.g.	110*** (n=5-8)	100*** (n=8-10)
Humane Bronchiale BEAS-2B Epithelzellen in Kultur [118]	7.3 \pm 1.3 (n=3)	5.8 \pm 1.4 (n=3)	22800 \pm 3.2 (n=7)	26 \pm 15.3 (n=4)	n.g.
Humane Bronchiale Epithelzellen in Kultur [119]	12.2 (n=2)	<10 (n=2)	86.6 (n=2)	44.1 (n=2)	n.g.

* Enzymaktivitäten in $\mu\text{mol} / \text{min} / \text{mg Protein}$; n.g. = nicht gemessen

** Mittelwert \pm Standardfehler (SEM);

*** Werte abgelesen aus Grafik des Autors;

4. Diskussion

4.1. Höhe der enzymatischen Gesamtaktivitäten

Die Enzymaktivität der Kontrolle, d.h. der Nasenschleimhautstanze, die keiner Kultivierung unterzogen wurde, sollte in dieser Studie als enzymatische Basisaktivität gelten und wurde zum Vergleich mit Daten aus der Literatur gewählt (Tabelle 5).

4.1.1. Katalase

Die basale Enzymaktivität der Katalase in der vorliegenden Arbeit, bezeichnet als Kontrolle im Ergebnisteil, liegt mit 59.9 ± 30.6 U/mg Protein als Mittelwert in der selben Größenordnung der von Bryan und Jenkinson [97] ermittelten Katalaseaktivität von 65 U/mg Protein im Lungenhomogenat des Menschen. Die Methode der Enzymbestimmung nach Beers und Sizer [102] stimmt hier überein, während die übrigen Autoren der Tabelle 5 andere Verfahren zur Bestimmung der Katalaseaktivität anwendeten.

Bryan und Jenkinson [97] benutzten für diese Bestimmung 5 g homogenisiertes und zentrifugiertes Lungengewebe von 5 männlichen Karzinompatienten. Eine Untersuchung anatomisch unterschiedlich gelegener Teile der Lunge und des Brochialsystems [89] ergab hinsichtlich der Katalaseaktivität im Atemtrakt der Ratte keine bedeutsamen Unterschiede. Beim Rhesusaffen wurde eine höhere Katalaseaktivität im distalen Teil des Bronchialbaumes gegenüber der Trachea beobachtet. Diese Daten lassen offen, ob beim Menschen eine Varianz der Katalasewerte entlang des Atemtraktes zu erwarten ist. Der Vergleich der Katalaseaktivität humaner nasaler Mukosa mit der im Lungenhomogenat des Menschen

[97] deutet nicht auf größere Varianzen entlang des menschlichen Atemtraktes hin.

Mit 0.09 bzw. 0.097 U/mg Protein sind die von [89] gemessenen Katalaseaktivitäten im Vergleich zu den anderen Werten der Tabelle äußerst gering, was auf speziesspezifische Unterschiede in der Enzymausstattung von Ratte und Mensch zurückzuführen sein könnte [97]. Ein anderer Grund hierfür könnte in der abweichenden Methodik liegen. Duan und Mitarbeiter [89] benutzten Methanol als Hydrogendonorator, um eine Katalasebestimmung nach Johansson und Borg [120] durchzuführen.

Die in Tabelle 5 angegebenen Katalaseaktivitäten für bronchiale Epithelzellen in Kultur [118, 119] wurden mittels einer Sauerstoffelektrode vom Clark-Typ [121] bestimmt, was die im Verhältnis zur vorliegenden Studie geringeren Aktivitätswerte der Katalase erklären könnte. Kinnula und Mitarbeiter [119] konnten beobachten, daß die nach Wu und Mitarbeitern [122] kultivierten bronchialen Epithelzellen eine signifikant geringere Katalaseaktivität aufwiesen als frisch isolierte Zellen der selben Herkunft. Dies könnte neben der abweichenden Methodik ein Grund dafür sein, daß die Kontrollproben in der vorliegenden Studie eine höhere Aktivität als die kultivierten bronchialen Epithelzellen aufweisen.

4.1.2. Glutathion-Peroxidase

Der Mittelwert der gemessenen GPX-Basisaktivitäten nasaler Mukosa in Kultur betrug in der vorliegenden Studie 15.1 ± 7.1 mU/mg Protein und ist mit den GPX-Werten der von Pietarinen-Runtti und Mitarbeitern [118] und Kinnula und Mitarbeitern [119] gemessenen bronchialen Epithelzellen in Kultur vergleichbar. Zu den höheren GPX-Basisaktivitäten der übrigen Autoren in Tabelle 5 führen methodische und speziesspezifische Unterschiede.

In der vorliegenden Studie wurde Wasserstoffperoxid als Substrat bei Anwesenheit von GSH, GR und NADPH zur Reaktion gebracht [104]. Ähnlich bestimmten Pietarinen-Runtti und Mitarbeitern [118] und Kinnula und Mitarbeitern [119] GPX-Aktivitäten von 5.8 ± 1.4 und <10 mU/mg Protein (Tabelle 5) an bronchialen Epithelkulturen. Sie

bestimmten den Verbrauch an NADPH in Anwesenheit von t-Buthylhydroperoxid, GSH und GR [123]. Trotz leicht modulierter Methodik liegen die GPX-Basisaktivitäten der bronchialen Epithelzellen in Kultur und der humanen nasalen Mukosa in einem ähnlichen Bereich.

Bryan und Jenkinson [97] stellten im Lungenhomogenat eine GPX-Aktivität von 45 mU/mg Protein fest. Cassee und Feron [96] ermittelten in nasalem Epithel der Ratte eine GPX-Aktivität von $48.6 \pm 4.3 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ Protein. Beide benutzten nach der Beschreibung von Lawrence und Burk [124] Kupferhydroperoxid (CuOOH) als Substrat. Dieser methodische Unterschied zur vorliegenden Studie an humaner nasaler Mukosa könnte ausschlaggebend für die Aktivitätsdifferenz gegenüber Bryan und Jenkinson [97] sein. Nicht erklärbar scheint jedoch die im Vergleich zu allen anderen Werten der Tabelle 5 überdimensionierte GPX-Aktivität von Cassee und Feron [96]. Nach Unit-Definition von Lawrence und Burk [124] entspricht $1 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ Protein einer Unit, was bedeuten würde, daß hier eine GPX-Aktivität von 48600 ± 430 mU/mg Protein vorliegt. Ein Wert dieser Größenordnung ist im Sinne eines Unterschiedes zwischen der enzymatischen Ausstattung von Ratte und Mensch nicht zu rechtfertigen. Es könnte sich um einen Berechnungs- oder einen Druckfehler handeln.

Innerhalb einer Studie [97] wurde im Lungenhomogenat der Ratte wesentlich höhere GPX-Aktivität (130 mU/mg Protein) als im Lungenhomogenat des Menschen (45 mU/mg Protein) beobachtet. Speziesspezifische Varianzen zur vorliegenden Studie können also ebenfalls angenommen werden. In anderen Studien [88, 89] wurden GPX-Aktivitätsunterschiede zwischen verschiedenen Segmenten des Atemtraktes der Ratte festgestellt. Nimmt man Ähnliches für den Atemtrakt des Menschen an, so würde auch die etwa dreimal höhere GPX-Aktivität in humanem Lungenhomogenat [97] gegenüber der menschlichen nasalen Mukosa plausibel erscheinen. (Tabelle 5)

4.1.3. Glutathion-Reduktase

Für die GR wurde in der vorliegenden Studie im nasalen Epithel eine durchschnittliche Aktivität von 449 ± 148 mU/mg Protein gemessen. Die von anderen Autoren gemessenen GR-Aktivitäten in Tabelle 5 differieren untereinander beträchtlich, so daß es schwierig ist eine Einordnung vorzunehmen.

Im Lungenhomogenat der Ratte fanden Rietjens und Mitarbeiter [82] eine GR-Aktivität von 49 mU/mg Protein, was durchaus im Bereich einer speziesspezifischen Differenz zu der vorliegenden Studie liegen könnte. Methodisch hielten sich Rietjens und Mitarbeiter an die Beschreibung von Racker [106], nach der auch in der vorliegenden Studie gearbeitet wurde.

Bei Kinnula und Mitarbeitern [119] wurde ebenfalls GSSG als Substrat benutzt und die Oxidation von NADPH gemessen, als Referenz wird jedoch Beutler [123] angegeben. Die hier bestimmte im Vergleich zur nasalen Mukosa des Menschen 5fach niedrigere GR-Aktivität von 86.8 mU/mg Protein in bronchialen, frisch kultivierten Epithelzellen des Menschen könnte durch die Kulturbedingungen und eine vermutlich auch bei der GR gegebene Variabilität der Basisaktivitäten entlang des Atemtraktes erklärbar sein. In den Studien von Plopper, Duan und Mitarbeitern [88, 89] (Tabelle 5) wurde die GR-Aktivität an verschiedenen Atemwegssegmenten zwar nicht bestimmt, wegen der funktionellen Kopplung an GPX könnte jedoch auf ein ähnlich variables Verteilungsmuster geschlossen werden.

Die von Pietarinen-Runtti [118] veröffentlichte GR-Aktivität von 22800 mU/mg Protein (Tabelle 5) erscheint im Vergleich zu der Studie von Kinnula [119], die eine GR-Aktivität von 53.5 mU/mg Protein ermittelte (nicht in der Tabelle angegeben), überdimensioniert, zumal in beiden Studien transformierte BEAS 2B -Zellkulturen der selben Bezugsquelle (Dr. C. Harris, Bethesda, MD) verwandt wurden.

Cassee und Mitarbeiter [96] bestimmten nach der Methode von Bayoumi und Rosalki [125] im nasalen Epithel der Ratte eine GR-Aktivität von 275 ± 16 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ Protein, was 275000 ± 16000 mU /mg Protein entspricht. Zweifel an der Dimensionierung der

Enzymaktivitäten bei Cassee und Mitarbeitern [96] waren schon im vorherigen Kapitel über die GPX-Aktivität gegeben und bestehen nach Vergleich mit den anderen Autoren der Tabelle 5 auch hier.

4.1.4. Superoxid-Dismutase

Die im Zelllysate der menschlichen Nasenschleimhaut ermittelten SOD-Aktivitäten ergaben einen Mittelwert von 5.58 ± 3.1 U/mg Protein. Größere Abweichungen zu den Werten anderer Autoren in Tabelle 5 gab es nur bei den von Duan und Mitarbeitern [89] gemessenen SOD-Aktivitäten.

Die von Bryan und Jenkinson [97] gemessenen SOD-Aktivitäten basieren auf der Inhibition der Reduktion von Cytochrom-c durch Superoxid [126]. Bestimmt wurde die totale SOD-Aktivität und die Aktivität der cyanidresistenten MnSOD nach Ausfällung mit 5mM KCN-Lösung [127]. Die Ergebnisse wurden als CuZnSOD und MnSOD präsentiert und in Tabelle 5 summiert als gesamte SOD-Aktivität eingetragen. Die Cu-Superoxid-Dismutase ist vorwiegend im Blutplasma aktiv und somit für die SOD-Gesamtaktivität im Gewebe irrelevant (Kapitel 1.2.3).

Die gleiche Methode und Darstellung in Tabelle 5 wurde bei Pietarinen-Runtti [118] verwandt. Die SOD-Aktivität in BEAS 2B Zellen betrug dabei 26 ± 15.3 U/mg Protein. Einen etwas höheren Wert von 44.1 U/mg Protein bestimmten Kinnula und Mitarbeiter [119]. Sie benutzten dieselbe Methode beschrieben bei Crapo, McCord und Fridovich [128], wobei die Bestimmung unter basischem pH 10.0 durchgeführt wurde, was vornehmlich die Aktivität der CuZnSOD wiedergibt [129]. Die oben genannten Referenzen sind untereinander methodisch vergleichbar, weichen aber von der Bestimmungsmethode der vorliegenden Studie ab, was die 2-8fach höheren Werte erklären könnte.

Duan und Mitarbeiter [89] benutzten zur Bestimmung der SOD-Aktivität in der Trachea der Ratte Xanthinoxidase, um Superoxid zu produzieren [130]. Diese von den Methoden aller anderen Autoren abweichende Meßtechnik könnte dazu geführt haben,

daß die von Duan [89] beschriebenen SOD-Aktivitäten in einem wesentlich höheren Bereich als die übrigen der Tabelle 5 liegen.

4.1.5. Glutathion-S-Transferase

Für die zytosolische GST-Aktivität wurde an menschlicher Nasenschleimhaut in dieser Studie ein Mittelwert von 26.6 ± 9.4 mU/mg Protein gemessen. Es existiert eine nicht in Tabelle 5 aufgeführte Studie von Aceto und Mitarbeitern [71] in der die GST-Aktivität der nasalen humanen Mukaosa mit 76.8 ± 21.2 mU/mg Protein bestimmt wurde. Differenzen zu den GST-Aktivitäten aus Tabelle 5 sind als gewebe- und speziesspezifische einzuordnen.

Die spezifische GST-Aktivität wurde in der vorliegenden Studie mittels 1-Chloro-2,4-dinitrobenzen als Substrat nach der Methode von Habig und Mitarbeitern [110] gemessen. Mit derselben Methode wurde in der Studie von Aceto und Mitarbeitern [71] eine dreifach höhere GST-Aktivität in der Nasenschleimhaut von 5 männlichen und 5 weiblichen Patienten gemessen. Bei dieser geringen Fallzahl könnten interindividuelle Unterschiede ausschlaggebend für die entstandene Differenz im Mittelwert sein. 8 von 10 Probanden bei Aceto und Mitarbeitern [71] hatten ein Alter von 18-24 Jahren, nur zwei Patienten waren älter. Da an olfaktorischem Epithel der humanen Nasenschleimhaut festgestellt wurde, daß jüngere Patienten eine höhere GST-Aktivität haben [72], könnte das Alter der Patienten höhere Aktivitätswerte bei Aceto und Mitarbeitern [71] verursacht haben.

Im Lungenhomogenat des Menschen [97] wurde nach der Methode von Habig und Mitarbeitern [110] eine durchschnittliche GST-Aktivität von 250 mU/mg Protein gemessen. Diese hohen Aktivitätswerte könnten der Variabilität der GST-Aktivität in verschiedenen Geweben und innerhalb eines Gewebes folgen [68]. Ein weiterer Faktor könnte die Auswahl der Patienten sein. Bryan und Jenkinson [97] entnahmen das Lungengewebe 5 pneumektomierten, männlichen Patienten distal eines Lungentumorareals. Es existieren Hinweise darauf, daß die GST in präneoplastischen

Stadien und Tumorzellreihen überexprimiert wird [Zusammenfassung bei 59].

Die in der Tabelle 5 angegebenen Werte für Lungenhomogenat der Ratte [89, 97] und distale Trachea der Ratte [89] zeigen speziesspezifische Unterschiede in der GST-Aktivität zwischen Mensch und Ratte wie auch gewebespezifische Unterschiede innerhalb einer Spezies.

Cassee und Mitarbeitern [96] bestimmten eine durchschnittliche GST-Enzymaktivität von $490 \pm 32 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ Protein, die nach Unit-Definition von Habig [110] 490000 mU/ mg Protein entspricht. Dieser Wert steht der ebenfalls für die Nasenschleimhaut der Ratte gemessenen GST-Aktivität bei Aceto und Mitarbeitern [71] von 18.0 ± 3.6 mU/mg Protein gegenüber. Bei einem Vergleich mit den wesentlich geringeren Werten anderer Autoren (Tabelle 5) für die GST-Aktivität entstehen Zweifel an der Dimensionierung der Ergebnisse von Cassee und Mitarbeitern [96].

4.2. Veränderungen antioxidativer Enzymaktivitäten durch 24-stündige Ozonexposition (120 ppb)

An den nach Schierhorn und Mitarbeitern [99] kultivierten Nasenschleimhautstanzen ließ sich im Vergleich zur alleinigen CO₂ –Exposition durch additive 24-stündige Ozonexposition auf 120 ppb keine signifikante Veränderung der spezifischen Enzymaktivitäten feststellen. GPX- und SOD-Aktivität stiegen um 28% und 15% durch Ozoneinfluß, Katalase, GR und GST fielen um 3.9%, 1% und 7%. Keine der Veränderungen hatte statistische Signifikanz.

4.2.1. Katalase

Nach 24 Stunden 120 ppb Ozon einfluß war eine um 3.9% verminderte Aktivität der Katalase im Kulturmodell der Nasenschleimhaut zu beobachten. Die fehlende Signifikanz und das geringe Ausmaß des Aktivitätsverlustes kann keine ozoninduzierte Regulation der Katalase belegen.

An Fibroblasten der Ratte in Kultur wurde die Katalase als ein tragendes Enzym bei der Ozonabwehr herausgestrichen [131]. In einer anderen Studie [121] konnte die Bedeutung der Katalase bei der Detoxifikation von H_2O_2 zwar an frisch isolierten alveolaren Typ II Epithelzellen bestätigt werden, unter Kulturbedingungen hatte die Katalase jedoch keine Bedeutung mehr für die antioxidative Abwehr. Kinnula und Mitarbeiter [119] beobachteten immunohistochemisch eine geringere Dichte von Katalase in kultivierten Zellen gegenüber frisch entnommenen bronchialen Epithelzellen. Ein solcher substanzieller Verlust an Katalase durch die Kulturbedingungen könnte dazu führen, daß andere Entgiftungswege beschritten werden, da das Enzym in unphysiologisch geringer Menge vorhanden ist. Falls die Katalaseaktivität jedoch nach Ozonexposition ansteigt und das Enzym substanziell abnimmt, würden sich beide Effekte überschneiden und die gemessene Katalaseaktivität nach Ozon einfluß wäre verfälscht.

Die nur leichte, nicht signifikante Verminderung der Katalaseaktivität in der vorliegenden Studie legt nahe, daß die Katalase keine Bedeutung für die Abwehr des Ozonreizes *in vitro* hatte. Es bleibt offen, ob dies ursächlich mit dem Kulturmodell zusammenhängt, oder ob die Katalase bei der verwendeten, geringen Ozonkonzentration von 120 ppb ohnehin bedeutungslos für die enzymatische Abwehr dieses oxidativen Reizes ist. Bei der Reaktion auf H_2O_2 , einem potentiellen Mediator der Ozontoxizität, wurde beispielsweise an kultivierten mesothelialen Zellen der Pleura (Ratte) beobachtet, daß der Glutathion-Redoxzyklus bei niedrigen, die Katalase jedoch erst bei hohen H_2O_2 - Konzentrationen zur Abwehr bevorzugt wird [132]. Bei einer Ozonexposition von 120 ppb könnte die Menge an H_2O_2 , die durch diese oxidative Belastung entsteht, zu gering

sein um signifikante Steigerungen der Katalase-Aktivität zu erwarten. Die Toxizität des Ozon könnte unter diesen Bedingungen in größerem Maße über Ozonolyseprodukte vermittelt sein, welche bevorzugt im Glutathion-Redoxzyklus abgebaut werden. (siehe auch Kapitel 1.2.2)

4.2.2. Glutathion-Peroxidase

Die Aktivität der GPX wurde im Kulturmodell bei 120 ppb Ozon in der nasalen Mukosa des Menschen um 28% gesteigert. Diese Steigerung hatte keine Signifikanz und kann nur als Tendenz gedeutet werden.

In vivo war bei Rahman und Mitarbeitern [87] eine gesteigerte GPX-Aktivität nach 700 ppb Ozon in der Lunge der Ratte erst nach 3 Tagen zu beobachten. In der vorliegenden in vitro Studie wurde eine weitaus geringere Ozonkonzentration bei kürzerer Expositionsdauer benutzt, was zu veränderter toxischer Wirkung des Ozon [4, 7] und veränderter Regulation der AOE's führen kann [88, 89]. Des weiteren handelt es sich bei Rahman [87], wie auch in diversen anderen Studien, die eine Hochregulation der GPX postulieren, um Lungenhomogenat. Die nasale Mukosa stellt ein differenziertes Gewebe mit vom Lungengewebe abweichender Enzymausstattung und damit differierender Regulation der AOE's dar.

Eine Studie von Cassee und Mitarbeitern [96] untersuchte in vivo die Reaktion der AOE's am Homogenat der Nasenschleimhaut der Ratte bei 3-tägiger intermittierender Ozonexposition (400 ppb). Die Enzymaktivitäten von GPX und GR wurden durch Ozon nicht beeinflusst. Es handelt sich bei dieser Studie zwar um den selben Gewebetyp, die Unterschiede zwischen der enzymatischen Ausstattung der Ratte und des Menschen sind jedoch beträchtlich [71, 97] und können zu unterschiedlichen Regulationsmechanismen führen.

Die Faktoren, die ein Kulturmodell mit in vivo gegebenen Verhältnissen vergleichbar machen, sollen an dieser Stelle nicht eingehend diskutiert werden. Es sei jedoch angemerkt, daß nach Durchsicht der Literatur kontroverse Meinungen über den Einfluß

von in vitro Faktoren auf die Regulation der AOEs gefunden wurden. Einige Studien unterstützen die Meinung, daß die AOEs in Zellkultur vergleichbar mit in vivo Bedingungen bleiben [98, 131, 133]. Andere Autoren beobachten veränderte Kapazitäten der AOEs in Kultur [119, 121, 134] und stellen somit die Vergleichbarkeit von in vivo und in vitro Studien in Frage.

Zur Gegenüberstellung mit der vorliegenden wurde keine Studie gefunden, die die GPX-Aktivität nach Ozonexposition unter in vitro Bedingungen beobachtet. Hinsichtlich des Versuchsaufbaues am ähnlichsten ist die Studie von Pietarinen-Runtti und Mitarbeitern [118]. Die Autoren fanden an menschlichen bronchialen BEAS-2B Epithelzellen, welche bezüglich der AOEs als Modell für bronchiale Epithelzellen dienen, weder eine Steigerung der mRNS (Katalase, GPX, CuZnSOD, MnSOD) noch der Aktivitäten der AOEs (Katalase, GPX, GR, CuZnSOD, MnSOD) nach 48 Stunden oxidativem Stress (95% O₂, 5% CO₂). Neben der abweichenden Gewebeart könnten andere Toxizitätsmechanismen bei Hyperoxie gegenüber einer Ozonexposition den Vergleich dieses Experimentes mit der vorliegenden Studie stören.

Wie im vorherigen Kapitel über die Regulation der Katalase angesprochen, wird davon ausgegangen, daß bei geringen H₂O₂-Konzentrationen der Glutathion-Redoxzyklus als Abwehrsystem rekrutiert wird [132]. Die tendenzielle Steigerung der GPX-Aktivität bei 24 Stunden 120 ppb Ozonbegasung könnte als Hinweis auf eine später folgende Hochregulation GSH-Redoxzykluses gedeutet werden. Dies wäre mit einer erneuten Studie zu belegen, bei der die Ozonexposition in vitro über mehr als 24 Stunden durchgeführt wird.

4.2.3. Glutathion-Reduktase

Bezüglich der GR-Aktivität konnte nach 24 Stunden Ozonexposition (120 ppb) ein nicht signifikanter Aktivitätsverlust von 1% beobachtet werden. Die Regulation der GR bleibt in dieser Studie vom Ozonkontakt unbeeinflusst.

Für die Regulation von GPX und GR nach Ozonexposition wurden in der Literatur

ähnliche Ergebnisse gefunden, was durch ihre funktionelle Kopplung bedingt sein dürfte [58]. Diesem Aspekt zum Trotz verhält sich die GR in der vorliegenden Studie anders als die GPX, die durch Ozonexposition eine tendenziell gesteigerte Aktivität aufwies. Bei fehlender Signifikanz beider Resultate könnte der Unterschied Folge systemischer Fehler sein. Möglich wäre auch, daß die GR-Aktivität, welche schon durch 24 Stunden Kultivierung ohne Ozoneinfluß um 49% signifikant angestiegen war, durch zusätzliche Ozonbegasung nicht weiter zu erhöhen war. Die GR katalysiert die Reduktion von oxidiertem GSH, welches bei der Abwehr oxidativen Stresses auch ohne die GPX eine Rolle spielt [135]. Mit dieser Aufgabe könnte die Kapazität der GR schon nach 24-stündiger Kultivierung und Inkubation ausgelastet sein.

4.2.4. Superoxid-Dismutase

Die SOD-Enzymaktivität wurde durch Ozonexposition (120 ppb über 24 Stunden) um 15% gesteigert. Diese Steigerung war nicht signifikant und kann daher nur als Tendenz gewertet werden.

In der gefundenen Literatur existieren einige Hinweise darauf, daß die SOD bei der antioxidativen Ozonabwehr in vivo eine Rolle spielt [Zusammenfassung bei 58]. Eine Aktivitätssteigerung im Lungenhomogenat der Ratte wurde allerdings erst nach 3 Tagen und 700 ppb Ozon gesehen [87]. Die spezie- [97] und gewebespezifischen Differenzen [88, 89] sowie die Unterschiede in Konzentration und Expositionsdauer [7, 88, 89] zwischen den in der Literatur auffindbaren Experimenten und der hier vorliegenden Studie liefern mögliche Erklärungen für die in der nasalen Mukosa des Menschen bei 120 ppb und 24 Stunden Ozonexposition nicht signifikant detektierbare Hochregulation der SOD.

Menschliche alveolare Typ II Zellen, kultiviert nach Alink und Mitarbeitern [98] zeigten bei 0.1 Mikrogramm Ozon über 2.5 Stunden auf 12 cm² einschichtiger Zellen eine Erhöhung der MnSOD-Aktivität. Der in Kapitel 4.2.1. angesprochene substanzielle Verlust an Katalase durch die Kulturbedingungen [119, 121] wurde in der selben Studie

auch für die CuZnSOD festgestellt. In kultivierten bronchialen Epithelzellen fand sich immunozytochemisch eine geringere Dichte an CuZnSOD als in frisch isolierten Zellen. Angenommen durch die Kultivierung nach Schierhorn und Mitarbeitern [23, 99] wäre ein Verlust an CuZn-SOD eingetreten, könnte dieser Verlust den Wert der SOD-Gesamtaktivität auf Proteinmasse verfälschen. Die Kultivierung bleibt also ein Unsicherheitsfaktor, soweit die Enzymmenge nicht vor der Aktivitätsbestimmung quantifiziert wird. Eine Alternative zur Bestimmung der Enzymaktivitäten auf mg Protein wäre die Berechnung auf μg DNS, wie sie von anderen Autoren praktiziert wird [88, 134]. Kennedy und Mitarbeiter [134] beobachteten beispielsweise an kultivierten alveolaren Typ II Zellen der neonatalen Ratte keine Veränderungen der AOE's auf Proteinmasse gerechnet nach 48 Stunden 95%iger Sauerstoffexposition. Umgerechnet auf DNS ergaben sich jedoch Aktivitätssteigerungen der GPX, GR und SOD als Antwort auf die Hyperoxie.

Abschließend bleibt noch anzumerken, daß allein durch die Kulturbedingungen die Aktivität der SOD signifikant um mehr als 100% gestiegen ist. Es bleibt fraglich, inwiefern eine weitere Steigerung der Aktivität durch Ozon als zusätzlichen Faktor möglich war.

4.2.5. Glutathion-S-Transferase

Die Aktivität der GST wurde unter Einfluß von 24 Stunden 120 ppb Ozon in der nasalen Mukosa des Menschen um 7% gesteigert, wobei diese Steigerung keine Signifikanz hatte und somit eine Regulation der GST durch Ozon nur vermutet werden kann.

An den distalen Bronchiolen der Ratte wurde in vivo eine Hochregulation der GST um das 1.5fache nach 90 Tagen bzw. 20 Monaten bei 1000 ppb Ozon beobachtet [88]. Dieses Ergebnis ist jedoch schon aufgrund der Ozonkonzentration, Expositionsdauer und der verschiedenartigen GST Aktivitäten im Bronchialbaum der Ratte nicht auf die nasale Mukosa des Menschen übertragbar [7, 88, 89, 136]. Für die GST wurde im Tierversuch bisher keine Aktivitätssteigerung nach kurzzeitiger Ozonkonzexposition

beobachtet [85]. Auch die Studie von Cassee und Mitarbeitern [96] fand im die Homogenat der Nasenschleimhaut von Ratten nach 3-tägiger intermittierender Ozonexposition auf 400 ppb keine signifikante Steigerung der GST-Aktivität. Das Ergebnis der vorliegenden Studie bestätigt somit den gegenwärtigen Stand der Forschung.

Experimentell ist beobachtet worden, daß die GST sich an der Detoxifikation von Ozoniden, Folgeprodukte der Ozonreaktion am Gewebe, beteiligt [64]. Dieser Entgiftungsweg scheint jedoch erst nach längerfristiger Exposition bei höheren Ozondosen beschränkt zu werden als sie in der vorliegenden Studie erreicht wurden.

Wie auch im Falle der GR und der SOD läßt sich feststellen, daß die GST-Aktivität in signifikantem Maße schon durch die Kultivierung um etwa 50% gestiegen ist. Offen bleibt auch hier die Frage nach den verbleibenden Möglichkeiten einer Aktivitätssteigerung durch additive Ozonexposition.

4.2.6. Geschlechterspezifische Unterschiede

In dieser Studie wurde kein statistischer Zusammenhang zwischen Geschlecht und prozentualer Veränderung der Enzymaktivitäten nach 24 Stunden und 120 ppb Ozon gefunden. Eine Ausnahme bildet die Katalase. Der Median der Aktivitätsänderungen betrug bei Männern (n=43) -2.2% und bei Frauen (n=23) +7.6 ($p < 0.05$), was statistisch aussagt, daß Patienten weiblichen Geschlechtes auf Ozon mit einer Aktivitätssteigerung der Katalase reagieren, während die männlichen Probanden die Katalase eher herabregulieren.

In verschiedenen anderen Studien [137, 138] wurden die Änderungen von Lungenfunktionsparametern und die subjektive Symptomatik als Reaktion auf in vivo Ozonexposition beim Menschen mit dem Geschlecht verglichen. Die Ozonkonzentrationen reichten von ambientalen in der Umgebung gemessenen Werten bis 400 ppb unter konstruierten Bedingungen. Bei keiner dieser Studien wurde ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen Männern und Frauen ermittelt. Zu der

schwach signifikanten Differenz auf biochemischer Ebene fehlt somit eine gleichsinnige Beobachtung am Makroorganismus.

Die Beantwortung des toxischen Ozonreizes mit gesteigerter Katalaseaktivität in der Nasenschleimhaut der Frau, nicht aber des Mannes, wäre ein Novum und müßte durch eine weitere Studie mit größerer Fallzahl bestätigt werden.

4.2.7. Unterschiede zwischen Rauchern und Nichtrauchern

In der aktuellen Literatur finden sich Hinweise darauf, daß gesunde Raucher bei 220 ppb und 4 Stunden Ozonexposition gekoppelt mit intermittierender körperlicher Betätigung eine geringere Verschlechterung der Lungenfunktionsparameter zu erwarten haben als Nichtraucher. Die inflammatorische Antwort, gemessen als die Anzahl inflammatorischer Zellen, proinflammatorische Zytokine (IL-6, IL-8) und Proteinmarker epithelialer Schädigung in der nasalen und bronchoalveolären Lavage, differierte allerdings nicht zwischen Rauchern und Nichtrauchern. Der Unterschied in der Verträglichkeit einer Ozondosis von 220 ppb über 4 Stunden, der zwischen Rauchern und Nichtrauchern beobachtet wurde, konnte somit auf biochemischer Ebene nicht mit den genannten Entzündungsparametern in der Lavage erklärt werden [11, 139].

Unterschiede in der Regulation der AOE's als Abwehrmechanismus konnten in der vorliegenden in vitro Studie am nasalen Epithel bei 120 ppb und 24 Stunden Ozonexposition nicht gemessen werden. Für den seitens oben genannter Autoren beobachteten Unterschied zwischen Rauchern und Nichtrauchern bezüglich der Änderung von Lungenfunktionsparametern durch Ozon können die Ergebnisse der vorliegenden Studie somit keine erklärenden Hinweise liefern.

4.2.8. Altersabhängige Unterschiede

McDonnell und Mitarbeitern [3] beobachteten an 485 Personen zwischen 18 und 35 ,

daß die Lungenfunktionseinschränkungen (FEV₁) nach Ozonexposition mit sinkendem Alter abnahmen. Plopper und Mitarbeiter [88] fanden an Ratten in vivo altersabhängige Unterschiede bei der Reaktion auf 90-tägige (500 und 1000 ppb) bzw. 20-monatige (120 und 1000 ppb) Ozonexposition. Die Unterschiede betrafen nur die SOD und GST und beschränkten sich auf distale Bronchiolen und die Bronchi lobarum. In der vorliegenden Studie konnte in vitro kein Hinweis auf eine mit dem Alter veränderte Regulation der AOE's nach Ozonexposition gefunden werden, was seinen Grund darin haben könnte, daß bei der benutzten Expositionskonzentration von 120 ppb und einer Expositionsdauer von 24 Stunden, wie bereits in den vorherigen Kapiteln diskutiert, andere Abwehrmechanismen als die AOE's den toxischen Reiz auf zellulärer Ebene beantworten.

4.3. Hochregulation der Superoxid-Dismutase bei GSTM1 - Defizienz

Am Modell der menschlichen Nasenschleimhaut wurde eine signifikante ($p=0.011$) Erhöhung der SOD-Aktivität um 22.4% nach 24 Stunden 120 ppb Ozonexposition bei $n=13$ GSTM1-defizienten Probanden gemessen. Bei Patienten mit genotypisch vorhandener GSTM1 ($n=9$) wurde keine signifikante Veränderung der SOD-Aktivität beobachtet. Dieses Ergebnis könnte auf eine modulierte Regulation der SOD bei GSTM1-Defizienz in der nasalen Mukosa des Menschen hinweisen und wirft die Frage nach möglichen Erklärungen für diese unterschiedliche Regulation auf.

4.3.1. SOD-Hochregulation durch Substratakkumulation bei GSTM1-Defizienz

Einige Karzinogene, wie beispielsweise die Epoxide polyzyklischer, aromatischer Hydrocarbone, gehören zu den Substraten der GSTM1. Der Zusammenhang, der zwischen Karzinogenese und GSTM1-Defizienz diskutiert wird [80], deutet darauf hin, daß die fehlende GSTM1-Aktivität zur Akkumulation von Substraten führt, die zumindest zum Teil karzinogene Potenz besitzen. Das gesamte Spektrum der von der GSTM1 entgifteten Substrate ist nicht bekannt. Man kann jedoch davon ausgehen, daß Substanzen mit oxidierender Potenz bei einer GSTM1-Defizienz intrazellulär akkumulieren und auf anderem Wege abgebaut werden müssen. Denkbar wäre auch, daß bei ausbleibender GSTM1-Aktivität über die Akkumulation von Substrat andere Entgiftungssysteme rekrutiert werden, deren Überlastung wiederum zur Anreicherung toxischer Stoffe in der Zelle führen könnte.

Im Kontext der Entgiftung ozoninduzierter Noxen, wurde die Funktion der GST beim Abbau von Methy-Lineolsäure-Ozonoiden, wichtigen Mediatoren der Zellschädigung nach Ozonexposition, beobachtet [64]. Sofern die GSTM1 bei diesem Entgiftungsweg eine Rolle spielt, könnte sich Substrat in Form von Ozonoiden anhäufen, welche durch zellschädigende Reaktionen Sauerstoffradikale produzieren und somit indirekt zur Hochregulation der SOD beitragen.

4.3.2. Beeinflussung der SOD-Aktivität über die Modulation der physiologischen Signaltransduktion

Unter Annahme einer Substratakkumulation bei GSTM1-Defizienz, wie im vorherigen Kapitel beschrieben, stellt sich die Frage, auf welchem Weg sich diese auf die Aktivität der SOD auswirken könnte. Die direkte Erhöhung der SOD-Aktivität würde durch

vermehrtes Aufkommen von Sauerstoffradikalen ($O_2\cdot^-$) induziert, welche das Substrat für die SOD darstellen. Eine andere Möglichkeit wäre die Vermittlung einer gesteigerten SOD-Aktivität durch Mediatoren, die von den akkumulierenden Substanzen induziert werden.

Die SOD-Enzymaktivität wird durch eine Vielzahl von Faktoren reguliert. Neben einigen Zytokinen [140-142] beeinflussen der intrazelluläre Redoxstatus, oxidativer Streß [140, 143] und hormonelle Einflüsse [144] die SOD-Aktivität. Die Wertigkeit der Faktoren differiert wiederum zwischen MnSOD und CuZnSOD [140, 141]. Diese Vielzahl von regulierenden Einflüssen auf die SOD-Aktivität macht deutlich, daß es sich um ein komplexes Regulationssystem handelt. Beispielhaft soll im Folgenden die Vermittlung durch Zytokine diskutiert werden.

TNF- α , IL-1, IL-6 sind proinflammatorischen Zytokine, die einerseits nach Ozonexposition von ambientaler Dosis im Atemwegsepithel assoziiert mit Makrophagen und anderen Zelltypen erhöht gefunden wurden [22, 23, Übersicht in 24] und andererseits experimentell in der Lage sind die MnSOD-Aktivität zu erhöhen [140-143]. Sollte sich der intrazelluläre oxidative Stress durch Ozon oder Ozonfolgeprodukte bei GSTM1-Defizienz erhöhen, könnte die verstärkte Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine (TNF- α , IL-1, IL-6) im Atemwegsepithel induziert werden und eine Hochregulation der SOD-Aktivität folgen.

Der Mediator TNF- α scheint eine wichtige Rolle bei der Vermittlung von fibrotischen Umbauprozessen nach oxidativem Stress im Atemwegsepithel zu übernehmen. Weller und Mitarbeiter [145] konnten vermehrt TNF- α und Mn-SOD an den Orten des fibrotischen Umbaues von interstitiellem Lungengewebe der Ratte feststellen, nachdem sie dieses für 8 Wochen 800 ppb Ozon und 14400 ppb Stickstoffdioxid ausgesetzt hatten.

Dieser oben aufgestellten Hypothese einer Substratakkumulation folgend würde die modulierte Enzymantwort bei GSTM1-Defizienz zu dauerhaft erhöhter TNF- α Ausschüttung führen, da der menschliche Organismus permanent oxidativen Reizen ausgesetzt ist. An bronchoalveolaren Zellen von ozonsensitiven Mäusen [146, 147] wurde gegenüber den Zellen ozonresistenter Mäuse eine signifikant erhöhte

Ausschüttung von TNF- α beobachtet, welche durch Silikoninjektion als oxidativen Reiz steigerbar war [148]. Es wäre durchaus interessant zu beleuchten, ob in der ozonsensitiven Population von Menschen [8, 14-16] ebenfalls eine vermehrte Ausschüttung von TNF- α zu beobachten ist, und ob diese mit der GSTM1-Defizienz in Zusammenhang stehen könnte. In einer neueren Studie von Kleeberger und Mitarbeitern [149] wurde bereits ein quantitative trait locus (QTL) für Ozonempfindlichkeit auf Chromosom 17 der Maus vermutet. Dieser QTR würde den TNF- α -kodierenden DNS-Abschnitt beinhalten. Die Autoren weisen jedoch darauf hin, daß es bei den Prädispositionsfaktoren für Ozonempfindlichkeit wahrscheinlich um eine komplexe Interaktion mehrerer Gene handelt.

Von Schierhorn und Mitarbeitern wurde an nasaler Schleimhaut des Menschen in vitro eine erhöhte Ausschüttung von TNF- α nach Exposition auf Ozon ambientaler Dosis gefunden [23]. Da in dieser Studie die selbe Methodik wie in der vorliegenden Studie benutzt wurde, könnte eine erhöhte TNF- α -Ausschüttung bei den 67 Patienten unserer Studie vermutet werden. Ob diese allerdings in einem Verhältnis zu der Defizienz an GSTM1 steht, kann nur durch eine erneute Versuchsreihe mit paralleler Bestimmung von GSTM1 und TNF- α geklärt werden.

4.3.3. Hochregulation der SOD durch unabhängige Faktoren

In chromosomaler Nähe zu einem genetischen Polymorphismus können Veränderungen benachbarter genetischer Strukturen beobachtet werden. Es kann sich hierbei um Strukturen handeln, die für die Expression bestimmter Moleküle verantwortlich sind oder aber im Sinne einer sogenannter „enhancer“- oder "suppressor"-Regionen die Expression von Genen regulieren, welche sich wiederum in größerer Entfernung auf demselben Chromosom befinden können.

Für den Nerve Growth Factor (NGF) und den Tissue Growth Factor-beta (TGF-beta) ist die chromosomale Nähe zum GSTM1-kodierenden Genlokus gegeben und es besteht im Sinne eines sogenannten „hot spots“ die Möglichkeit, daß regulierende Gene einer

der beiden Stoffe auf dem Abschnitt der DNS liegen, auf dem sich auch der GSTM1-Genlocus befindet. Im Zuge der Deletion von 18 kB in der Region 1p13.3 (Kapitel 1.2.5) bei GSTM1-Defizienz könnte eine dieser Strukturen geschädigt werden und die Expression von NGF oder TGF-beta modulieren. Ob es sich dabei um verstärkte, eingeschränkte oder fehlende Expression handeln würde, bleibt spekulativ.

TGF-beta ist unter anderem als regulierender Mediator für Zellproliferation, Differenzierung und Chemotaxis bekannt. Er spielt eine Rolle bei der Produktion extrazellulärer Matrixproteine und wird mit chronisch inflammatorischen und fibrotischen Krankheiten assoziiert [Überblick in 150]. Nach Ozonexposition wurde bis dato keine erhöhte TGF-beta-Konzentration gefunden [151], es wurde jedoch ein hemmender Effekt dieses Mediators auf die MnSOD-Aktivität beobachtet [141]. Hypothetisch könnte also eine weniger starke oder fehlende Expression des TGF-beta assoziiert mit der GSTM1-Deletion sich steigernd auf die SOD-Aktivität auswirken.

Für die vermehrte Freisetzung von NGF nach Ozonexposition gibt es ebenfalls keine Hinweise. In einer Studie von Li-XM und Mitarbeitern [152] wurde jedoch die vermehrte Expression von SOD-mRNS durch NGF beobachtet. Würde bei der GSTM1*0-Deletion ein "suppressor"-gen für NGF verloren gehen, so könnte NGF überexprimiert werden und konsekutiv eine Aktivitätssteigerung der SOD resultieren.

4.4. Nicht enzymatische Wege der antioxidativen Abwehr

Die 24-stündige Ozonexposition auf 120 ppb an kultivierten Zellen der nasalen Mukosa konnte unter den Bedingungen der vorliegenden Studie keine enzymatische antioxidative Antwort beobachtet werden. Es bleibt offen, ob bei höherer Konzentration oder längerer Exposition eine zelluläre Antwort der AOEs provoziert werden könnte oder ob die Abwehr geringer Ozondosen auf einem nichtenzymatischen Weg stattfindet.

Betrachtet man die physiologischen Bedingungen im Atemtrakt, so ist die Rolle der AOE's in vivo ebenfalls ungeklärt. Laut der Berechnungen von Pryor [25] erreicht das Ozonmolekül aufgrund seiner Reaktivität in vivo nur zu einem äußerst geringen Teil die Zelle. Der größere Anteil reagiert schon während des Kontaktes mit dem "lung lining fluid layer" (LLFL) zu Ozonfolgeprodukten. Dies ist vor allem in den oberen Atemwegen der Fall, wo der LLFL eine dickere Schicht darstellt als in den unteren Atemwegen. Entlang des gesamten Atemtraktes werden Harnsäure, Ascorbinsäure und GSH, der Effektivität nach in absteigender Reihenfolge, als Antioxidanzien beschrieben, die einen großen Teil des Ozon reaktiv absorbieren [153].

Durch Supplementierung von antioxidativen Vitaminen (Vitamin E, C, Beta-Carotene) wurde in vivo ein protektiver Effekt gegen die Ozonwirkung hinsichtlich der Lungenfunktion des Menschen erzielt [beispielsweise 154]. Diese aktuellen Ergebnisse deuten darauf hin, daß in vivo in der menschliche Lunge intrazelluläre enzymatische Antioxidanzien nicht die tragende Rolle bei der Abwehr ozonvermittelter Toxizität übernehmen.

An der nasalen Mukosa des Menschen wurde ein Verbrauch an Urat in der nasalen Lavage nach in vitro Ozonexposition beobachtet [95]. Die Bedeutung dieses Antioxidanzes für die lokale Abwehr des Ozonreizes konnte in einer anderen Studie von Mudway und Mitarbeitern [155] bestätigt werden. Auch diese Ergebnisse weisen darauf hin, daß ein bedeutsamer Teil des Ozones schon im ELF der Nasenschleimhaut detoxifiziert wird. Es ist daher ungewiß, ob die kultivierte, nicht durch das ELF geschützte Nasenschleimhaut auf ambientale Ozonkonzentrationen in adäquater Form reagieren kann und die in vitro Ergebnisse mit den Verhältnissen im Atemtrakt vergleichbar bleiben.

5. Literaturverzeichnis

1. Mustafa, M.G., *Biochemical basis of ozone toxicity*. Free Radic Biol Med, 1990. **9**(3): p. 245-65.
2. Horstman, D.H., *et al.*, *Ozone concentration and pulmonary response relationships for 6.6-hour exposures with five hours of moderate exercise to 0.08, 0.10, and 0.12 ppm*. Am Rev Respir Dis, 1990. **142**(5): p. 1158-63.
3. McDonnell, W.F., *et al.*, *Ozone-induced respiratory symptoms: exposure-response models and association with lung function*. Eur Respir J, 1999. **14**(4): p. 845-53.
4. McDonnell, W.F., *et al.*, *Prediction of ozone-induced FEV1 changes. Effects of concentration, duration, and ventilation*. Am J Respir Crit Care Med, 1997. **156**(3 Pt 1): p. 715-22.
5. Folinsbee, L.J., *et al.*, *Respiratory responses to repeated prolonged exposure to 0.12 ppm ozone*. Am J Respir Crit Care Med, 1994. **149**(1): p. 98-105.
6. Folinsbee, L.J., *Effects of ozone exposure on lung function in man: a review*. Rev Environ Health, 1981. **3**(3): p. 211-40.
7. Adams, W.C., W.M. Savin, and A.E. Christo, *Detection of ozone toxicity during continuous exercise via the effective dose concept*. J Appl Physiol, 1981. **51**(2): p. 415-22.
8. Devlin, R.B., *Identification of subpopulations that are sensitive to ozone exposure: use of end points currently available and potential use of laboratory-based end points under development*. Environ Health Perspect, 1993. **101 Suppl 4**: p. 225-30.
9. Kleeberger, S.R., *Understanding biological variability in susceptibility to respiratory disease: animal models*. Pharmacogenetics, 1991. **1**(2): p. 114-8.

10. Seal, E., Jr., W.F. McDonnell, and D.E. House, *Effects of age, socioeconomic status, and menstrual cycle on pulmonary response to ozone*. Arch Environ Health, 1996. **51**(2): p. 132-7.
11. Frampton, M.W., *et al.*, *Effects of ozone on normal and potentially sensitive human subjects. Part II: Airway inflammation and responsiveness to ozone in nonsmokers and smokers*. Res Rep Health Eff Inst, 1997(78): p. 39-72; discussion 81-99.
12. Prows, D.R., *et al.*, *Genetic analysis of ozone-induced acute lung injury in sensitive and resistant strains of mice*. Nat Genet, 1997. **17**(4): p. 471-4.
13. Scannell, C., *et al.*, *Greater ozone-induced inflammatory responses in subjects with asthma*. Am J Respir Crit Care Med, 1996. **154**(1): p. 24-9.
14. Balmes, J.R., *et al.*, *Ozone-induced decrements in FEV1 and FVC do not correlate with measures of inflammation*. Am J Respir Crit Care Med, 1996. **153**(3): p. 904-9.
15. Holz, O., *et al.*, *Ozone-induced airway inflammatory changes differ between individuals and are reproducible*. Am J Respir Crit Care Med, 1999. **159**(3): p. 776-84.
16. Mudway, I.S. and F.J. Kelly, *Ozone and the lung: a sensitive issue*. Mol Aspects Med, 2000. **21**(1-2): p. 1-48.
17. Koren, H.S., *et al.*, *Ozone-induced inflammation in the lower airways of human subjects*. Am Rev Respir Dis, 1989. **139**(2): p. 407-15.
18. Zhao, Q., *et al.*, *Chemokine regulation of ozone-induced neutrophil and monocyte inflammation*. Am J Physiol, 1998. **274**(1 Pt 1): p. L39-46.
19. Harkema, J.R., *et al.*, *Long-lasting effects of chronic ozone exposure on rat nasal epithelium*. Am J Respir Cell Mol Biol, 1999. **20**(3): p. 517-29.
20. Nishiyama, H., *et al.*, *Neuropeptides mediate the ozone-induced increase in the permeability of the tracheal mucosa in guinea pigs*. Am J Physiol, 1998. **275**(2 Pt 1): p. L231-8.

21. Harkema, J.R., *et al.*, *Response of the macaque nasal epithelium to ambient levels of ozone. A morphologic and morphometric study of the transitional and respiratory epithelium.* Am J Pathol, 1987. **128**(1): p. 29-44.
22. Schierhorn, K., *et al.*, *Ozone-induced augmentation of eicosanoid metabolism in human nasal mucosa in vitro.* Int Arch Allergy Immunol, 1997. **113**(1-3): p. 312-5.
23. Schierhorn, K., *et al.*, *Influence of ozone and nitrogen dioxide on histamine and interleukin formation in a human nasal mucosa culture system.* Am J Respir Cell Mol Biol, 1999. **20**(5): p. 1013-9.
24. Leikauf, G.D., *et al.*, *Airway epithelial cell responses to ozone injury.* Environ Health Perspect, 1995. **103 Suppl 2**: p. 91-5.
25. Pryor, W.A., *How far does ozone penetrate into the pulmonary air/tissue boundary before it reacts?* Free Radic Biol Med, 1992. **12**(1): p. 83-8.
26. Santrock, J., R.A. Gorski, and J.F. O'Gara, *Products and mechanism of the reaction of ozone with phospholipids in unilamellar phospholipid vesicles.* Chem Res Toxicol, 1992. **5**(1): p. 134-41.
27. Pryor, W.A., B. Das, and D.F. Church, *The ozonation of unsaturated fatty acids: aldehydes and hydrogen peroxide as products and possible mediators of ozone toxicity.* Chem Res Toxicol, 1991. **4**(3): p. 341-8.
28. Kafoury, R.M., *et al.*, *Lipid ozonation products activate phospholipases A2, C, and D.* Toxicol Appl Pharmacol, 1998. **150**(2): p. 338-49.
29. Leikauf, G.D., *et al.*, *Ozonolysis products of membrane fatty acids activate eicosanoid metabolism in human airway epithelial cells.* Am J Respir Cell Mol Biol, 1993. **9**(6): p. 594-602.
30. Dahlen, S.E., *et al.*, *Leukotrienes are potent constrictors of human bronchi.* Nature, 1980. **288**(5790): p. 484-6.
31. Samuelsson, B., *An elucidation of the arachidonic acid cascade. Discovery of prostaglandins, thromboxane and leukotrienes.* Drugs, 1987. **33 Suppl 1**: p. 2-9.
32. Brunori, M. and G. Rotilio, *Biochemistry of oxygen radical species.* Methods Enzymol, 1984. **105**: p. 22-35.

33. Wharton, D.C. and Q.H. Gibson, *Studies of the oxygenated compound of cytochrome oxidase*. J Biol Chem, 1968. **243**(4): p. 702-6.
34. Freeman, B.A. and J.D. Crapo, *Biology of disease: free radicals and tissue injury*. Lab Invest, 1982. **47**(5): p. 412-26.
35. Cross, C.E., *et al.*, *Oxygen radicals and human disease [clinical conference]*. Ann Intern Med, 1987. **107**(4): p. 526-45.
36. Halliwell, B. and J.M. Gutteridge, *Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease*. Biochem J, 1984. **219**(1): p. 1-14.
37. Roehm, J.N., J.G. Hadley, and D.B. Menzel, *Oxidation of unsaturated fatty acids by ozone and nitrogen dioxide. A common mechanism of action*. Arch Environ Health, 1971. **23**(2): p. 142-8.
38. Jocelyn, *Biochemistry of the SH group*. London: Academic Press, 1972.
39. Phillips, P.G. and M.F. Tsan, *Hyperoxia causes increased albumin permeability of cultured endothelial monolayers*. J Appl Physiol, 1988. **64**(3): p. 1196-202.
40. Heffner, J.E. and J.E. Repine, *Pulmonary strategies of antioxidant defense*. Am Rev Respir Dis, 1989. **140**(2): p. 531-54.
41. Webster, N.R. and J.F. Nunn, *Molecular structure of free radicals and their importance in biological reactions*. Br J Anaesth, 1988. **60**(1): p. 98-108.
42. Reid, T.J.d., *et al.*, *Structure and heme environment of beef liver catalase at 2.5 Å resolution*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1981. **78**(8): p. 4767-71.
43. Chance, B., H. Sies, and A. Boveris, *Hydroperoxide metabolism in mammalian organs*. Physiol Rev, 1979. **59**(3): p. 527-605.
44. Hartz, J.W., S. Funakoshi, and H.F. Deutsch, *The levels of superoxide dismutase and catalase in human tissues as determined immunochemically*. Clin Chim Acta, 1973. **46**(2): p. 125-32.
45. Sies, H., *Antioxidant activity in cells and organs*. Am Rev Respir Dis, 1987. **136**(2): p. 478-80.
46. Maddipati, K.R., C. Gasparski, and L.J. Marnett, *Characterization of the hydroperoxide-reducing activity of human plasma*. Arch Biochem Biophys, 1987. **254**(1): p. 9-17.

47. Suttorp, N., W. Toepfer, and L. Roka, *Antioxidant defense mechanisms of endothelial cells: glutathione redox cycle versus catalase*. Am J Physiol, 1986. **251**(5 Pt 1): p. C671-80.
48. Ross, D., K. Norbeck, and P. Moldeus, *The generation and subsequent fate of glutathionyl radicals in biological systems*. J Biol Chem, 1985. **260**(28): p. 15028-32.
49. Tsan, M.F., et al., *Enhancement of intracellular glutathione protects endothelial cells against oxidant damage*. Biochem Biophys Res Commun, 1985. **127**(1): p. 270-6.
50. Fridovich, I., *Superoxide radical: an endogenous toxicant*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 1983. **23**: p. 239-57.
51. Slot, J.W., et al., *Intracellular localization of the copper-zinc and manganese superoxide dismutases in rat liver parenchymal cells*. Lab Invest, 1986. **55**(3): p. 363-71.
52. Fridovich, I., *Superoxide dismutases*. Annu Rev Biochem, 1975. **44**: p. 147-59.
53. Smith, P. and D. Heath, *Paraquat*. CRC Crit Rev Toxicol, 1976. **4**(4): p. 411-45.
54. Marklund, S.L., *Extracellular superoxide dismutase in human tissues and human cell lines*. J Clin Invest, 1984. **74**(4): p. 1398-403.
55. Blum, *Inactivation glutathion peroxidase by superoxide radical*. Arch Biochem Biophys, 1985. **240**: p. 500-8.
56. Kono, Y. and I. Fridovich, *Superoxide radical inhibits catalase*. J Biol Chem, 1982. **257**(10): p. 5751-4.
57. Scott, M.D., S.R. Meshnick, and J.W. Eaton, *Superoxide dismutase amplifies organismal sensitivity to ionizing radiation*. J Biol Chem, 1989. **264**(5): p. 2498-501.
58. Quinlan, T., S. Spivack, and B.T. Mossman, *Regulation of antioxidant enzymes in lung after oxidant injury*. Environ Health Perspect, 1994. **102 Suppl 2**: p. 79-87.
59. Tsuchida, S. and K. Sato, *Glutathione transferases and cancer*. Crit Rev Biochem Mol Biol, 1992. **27**(4-5): p. 337-84.

60. Mannervik, B., *et al.*, *Nomenclature for human glutathione transferases [letter]*. *Biochem J*, 1992. **282**(Pt 1): p. 305-6.
61. Mannervik, B. and U.H. Danielson, *Glutathione transferases--structure and catalytic activity*. *CRC Crit Rev Biochem*, 1988. **23**(3): p. 283-337.
62. Jakoby, W.B., *The glutathione S-transferases: a group of multifunctional detoxification proteins*. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol*, 1978. **46**: p. 383-414.
63. Coles, B. and B. Ketterer, *The role of glutathione and glutathione transferases in chemical carcinogenesis*. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 1990. **25**(1): p. 47-70.
64. Vos, R.M., *et al.*, *Methyl linoleate ozonide as a substrate for rat glutathione S-transferases: reaction pathway and isoenzyme selectivity*. *Chem Biol Interact*, 1989. **69**(2-3): p. 269-78.
65. Listowsky, I., *et al.*, *Intracellular binding and transport of hormones and xenobiotics by glutathione-S-transferases*. *Drug Metab Rev*, 1988. **19**(3-4): p. 305-18.
66. Zucker, S.D., *et al.*, *Influence of glutathione S-transferase B (ligandin) on the intermembrane transfer of bilirubin. Implications for the intracellular transport of nonsubstrate ligands in hepatocytes*. *J Clin Invest*, 1995. **96**(4): p. 1927-35.
67. Prohaska, J.R. and H.E. Ganther, *Glutathione peroxidase activity of glutathione-s-transferases purified from rat liver*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1976. **76**(2): p. 437-45.
68. Awasthi, Y.C., R. Sharma, and S.S. Singhal, *Human glutathione S-transferases*. *Int J Biochem*, 1994. **26**(3): p. 295-308.
69. Krishna, N.S., T.V. Getchell, and M.L. Getchell, *Differential expression of alpha, mu, and pi classes of glutathione S-transferases in chemosensory mucosae of rats during development*. *Cell Tissue Res*, 1994. **275**(3): p. 435-50.
70. Seidegard, J. and R.W. Pero, *The genetic variation and the expression of human glutathione transferase mu*. *Klin Wochenschr*, 1988. **66 Suppl 11**: p. 125-6.
71. Aceto, A., *et al.*, *Glutathione transferases in human nasal mucosa*. *Arch Toxicol*, 1989. **63**(6): p. 427-31.

72. Krishna, N.S., *et al.*, *Age- and gender-related trends in the expression of glutathione S-transferases in human nasal mucosa*. *Ann Otol Rhinol Laryngol*, 1995. **104**(10 Pt 1): p. 812-22.
73. Ross, V.L., P.G. Board, and G.C. Webb, *Chromosomal mapping of the human Mu class glutathione S-transferases to 1p13*. *Genomics*, 1993. **18**(1): p. 87-91.
74. Widersten, M., *et al.*, *Heterologous expression of the allelic variant mu-class glutathione transferases mu and psi*. *Biochem J*, 1991. **276**(Pt 2): p. 519-24.
75. Seidegard, J., *et al.*, *Hereditary differences in the expression of the human glutathione transferase active on trans-stilbene oxide are due to a gene deletion*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1988. **85**(19): p. 7293-7.
76. Xu, S., *et al.*, *Characterization of the human class Mu glutathione S-transferase gene cluster and the GSTM1 deletion*. *J Biol Chem*, 1998. **273**(6): p. 3517-27.
77. Board, P., *et al.*, *Genetic heterogeneity of the human glutathione transferases: a complex of gene families*. *Pharmacol Ther*, 1990. **48**(3): p. 357-69.
78. Warholm, M., C. Guthenberg, and B. Mannervik, *Molecular and catalytic properties of glutathione transferase mu from human liver: an enzyme efficiently conjugating epoxides*. *Biochemistry*, 1983. **22**(15): p. 3610-7.
79. Kihara, M. and K. Noda, *Lung cancer risk of GSTM1 null genotype is dependent on the extent of tobacco smoke exposure*. *Carcinogenesis*, 1994. **15**(2): p. 415-8.
80. Nakajima, T., *et al.*, *Expression and polymorphism of glutathione S-transferase in human lungs: risk factors in smoking-related lung cancer*. *Carcinogenesis*, 1995. **16**(4): p. 707-11.
81. van Bree, L., M. Marra, and P.J. Rombout, *Differences in pulmonary biochemical and inflammatory responses of rats and guinea pigs resulting from daytime or nighttime, single and repeated exposure to ozone*. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1992. **116**(2): p. 209-16.
82. Rietjens, I.M., *et al.*, *Glutathione pathway enzyme activities and the ozone sensitivity of lung cell populations derived from ozone exposed rats*. *Toxicology*, 1985. **37**(3-4): p. 205-14.

83. Jackson, R.M. and L. Frank, *Ozone-induced tolerance to hyperoxia in rats*. Am Rev Respir Dis, 1984. **129**(3): p. 425-9.
84. Elsayed, N.M., *et al.*, *Effect of dietary vitamin E level on the biochemical response of rat lung to ozone inhalation*. Drug Nutr Interact, 1988. **5**(4): p. 373-86.
85. Ichinose, T., *et al.*, *Biochemical effects of combined gases of nitrogen dioxide and ozone. II. Species differences in lipid peroxides and antioxidative protective enzymes in the lungs*. Toxicol Lett, 1988. **42**(2): p. 167-76.
86. Lee, J.S., M.G. Mustafa, and A.A. Afifi, *Effects of short-term, single and combined exposure to low-level NO₂ and O₃ on lung tissue enzyme activities in rats*. J Toxicol Environ Health, 1990. **29**(3): p. 293-305.
87. Rahman, I., L.B. Clerch, and D. Massaro, *Rat lung antioxidant enzyme induction by ozone*. Am J Physiol, 1991. **260**(6 Pt 1): p. L412-8.
88. Plopper, C.G., *et al.*, *Dose-dependent tolerance to ozone. IV. Site-specific elevation in antioxidant enzymes in the lungs of rats exposed for 90 days or 20 months*. Toxicol Appl Pharmacol, 1994. **127**(1): p. 124-31.
89. Duan, X., A.R. Buckpitt, and C.G. Plopper, *Variation in antioxidant enzyme activities in anatomic subcompartments within rat and rhesus monkey lung*. Toxicol Appl Pharmacol, 1993. **123**(1): p. 73-82.
90. Gertner, A., *et al.*, *Effects of ozone on peripheral lung reactivity*. J Appl Physiol, 1983. **55**(3): p. 777-84.
91. Kleeberger, S.R., *et al.*, *The role of mediators in the response of the canine peripheral lung to 1 ppm ozone*. Am Rev Respir Dis, 1988. **137**(2): p. 321-5.
92. Kleeberger, S.R., *et al.*, *Mast cells modulate acute ozone-induced inflammation of the murine lung*. Am Rev Respir Dis, 1993. **148**(5): p. 1284-91.
93. Shields, R.L. and W.M. Gold, *Effect of inhaled ozone on lung histamine in conscious guinea pigs*. Environ Res, 1987. **42**(2): p. 435-45.
94. Miller, F.J., *et al.*, *Nasopharyngeal removal of ozone in rabbits and guinea pigs*. Toxicology, 1979. **14**(3): p. 273-81.

95. Housley, D.G., *et al.*, *Depletion of urate in human nasal lavage following in vitro ozone exposure*. Int J Biochem Cell Biol, 1995. **27**(11): p. 1153-9.
96. Cassee, F.R. and V.J. Feron, *Biochemical and histopathological changes in nasal epithelium of rats after 3-day intermittent exposure to formaldehyde and ozone alone or in combination*. Toxicol Lett, 1994. **72**(1-3): p. 257-68.
97. Bryan, C.L. and S.G. Jenkinson, *Species variation in lung antioxidant enzyme activities*. J Appl Physiol, 1987. **63**(2): p. 597-602.
98. Alink, G.M., *et al.*, *Toxic effects of ozone on human cells in vitro, exposed by gas diffusion through teflon film*. Toxicology, 1980. **17**(2): p. 209-18.
99. Schierhorn, K., *et al.*, *Gelatin sponge-supported histoculture of human nasal mucosa*. In Vitro Cell Dev Biol Anim, 1995. **31**(3): p. 215-20.
100. Lowry, *Protein measurement with the folin phenol reagent*. J Biol Chem, 1951. **193**: p. 265-275.
101. Smith, P.K., *et al.*, *Measurement of protein using bicinchoninic acid [published erratum appears in Anal Biochem 1987 May 15;163(1):279]*. Anal Biochem, 1985. **150**(1): p. 76-85.
102. Beers, R.F.J. and I.W. Sizer, Journal of Biological Chemistry, 1952. **195**: p. 133-140.
103. Stern, K.G., Journal of Biological Chemistry, 1937. **121**: p. 561-572.
104. Wendel, A., *Enzymatic Basis of of Detoxification*. Academic press, NY, 1980. **1**: p. 333.
105. Mavis, R.D. and E. Stellwagen, *Purification and Subunit Structure of Glutathione Reductase from Bakers' Yeast*. Journal of Biological Chemistry, 1968. **243**(4): p. 809-814.
106. Racker, E., J Biol Chem, 1955. **217**: p. 855.
107. Stallings, W., *The Three-Dimensional Structure of Iron Superoxide Dismutase: Kinetics and Structural Comparisons with Cu/Zn and Mn Dismutases*. Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology. 1984, Berlin.: Walter de Gruyter & Co. 779-792.

108. Nebot, C., *et al.*, *Spectrophotometric assay of superoxide dismutase activity based on the activated autoxidation of a tetracyclic catechol*. *Anal Biochem*, 1993. **214**(2): p. 442-51.
109. Beyer, W., J. Imlay, and I. Fridovich, *Superoxide dismutases*. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, 1991. **40**: p. 221-53.
110. Habig, W.H., M.J. Pabst, and W.B. Jakoby, *Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation*. *J Biol Chem*, 1974. **249**(22): p. 7130-9.
111. Pabst, M.J., W.H. Habig, and W.B. Jakoby, *Glutathione S-transferase A. A novel kinetic mechanism in which the major reaction pathway depends on substrate concentration*. *J Biol Chem*, 1974. **249**(22): p. 7140-7.
112. Shore, P.A., *Release of histamine from stomach by vagus-stimulating drugs: association with gastric acid secretion*. *Fed Proc*, 1965. **24**(6): p. 1322-5.
113. Siraganian, R.P., *An automated continuous-flow system for the extraction and fluorometric analysis of histamine*. *Anal Biochem*, 1974. **57**(2): p. 383-94.
114. Brockmoller, J., *et al.*, *Correlation between trans-stilbene oxide-glutathione conjugation activity and the deletion mutation in the glutathione S-transferase class mu gene detected by polymerase chain reaction*. *Biochem Pharmacol*, 1992. **43**(3): p. 647-50.
115. Bertram, S. and H.G. Gassen, *Gentechnische Methoden*, Stuttgart: Gustav Fischer Verlag. 35.
116. McLellan, R.A., *et al.*, *Characterization of a human glutathione S-transferase mu cluster containing a duplicated GSTM1 gene that causes ultrarapid enzyme activity*. *Molecular Pharmacology*, 1997. **52**(6): p. 958-65.
117. Rietjens, I.M., G.M. Alink, and R.M. Vos, *The role of glutathione and changes in thiol homeostasis in cultured lung cells exposed to ozone*. *Toxicology*, 1985. **35**(3): p. 207-17.

118. Pietarinen Runtti, P., *et al.*, *Antioxidant enzyme regulation and resistance to oxidants of human bronchial epithelial cells cultured under hyperoxic conditions.* Am J Respir Cell Mol Biol, 1998. **19**(2): p. 286-92.
119. Kinnula, V.L., *et al.*, *Primary and immortalized (BEAS 2B) human bronchial epithelial cells have significant antioxidative capacity in vitro.* Am J Respir Cell Mol Biol, 1994. **11**(5): p. 568-76.
120. Johansson, L.H. and L.A. Borg, *A spectrophotometric method for determination of catalase activity in small tissue samples.* Anal Biochem, 1988. **174**(1): p. 331-6.
121. Kinnula, V.L., *et al.*, *Oxidants and antioxidants in alveolar epithelial type II cells: in situ, freshly isolated, and cultured cells.* Am J Physiol, 1992. **262**(1 Pt 1): p. L69-77.
122. Wu, R., *et al.*, *Growth and differentiation of human nasal epithelial cells in culture. Serum-free, hormone-supplemented medium and proteoglycan synthesis.* Am Rev Respir Dis, 1985. **132**(2): p. 311-20.
123. Beutler, E., *Glutathione Peroxidase.* Red Cell Metabolism: A Manual of Biochemical Methods. 1975, New York: Grune & Stratton. 71-73.
124. Lawrence, R.A. and R.F. Burk, *Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver.* Biochem Biophys Res Commun, 1976. **71**(4): p. 952-8.
125. Bayoumi, R.A. and S.B. Rosalki, *Evaluation of methods of coenzyme activation of erythrocyte enzymes for detection of deficiency of vitamins B1, B2, and B6.* Clin Chem, 1976. **22**(3): p. 327-35.
126. McCord, J.M. and I. Fridovich, *Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein).* J Biol Chem, 1969. **244**(22): p. 6049-55.
127. Forman, H.J., and A. B. Fischer, *Antioxidant enzymes of rat granular pneumocytes: constitutive level and effects of hyperoxia.* Lab. Invest., 1981. **45**: p. 1-6.
128. Crapo, J.D., J.M. McCord, and I. Fridovich, *Preparation and assay of superoxide dismutases.* Methods Enzymol, 1978. **53**: p. 382-93.

129. Sjostrom, K. and J.D. Crapo, *Structural and biochemical adaptive changes in rat lungs after exposure to hypoxia*. Lab Invest, 1983. **48**(1): p. 68-79.
130. Oberley, L.W. and D.R. Spitz, *Assay of superoxide dismutase activity in tumor tissue*. Methods Enzymol, 1984. **105**: p. 457-64.
131. Morgan, D.L. and D.G. Wenzel, *Free radical species mediating the toxicity of ozone for cultured rat lung fibroblasts*. Toxicology, 1985. **36**(2-3): p. 243-51.
132. Kinnula, V.L., et al., *Antioxidant defense mechanisms in cultured pleural mesothelial cells*. Am J Respir Cell Mol Biol, 1992. **7**(1): p. 95-103.
133. Cheek, J.M., et al., *Ozone injury to alveolar epithelium in vitro does not reflect loss of antioxidant defenses*. Toxicol Appl Pharmacol, 1994. **125**(1): p. 59-69.
134. Kennedy, K.A., L.S. Crouch, and J.B. Warshaw, *Effect of hyperoxia on antioxidants in neonatal rat type II cells in vitro and in vivo*. Pediatr Res, 1989. **26**(5): p. 400-3.
135. Ketterer, B., *Detoxication reactions of glutathione and glutathione transferases*. Xenobiotica, 1986. **16**(10-11): p. 957-73.
136. Mannervik, B., *The isoenzymes of glutathione transferase*. Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol, 1985. **57**: p. 357-417.
137. Weinmann, G.G., et al., *Evidence for ozone-induced small-airway dysfunction: lack of menstrual-cycle and gender effects*. Am J Respir Crit Care Med, 1995. **152**(3): p. 988-96.
138. Kunzli, N., et al., *Association between lifetime ambient ozone exposure and pulmonary function in college freshmen--results of a pilot study*. Environ Res, 1997. **72**(1): p. 8-23.
139. Frampton, M.W., et al., *Ozone responsiveness in smokers and nonsmokers*. Am J Respir Crit Care Med, 1997. **155**(1): p. 116-21.
140. Isoherranen, K., et al., *Regulation of copper/zinc and manganese superoxide dismutase by UVB irradiation, oxidative stress and cytokines*. J Photochem Photobiol B, 1997. **40**(3): p. 288-93.

141. Marklund, S.L., *Regulation by cytokines of extracellular superoxide dismutase and other superoxide dismutase isoenzymes in fibroblasts*. J Biol Chem, 1992. **267**(10): p. 6696-701.
142. Visner, G.A., et al., *Regulation of manganese superoxide dismutase by lipopolysaccharide, interleukin-1, and tumor necrosis factor. Role in the acute inflammatory response*. J Biol Chem, 1990. **265**(5): p. 2856-64.
143. Warner, B.B., et al., *Redox regulation of manganese superoxide dismutase*. Am J Physiol, 1996. **271**(1 Pt 1): p. L150-8.
144. Pereira, B., et al., *Hormonal regulation of superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase activities in rat macrophages*. Biochem Pharmacol, 1995. **50**(12): p. 2093-8.
145. Weller, B.L., H. Witschi, and K.E. Pinkerton, *Quantitation and localization of pulmonary manganese superoxide dismutase and tumor necrosis factor alpha following exposure to ozone and nitrogen dioxide*. Toxicol Sci, 2000. **54**(2): p. 452-61.
146. Kleeberger, S.R., R.C. Levitt, and L.Y. Zhang, *Susceptibility to ozone-induced inflammation. I. Genetic control of the response to subacute exposure*. Am J Physiol, 1993. **264**(1 Pt 1): p. L15-20.
147. Kleeberger, S.R., et al., *A genetic model for evaluation of susceptibility to ozone-induced inflammation*. Am J Physiol, 1990. **258**(6 Pt 1): p. L313-20.
148. Ohtsuka, Y., et al., *Increased susceptibility to silicosis and TNF-alpha production in C57BL/6J mice*. Am J Respir Crit Care Med, 1995. **152**(6 Pt 1): p. 2144-9.
149. Kleeberger, S.R., et al., *Linkage analysis of susceptibility to ozone-induced lung inflammation in inbred mice*. Nat Genet, 1997. **17**(4): p. 475-8.
150. Pelton, R.W. and H.L. Moses, *The beta-type transforming growth factor. Mediators of cell regulation in the lung*. Am Rev Respir Dis, 1990. **142**(6 Pt 2): p. S31-5.
151. Lang, D.S., et al., *Interactions between human bronchoepithelial cells and lung fibroblasts after ozone exposure in vitro*. Toxicol Lett, 1998. **96-97**(###): p. 13-24.

152. Li, X.M., *et al.*, *L-deprenyl potentiates NGF-induced changes in superoxide dismutase mRNA in PC12 cells*. J Neurosci Res, 1998. **53**(2): p. 235-8.
153. Mudway, I.S. and F.J. Kelly, *Modeling the interactions of ozone with pulmonary epithelial lining fluid antioxidants*. Toxicol Appl Pharmacol, 1998. **148**(1): p. 91-100.
154. Romieu, I., *et al.*, *Antioxidant supplementation and respiratory functions among workers exposed to high levels of ozone*. Am J Respir Crit Care Med, 1998. **158**(1): p. 226-32.
155. Mudway, I.S., *et al.*, *Antioxidant consumption and repletion kinetics in nasal lavage fluid following exposure of healthy human volunteers to ozone*. Eur Respir J, 1999. **13**(6): p. 1429-38.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. G. Kunkel

für die Überlassung des Themas, die Bereitstellung der Arbeitsmaterialien und Gerätschaften sowie für Kritik und Verbesserungsvorschläge bei der Korrektur meiner Arbeit.

Herrn Dr. K. Jurgovsky

für die freundliche Einarbeitung in das Thema, die biochemischen Labortechniken und ebenfalls für die Hilfestellung bei der Korrektur meiner Arbeit.

Frau K. Schierhorn

für die Bereitstellung der Daten bezüglich der Histaminausschüttung der Nasenschleimhautproben und für die arbeitsintensive Entwicklung des Kulturmodelles, welches den Vergleich von ozonexponierten zu CO₂-exponierten Gewebeproben möglich machte.

Lebenslauf

Ralf Otto-Knapp

Geb.: 0704.1972 in Bünde

- Juli 1991 Allgemeine Hochschulreife
am Ratsgymnasium Rotenburg / Wümme
- 08.1991 -04.1992 Chemielaborant
im Limnologischen Institut Dr. Nowack (Ottersberg)
- 05.1992 -09.1993 Zivildienst in den Behindertenwerkstätten
der Lebenshilfe e.V. (Rotenburg / Wümme)
- 10.1993 Beginn des Studiums der Humanmedizin
an der Freien Universität zu Berlin
- 08.1995 Physikum
- 04.1996 Wechsel an die Humboldt Universität zu Berlin
- 08.1996 1. Staatsexamen
- 04.1999 Urlaubssemester für die labortechnischen Taätigkeiten
im Rahmen der vorliegenden Dissertation
- 03.2000 2.Staatsexamen
- 04.2000 Praktisches Jahres (Innere Med., Chirurgie, Anästhesie)
- 11.2000 Einreichung der Dissertationsschrift
- 05.2001 3. Staatsexamen
- 06.2001 Disputation der vorliegenden Arbeit und Erlangung
des doctor medicinae magna cum laude

Eidstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Ralf Otto-Knapp, geb.: 07.04.1972 in Bünde, an Eides Statt, daß die vorliegende Dissertationsschrift von mir selbst und ohne (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst wurde, auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten darstellt und die benutzten Hilfsmittel sowie die Literatur vollständig angegeben sind.