

7 Thesen

1. Das Lungengewebe ist auf Grund der besonderen Funktion einer Vielzahl von Schadstoffen ausgesetzt. Dabei spielen oxidativ wirkende Gase, Mineralfasern oder Promotoren von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) bei der Entstehung verschiedenster Krankheitsbilder eine besondere Rolle. Die antioxidativen Enzyme wie Katalase und Superoxiddismutasen (SOD) vermitteln einen Teil der antioxidativen Abwehr auf radikalische Schädigungsprozesse.
2. Die absoluten Aktivitäten von Katalase und Cu/Zn-Superoxiddismutase waren im Lungengewebe der Ratte bedeutend niedriger als im Lebergewebe (Katalase 1 : 200; Cu/Zn-SOD 1 : 3). Die Tumorklinien H322 (Clara-Zell-ähnlich) und H358 (Alveolar TypII-ähnlich) zeigen nur 10% der Katalaseaktivität und 50% der Cu/Zn-SOD-Aktivität von Lungengewebe der Ratte.
3. Die Wirkung von ROS ist u.a. an einer verstärkten Lipidperoxidation sowie an einer gesteigerten Zytotoxizität quantifizierbar. Nach einer Inkubation der Kulturen mit Paraquat (PQ) oder Wasserstoffperoxid (H_2O_2) erfolgte die Bestimmung der Zytotoxizitätsdaten mit einem Vitalitätstest (MTT) und die Bestimmung von Malondialdehyd (MDA), einem Abbauprodukt der Lipidperoxidation im Kulturmedium, mittels HPLC-Analytik. MDA stieg im Kulturmedium von Alveolar TypII-Zellen der Ratte nach PQ- oder H_2O_2 -Inkubation konzentrationsabhängig an. Im Kulturmedium der Tumorklinien H322 und H358 fand sich nach einer PQ-Inkubation kein, nach H_2O_2 erst ab 1 mM ein signifikanter Anstieg von MDA. Die Untersuchungen im MTT-Test an primären Kulturen von Alveolar TypII-Zellen und den Tumorklinien H322 und H358 zeigten einen konzentrationsabhängigen Abfall der Vitalität nach einer Inkubation mit PQ oder H_2O_2 über 20 Stunden.
4. Die mRNA-Expression für Katalase und Mn-SOD in humanen Bronchialepithelzellen (NH-BEZ) zeigt starke interindividuelle Unterschiede. Als adaptive Antwort auf die Kulturbedingungen fand sich eine 5-fache Steigerung der mRNA-Expression für Katalase und eine 2-fache Steigerung der Mn-SOD-mRNA von der 1. Auswachskultur (nach ca. 2 Wochen) zur 2. Auswachskultur (nach weiteren 2 Wochen).
5. Alveolar TypII-Zellen zeigen bis zum 4. Kulturtag keine Veränderungen der mRNA-Expression von Katalase, Mn-SOD und Cu/Zn-SOD. Nach einer Inkubation mit PQ oder H_2O_2 für 20 Stunden fanden sich keine Unterschiede in der mRNA-Expression für Katalase, Mn-SOD und Cu/Zn-SOD.

6. Nach einer Inkubation mit PQ oder H_2O_2 der NHBEZ sowie der Tumorlinien H322 und H358 für 20 Stunden fanden sich keine Unterschiede in der mRNA-Expression für Katalase und Mn-SOD. Tumorlinien zeigten eine signifikante Steigerung der Cu/Zn-SOD-Aktivitäten um maximal 50%.
7. Das Herbizid PQ ist besonders lungentoxisch. Über einen "Redox-Zyklus" generiert es reaktive Sauerstoffspezies (ROS). Das PQ-Dikation (PQ^{2+}) wird durch verschiedene Enzymsysteme zum Paraquatradikal ($\text{PQ}^{\bullet+}$) reduziert. Der Mechanismus der PQ-Toxizität kann in der sequenziellen Übertragung von Elektronen vom $\text{PQ}^{\bullet+}$ auf O_2 gesehen werden, in deren Folge sowohl Superoxidanionen ($\text{O}_2^{\bullet-}$), H_2O_2 als auch Hydroxylradikale (OH^\bullet) generiert werden können. Insbesondere für die Bildung von OH^\bullet aus H_2O_2 wird die Anwesenheit von Übergangsmetallionen, wie Fe^{2+} oder Cu^+ , im Sinne einer Reaktion vom Fenton-Typ, als notwendig angesehen. Die vorliegende Arbeit konnte jedoch zeigen, dass unter anaeroben Bedingungen das $\text{PQ}^{\bullet+}$ selbst durch eine Einelektronenübertragung auf H_2O_2 OH^\bullet generieren kann.
8. In einem Mikrosomensystem sollte die Zugabe von PQ den NADPH- und Sauerstoffverbrauch sowie die Bildung von $\text{O}_2^{\bullet-}$ steigern. Es wurde eine Konzentrationsabhängigkeit für den Sauerstoff- und NADPH-Verbrauch durch die Zugabe von PQ nachgewiesen, wobei Mikrosomen aus Rattenleber bedeutend stärker reagieren als Mikrosomen aus der Rattenlunge. Als indirekter Nachweis für die $\text{O}_2^{\bullet-}$ -Generierung wurde die lucigeninvermittelte Chemolumineszenz und die Formazanbildung aus Nitrobluetetrazolium untersucht. PQ führt im Mikrosomensystem zu keiner Veränderung der Chemolumineszenz von Mikrosomenfraktionen aus Leber- oder Lungengewebe der Ratte durch Lucigenin und zur Verminderung der Formazanbildung aus Nitrobluetetrazolium.
9. Das reduzierte $\text{PQ}^{\bullet+}$ lässt sich unter anaeroben Bedingungen stabilisieren und kann mittels UV-VIS- oder Elektronen-Spin-Resonanz-Spektroskopie (ESR) dargestellt werden. Mit dem Reduktionsmittel Natriumdithionit (NDT) und einem enzymatischen System, bestehend aus Xanthin und Xanthinoxidase (XO/X), wurden zwei Reduktionssysteme unter anaeroben Bedingungen etabliert. NDT reduzierte PQ^{2+} ab einem Verhältnis von 3 : 1 vollständig, wogegen das XO/X-System nur maximal 10% der eingesetzten PQ-Menge reduzierte.

10. Wenn $\text{PQ}^{\bullet+}$ durch H_2O_2 reoxidiert werden kann, sollte eine Änderung der Extinktion und eine Veränderung des ESR-Signals erkennbar sein. Unter anaeroben Bedingungen ist die Oxidation des PQ-Radikals durch H_2O_2 mit beiden Untersuchungstechniken nachweisbar. Im NDT-System ist die Nachweisbarkeit der $\text{PQ}^{\bullet+}$ -Oxidation vom Konzentrationsquotienten von PQ und NDT abhängig. Die Produkte der Interaktion von $\text{PQ}^{\bullet+}$ und H_2O_2 sind Hydroxylradikale. Sie lassen sich mittels DEPMPO (5-Di-ethoxyphosphoryl-5-methyl-1-pyrrolin-N-oxid) in der ESR-Spektroskopie nachweisen.
11. Wenn freie Metallionen für die Interaktion zwischen $\text{PQ}^{\bullet+}$ und H_2O_2 erforderlich sind, müsste der Einsatz von Desferoxamin, einem Komplexbildner für Eisen die Beobachtungen verhindern. Eine Vorinkubation des Reaktionsansatzes mit Desferoxamin hatte in beiden Untersuchungssystemen keinen Einfluss auf die Interaktion von $\text{PQ}^{\bullet+}$ und H_2O_2 . Dies zeigte, dass unter bestimmten Bedingungen die Bildung von Hydroxylradikalen aus der Reaktion zwischen $\text{PQ}^{\bullet+}$ und H_2O_2 ohne die Beteiligung von fentonfähigen Metallionen möglich ist.
12. Die im Rahmen dieser Arbeit an verschiedenen Lungenzellen gewonnenen Ergebnisse deuten darauf hin, dass die radikal vermittelten Wirkungsmechanismen nicht zwingend zu einer direkten Steigerung der antioxidativen Enzyme führen müssen. Die untersuchten Zelltypen müssen bis zu einem gewissen Maße ihre Zellintegrität durch andere Mechanismen, als der bloßen Enzymneusynthese, aufrecht erhalten. Die nur mäßige Induktion der SOD-Aktivitäten in den Tumorzellen und das Fehlen einer signifikanten mRNA-Induktion durch Oxidanzien veranlasst zu der Hypothese eines möglicherweise vermehrten Oxidanzien-getriggerten Enzymumsatzes.
13. Das $\text{PQ}^{\bullet+}$ bevorzugt O_2 als Elektronenakzeptor. Über eine Verschiebung des intrazellulären Milieus, z.B. durch den erhöhten Sauerstoffverbrauch nach einer PQ-Vergiftung, kann es zu einer quantitativen Umverteilung der intrazellulären Konzentrationen von $\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}_2$ und damit zu einer Verschiebung der Reaktionswege kommen. Auf dem Weg der direkten Interaktion zwischen $\text{PQ}^{\bullet+}$ und H_2O_2 könnten dann Hydroxylradikale generiert werden, so lange wie Elektronen auf PQ übertragen werden und H_2O_2 vorhanden ist.